

Biología Celular y Molecular

7.ª EDICIÓN

Harvey Lodish

Arnold Berk

Chris A. Kaiser

Monty Krieger

Anthony Bretscher

Hidde Ploegh

Angelika Amon

Matthew P. Scott



BUENOS AIRES - BOGOTÁ - CARACAS - MADRID - MÉXICO - PORTO ALEGRE

e-mail: info@medicapanamericana.com

www.medicapanamericana.com

**A nuestros estudiantes y a nuestros maestros, de quienes
seguimos aprendiendo, y a nuestras familias, por su apoyo,
su estímulo y su amor**

Al escribir la séptima edición de *Biología celular y molecular* hemos incorporado muchos de los espectaculares avances de los últimos cuatro años en la ciencia biomédica, producto en parte de nuevas tecnologías experimentales que revolucionaron muchos campos. Por ejemplo, técnicas rápidas para la secuenciación del DNA y el RNA han revelado muchos RNA no codificantes nuevos que regulan la expresión génica y la identificación de cientos de genes humanos que afectan enfermedades como la diabetes, la osteoporosis y el cáncer. La genómica ha permitido también recabar muchos nuevos conocimientos sobre la evolución de las formas de vida y las funciones de miembros individuales de familias de multiproteínas. La exploración de los desarrollos más actuales en el campo es siempre una prioridad para escribir una edición nueva, pero también es importante para nosotros comunicar las bases de la biología celular de forma clara. Para este fin, además de la introducción de nuevos descubrimientos y tecnologías, hemos optimizado y reorganizado diversos capítulos para clarificar procesos y conceptos para los estudiantes.

Nueva coautora, Angelika Amon

La nueva edición de *MCB* introduce un miembro a nuestro equipo de autores, la investigadora y respetada docente Angelika Amon, del *Massachusetts Institute of Technology*. Su laboratorio utiliza la levadura *S. cerevisiae* y modelos de ratones y cultivos celulares para lograr una comprensión molecular detallada de los circuitos reguladores que controlan la segregación de cromosomas y los efectos de la aneuploidía y la fisiología celular. La Dra. Amon también enseña a estudiantes universitarios y de posgrado materias de Biología celular y Genética.

Contenido innovador, revisado

La séptima edición de *Biología celular y molecular* incluye capítulos nuevos y mejorados:

- “Moléculas, células y evolución” (**Capítulo 1**) ahora enmarca a la biología celular en el contexto de la evolución: esta perspectiva explica por qué los científicos escogen organismos “modelo” unicelulares o multicelulares particulares para estudiar genes y proteínas específicas que son importantes para la función celular.
- “Cultivo, visualización, y perturbación de células” (**Capítulo 9**) se ha reescrito para incluir los métodos innovadores que incluyen FRAP, FRET, siRNA y química biológica, lo que ha convertido a este capítulo en un informe sobre la vanguardia de los métodos actuales.
- “Transducción de la señal y receptores acoplados a proteína G” y “Vías de señalización que controlan la expresión génica” (**Capítulos 15 y 16**) han sido reorganizados e ilustrados con figuras de revisión

simplificadas para ayudar a los estudiantes a navegar en la complejidad de las vías de señalización.

- “El ciclo celular eucarionte” (**Capítulo 19**) comienza con el concepto START (el compromiso de una célula de entrar en el ciclo celular comenzando con la síntesis de DNA) y continúa a través de todas las etapas del ciclo. El capítulo se enfoca en las levaduras y los mamíferos, y utiliza nombres generales para componentes del ciclo celular cuando es posible, para mejorar así el entendimiento de los estudiantes.
- “Células madre, asimetría celular y muerte celular” (**Capítulo 21**) incorpora tópicos sobre el desarrollo, incluidas las células madre pluripotentes inducidas (iPS).

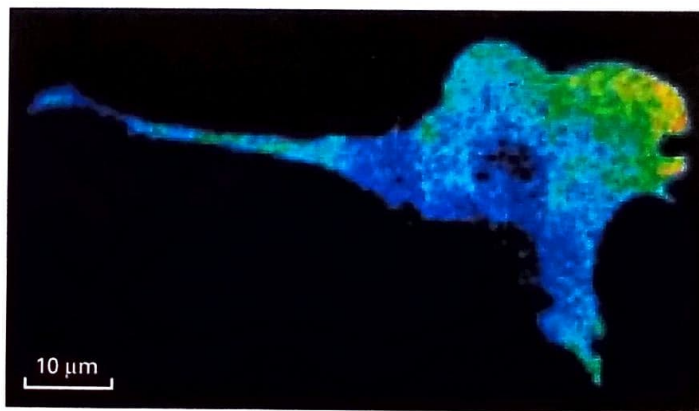


Figura 9-22 En este fibroblasto murino, se utilizó FRET para revelar que la interacción entre una proteína reguladora activa (Rac) y su compañero de unión se localiza en el frente de la célula migratoria.

Mayor la claridad, mejor pedagogía

Como docentes experimentados, tanto de estudiantes universitarios como de posgrado, siempre nos esforzamos en encontrar maneras para que los estudiantes comprendan mejor. En esta séptima edición, temas eternamente confusos como la energética celular, la señalización celular y la inmunología se han optimizado y revisado en favor de la comprensión del estudiante. Se reconsideró cada figura y, de ser posible, se simplificó para resaltar los puntos clave. Los materiales de final de capítulo fueron exhaustivamente revisados e incluyen un 30% de preguntas nuevas, y problemas de Análisis de los datos adicionales para brindar a los estudiantes más práctica en la interpretación de evidencia experimental. El resultado es un equilibrio entre la actual vanguardia y el enfoque experimental con atención en la claridad, la organización y la pedagogía.

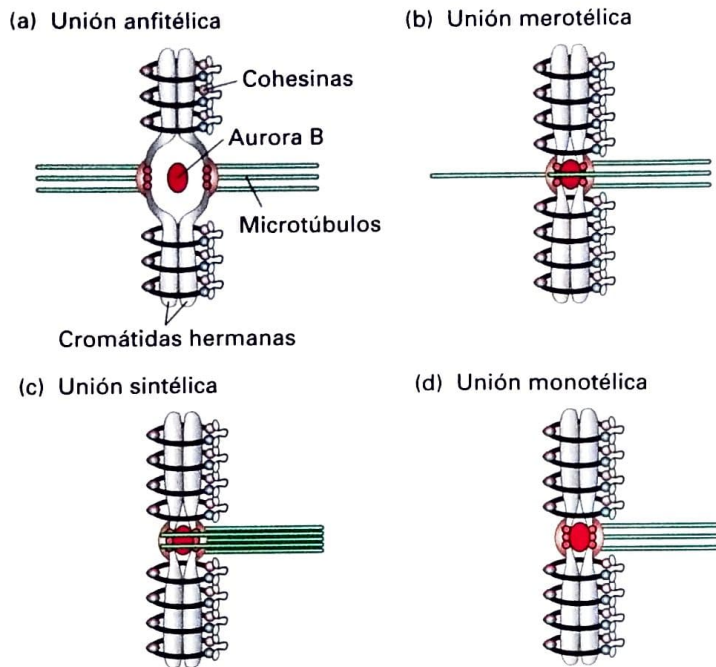
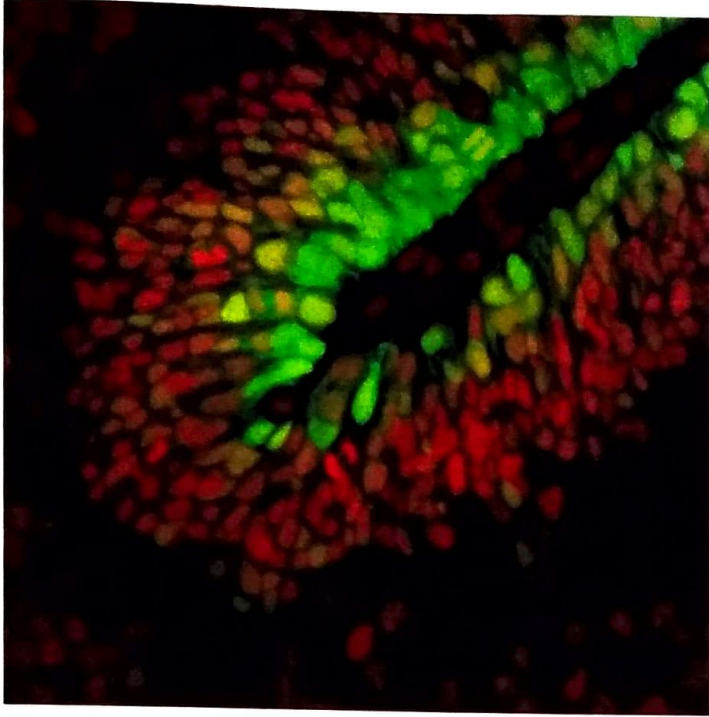


Figura 19-25 Adhesiones estables e inestables de cromosomas

Descubrimientos nuevos, tecnologías nuevas

- Regulación covalente de la actividad proteica por ubiquitinación/desubiquitinación (**Capítulo 3**)
- Chaperonas moleculares, incluida la familia de proteínas Hsp90 (**Capítulo 3**)
- Síntesis proteica de mamíferos y las funciones de la polimerasa delta (hebra retardada) y síntesis de DNA eucarionte (**Capítulo 4**)
- Sondas no radioactivas (p. ej., para hibridación in situ) (**Capítulo 5**)
- PCR cuantitativa (y RT-PCR) y secuenciación de DNA de alto rendimiento (**Capítulo 5**)
- Huellas digitales de DNA utilizando microsatélites y PCR (**Capítulo 6**)
- Secuenciación de genoma personal y el Proyecto 1 000 genomas (**Capítulo 6**)
- Mecanismos epigenéticos de regulación transcripcional (**Capítulo 7**)
- Regulación transcripcional por RNA no codificantes (p. ej., *Xist* en inactivación de cromosoma X, formación de heterocromatina dirigida por siRNA en levaduras de fisión y metilación de DNA en plantas) (**Capítulo 7**)
- mRNA fluorescente marcado para seguir localización de mRNA en células hepáticas (**Capítulo 8**)
- Estructura y función del complejo del poro nuclear (**Capítulos 8 y 13**)
- Cobertura adicional de FRAP, FRET, y técnicas de siRNA (**Capítulo 9**)
- Gotas lipídicas y su formación (**Capítulo 10**)
- Ensamblaje del complejo multiproteico de receptor célula T (**Capítulo 10**)
- Estructura de la ATPasa de Na^+/K^+ (**Capítulo 11**)
- Estructura y mecanismos del transportador multifármaco ABCB1 (MDR1) (**Capítulo 11**)
- Estructura y función del regulador transmembrana de fibrosis quística (**Capítulo 11**)
- La función de un antitransportador aniónico en la reabsorción ósea (**Capítulo 11**)
- Estructuras del complejo I y II, así como del mecanismo del flujo electrónico y el bombeo de protones en la cadena de transporte de electrones (**Capítulo 12**)
- Generación e inactivación de especies de oxígeno reactivas tóxicas (ROS) (**Capítulo 12**)
- El mecanismo de flujo de protones a través de hemicanales de la ATP sintasa (**Capítulo 12**)
- Proteínas de membrana ancladas por cola (**Capítulo 13**)
- Cómo las modificaciones de los oligosacáridos N-unidos se utilizan para verificar el plegamiento proteico y como control de calidad (**Capítulo 13**)
- El mecanismo de formación de endosomas multivesiculares que involucra la ubiquitinación y ESCRT (**Capítulo 14**)
- Avances en el entendimiento de la autofagia como un mecanismo para el reciclaje de orgánulos y proteínas (**Capítulo 14**)
- Técnicas de purificación de afinidad para estudiar proteínas de transducción de señales (**Capítulo 15**)
- Estructura del receptor β -adrenérgico en los estados activo e inactivos y con su proteína G trimérica asociada, $G_{\alpha s}$ (**Capítulo 15**)
- Activación del receptor EGF por EGF a través de la formación de un dímero de dominio cinasa asimétrico (**Capítulo 16**)
- La señalización de Hedgehog en vertebrados involucra cilios primarios (**Capítulo 16**)
- Vía de señalización NF- κB y estructura base poliubiquitina (**Capítulo 16**)
- Integración de señales en la diferenciación de células grasas a través de PPAR γ (**Capítulo 16**)
- Mecanismo de nucleación Arp2/3 de filamentos de actina (**Capítulo 17**)
- La dinámica de los microfilamentos durante la endocitosis y el papel del reciclaje de membranas endocíticas durante la migración celular (**Capítulo 17**)
- Transporte intraflagelar y la función de los cilios primarios (**Capítulo 18**)
- Mitosis y citocinesis de las plantas (**Capítulo 18**)
- +TIP como reguladores de la función final (+) de los microtúbulos (**Capítulo 18**)
- Proteínas involucradas en la formación del huso mitótico y adhesión cinetocoro a los microtúbulos (**Capítulo 19**)
- Fibras elásticas que permiten a muchos tejidos sufrir estiramientos y retrocesos (**Capítulo 20**)
- Remodelación y degradación de la matriz extracelular por parte de metaloproteinasas (**Capítulo 20**)
- Células madre en el epitelio intestinal (**Capítulo 21**)
- Regulación de la expresión génica en las células madre embrionarias (**Capítulo 21**)
- Generación de células madre pluripotenciales (iPS) (**Capítulo 21**)
- Avances en la comprensión de la muerte celular regulada (**Capítulo 21**)
- Estructura del receptor acetilcolina nicotínico (**Capítulo 22**)
- Modelo molecular del complejo receptor MEC-4 en *C. elegans* (**Capítulo 22**)
- Formación de la sinapsis en las uniones neuromusculares (**Capítulo 22**)

- Receptores del tipo Toll (TLR) y la inflammasoma (**Capítulo 23**)
- Epigenética y cáncer (**Capítulo 24**)



Las células que nacen en el cerebelo en desarrollo.

Importancia médica

Muchos avances en biología molecular y celular básica han llevado a nuevos tratamientos para el cáncer y otras enfermedades humanas importantes. Estos ejemplos médicos se incorporan a través de los capítulos donde se les brinda de forma adecuada a los estudiantes una apreciación de las aplicaciones médicas de la ciencia básica que están aprendiendo. Muchas de estas aplicaciones dependerán de un entendimiento detallado de los complejos multiproteicos en las células-complejos que catalizan los movimientos celulares, regulan la replicación y reparación y transcripción del DNA, coordinan el metabolismo y conectan las cé-

lulas con otras células y con proteínas e hidratos de carbono en sus ambientes extracelulares.

La siguiente lista brinda nuevos ejemplos médicos.

- Transporte de colesterol y aterosclerosis como una ilustración del efecto hidrófobo (**Capítulo 2**)
- Uso del maíz genéticamente modificado con alto contenido de lisina para estimular el crecimiento del ganado como una ilustración de la importancia de los aminoácidos esenciales (**Capítulo 2**)
- Poliovirus y HIV-1 como ejemplos de virus que infectan solo ciertos tipos de células debido a los receptores de superficie celular específicos de tejidos (**Capítulo 4**)
- Vacuna de HPV y su capacidad de proteger contra tipos comunes de HPV y el desarrollo de cáncer cervical (**Capítulo 4**)
- La enfermedad de Huntington como ejemplo de una enfermedad de expansión de microsatélites (**Capítulo 6**)
- Tratamiento potencial de la fibrosis quística que utiliza moléculas pequeñas que podrían permitir a la proteína mutante el tránsito normal hacia la superficie celular (**Capítulo 11**)
- Papel de los defectos genéticos en el CIC-7, un canal iónico de cloruro, en la enfermedad ósea hereditaria (**Capítulo 11**)
- Enfermedades mitocondriales tales como la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth y el síndrome de Miller (**Capítulo 12**)
- Uso de los dominios de unión a ligando de los receptores de superficie celular como fármacos terapéuticos, por ejemplo, el dominio extracelular del receptor TNF α para tratar la artritis y otros trastornos inflamatorios (**Capítulo 15**)
- Papel de la señalización Hedgehog (Hh) en los cánceres humanos que incluyen meduloblastomas y rabdomiosarcomas (**Capítulo 16**)
- Papel de la B-Raf cinasa en el melanoma y uso de inhibidores selectivos del B-Raf en el tratamiento del cáncer (**Capítulo 16**)
- Defectos en un regulador de la dineína como una causa de lisencefalia (**Capítulo 18**)
- Proteína fibroelástica fibrilina 1 y síndrome de Marfan (**Capítulo 20**)
- Uso de células iPS en el descubrimiento de las bases moleculares de ALS (**Capítulo 21**)
- Variaciones en el sentido del olfato humano (**Capítulo 22**)
- Análisis de micromatrices de tumores de cáncer de mama como vía para distinguir patrones de expresión génica y tratamientos individualizados (**Capítulo 24**)

El sitio web complementario de esta nueva edición de *Biología Celular y Molecular* ofrece, a estudiantes y docentes, valiosos materiales para el aprendizaje y la enseñanza de esta asignatura que se describen a continuación:

Estudiantes

- **Archivos de audios:** 26 narraciones en inglés de cada uno de los autores, referenciados dentro del texto y que describen en detalle los procesos de las figuras experimentales.
- **Animaciones.** 62 archivos *Flash Player*, todos referenciados en el libro, que corren directamente desde el sitio; tienen varios pasos y pueden verse como fotos o como una película narrada en inglés.
- **Videos.** 76 archivos *Quick Time* que se bajan al ordenador, con películas de movimiento continuo de moléculas y otras estructuras.
- **Experimentos clásicos.** 22 archivos de texto en español con la descripción ampliada de diferentes experimentos.

Docentes

- **Análisis de los datos:** 23 archivos de texto en español, con una ampliación de la sección *Análisis de los datos* del final de cada capítulo en el libro, que ofrece más ejemplos y preguntas.
- **Preguntas de autoevaluación:** 24 en archivos PowerPoint, con preguntas y respuestas en español sobre el tema de cada capítulo.
- **Figuras y cuadros del libro.** Todas las figuras y cuadros del libro para bajar y trabajar en proyectos

Los docentes tienen acceso también a todos los materiales para los estudiantes. El acceso a este sitio es mediante registro y requiere la validación de la actividad docente en una institución educativa.

Al actualizar, revisar y volver a escribir este libro, hemos contado con la ayuda invaluable de muchos colegas. Agradecemos a las siguientes personas, quienes generosamente donaron su tiempo y experiencia para hacer contribuciones a capítulos específicos en sus áreas de interés, al brindarnos información detallada acerca de sus cursos, o por leer y comentar en uno o más capítulos:

- David Agard, *University of California*, San Francisco
 Ravi Allada, *Norhwestern University*
 Stephen Amato, *Boston College*
 James M. Anderson, *National Institute of Health y University of North Carolina*, Chapel Hill
 Kenneth Balazovich, *University of Michigan*, Ann Arbor
 Amit Banerjee, *Wayne State University*
 Amy Bejsovec, *Duke University*
 Andrew Bendall, *University of Guelph*, Ridgetown
 Stephanie Bingham, *Barry University*, Dwayne O. Andreas School of Law
 Doug Black, *Howard Hughes Medical Institute y University of California*, Los Ángeles
 Heidi Blank, *Massachusetts Institute of Technology*
 Jonathan Bogan, Facultad de Medicina de *Yale University*
 Laurie Boyer, *Massachusetts Institute of Technology*
 William J. Brown, *Cornell University*
 Steve Burden, *New York University*
 Monique Cadrin, *Université du Québec à Trois Rivières*
 Steven A. Carr, *Broad Institute of Harvard y Massachusetts Institute of Technology*
 Paul Chang, *Massachusetts Institute of Technology*
 Kuang Yu Cheng, *Rutgers, The State University of New Jersey*, Camden
 Orna Cohen-Fix, *National Institutes of Health*
 Ronald Cooper, *University of California*, Los Ángeles
 David Deleke, *Indiana State University*
 Elizabeth De Stasio, *Lawrence University*
 Linda DeVeaux, *Idaho State University*
 Richard Dickerson, *University of California*, Los Ángeles
 Patrick DiMario, *Lousiana State University*
 Glenn Dorsam, *North Dakota State University*
 William Dowhan, *University of Texas*, Houston
 Janet Duerr, *Ohio University*
 Robert H. Filligame, Facultad de Medicina de *University of Winsconsin*
 Gerry Fink, *Massachusetts Institute of Technology*
 David Foster, *City University of New York*, Hunter College
 Gail Fraizer, *Kent State University*, Liverpool este
 Margaret T. Fuller, Facultad de Medicina de *Stanford University*
 Topher Gee, *University of North Carolina*, Charlotte
 Mary Gehring, *Massachusetts Institute of Technology*
 Elizabeth Good, *University of Illinois*, Urbana-Champaign
 David Goodenough, Facultad de Medicina de *Harvard*
 Mark Grimes, *University of Montana*, Missoula
 Lawrence I. Grossman, *Wayne State University*
 Michael Grunstein, Facultad de Medicina de *University of California*, Los Ángeles
 Barry M. Gunbriner, *University of Virginia*
 Yanlin Guo, *University of Mississippi*
 Leah Haimo, *University of California*, Riverside
 Craig Hart, *Louisiana State University*
 Michael Hemann, *Massachusetts Institute of Technology*
 Chris Hill, *University of Utah*
 H. Robert Horvitz, *Massachusetts Institute of Technology*
 Tim C. Huffaker, *Cornell University*
 Tom Huxford, *San Diego State University*
 Richard Hynes, *Massachusetts Institute of Technology y Howard Hughes Medial Institute*
 Naohiro Kato, *Louisiana State University*
 Amy E. Keating, *Massachusetts Institute of Technology*
 Thomas Keller, *Florida State University*, Panama City
 Greg Kelly, *University of Western Ontario*
 Leung Kim, *Florida International University*, Biscayne Bay
 Gwendolyn M. Kinebrew, *John Carroll University*
 Ashwini Kucknoor, *Lamar University*
 Mark Lazzaro, *College of Charleston*
 Maureen Leupold, *Genesee Community College*, Batavia
 Robert Levine, *McGill University*
 Fang Ju Lin, *Coastal Carolina University*
 Susan Lindquist, *Massachusetts Institute of Technology*
 Song-Tao Liu, *University of Toledo*, Scott Park
 Elizabeth Lord, *University of California*, Riverside
 Charles Mallery, *University of Miami*
 C. William McCurdy, *University of California*, Davis, y *Lawrence Berkeley National Laboratory*
 David McNabb, *University of Arkansas*
 James McNew, *Rice University*
 Raja Mitra, *Carleton College*
 Ivona Mladenovic, *Simor Fraser University*
 Vamsi K. Mootha, *Massachusetts General Hospital*, Boston
 Roderic Morgan, *Grand Valley State University*
 Dana Naydich, *Georgia Southern University*
 Brent Nielsen, *Brigham Young University*
 Terry Orr-Weaver, *Massachusetts Institute of Technology*
 Rekha Patel, *University of South Carolina*, Lancaster
 David Paul, Facultad de Medicina de *Harvard*
 Debra Pires, *University of California*, Los Ángeles
 Nicholas Quintyne, *Florida Atlantic University*, Jupiter
 Alex Rich, *Massachusetts Institute of Technology*
 Edmund Rucker, *University of Kentucky*
 Brian Sato, *University of California*, Irvine
 Robert Sauer, *Massachusetts Institute of Technology*
 Thomas Schwartz, *Massachusetts Institute of Technology*
 Gowry Selvan, *University of California*, Irvine
 Jiahai Shi, *Whitehead Institute for Biomechanical Research*

Daniel Simmons, *University of Delaware*
Stephen T. Smale, *University of California*, Los Ángeles
Paul Teesdale-Spittle, *Victoria University of Wellington*
Fernando Tenjo, *Virginia Commonwealth University*
Andrei Tokmakoff, *Massachusetts Institute of Technology*
Harald Vaessin, *Ohio State University*, Columbus
Peter van der Geer, *San Diego State University*
Volker M. Vogt, *Cornell University*
Michael B. Yaffe, *Massachusetts Institute of Technology*
Jing Zhang, *University of Wisconsin*

También queremos expresar nuestra gratitud y aprecio a Leah Haimo de *University of California*, Riverside, por su desarrollo de nuevos problemas de Análisis de datos, a Cindy Klevickis de *James Madison University* y a Greg M. Kelly de la *University of Ontario* por su autoría de los nuevos problemas de revisión de los conceptos y preguntas de banco de evaluaciones, y a Jill Sible de *Virginia Polytechnic Institute y State University* por su revisión de los problemas de evaluación en línea. También le agradecemos a Lisa Rezende de *University of Arizona* por su desarrollo de los experimentos clásicos y los archivos de audio.

Esta edición no habría sido posible sin la colaboración dedicada y comprometida de nuestros socios editores en *W. H. Freeman and Company*. Agradecemos a Kate Ahr Parker, Mary Louise Byrd, Debbie Clare, Marsha Cohen, Victoria Tomaselli, Christina Micek, Bill O'Neal, Marni Rolfes, Beth McHenry, Susan Timmins, Cecilia Varas y Julia DeRosa por sus tareas y su voluntad de trabajar horas extras para producir el libro que sobresale en todos los sentidos.

En particular, nos gustaría reconocer el talento y el compromiso de nuestros editores de texto, Matthew Tontonoz, Erika Pantages Frost y

Erica Champion. Ellos son editores notables. Gracias por todo lo que hicieron en esta edición.

También estamos en deuda con H Adam Steinberg por su visión pedagógica y su desarrollo de los hermosos modelos moleculares e ilustraciones.

Queremos reconocer a aquellos cuyas contribuciones directas a las ediciones anteriores continúan influyendo en esta edición, en especial a Ruth Steyn.

Gracias a nuestro propio equipo: Sally Bittancourt, Diane Bush, Mary Anne Donovan, Carol Eng, James Evans, George Kokkinogenis, Julie Knight, Guicky Waller, Nicki Watson y Rob Welsh.

Finalmente, un agradecimiento especial a nuestras familias por inspirarnos y concedernos el tiempo que se requiere para trabajar en un libro como este, y a nuestros mentores y asesores por estimularnos en nuestros estudios y enseñarnos todo lo que sabemos: (Harvey Lodish) mi esposa Pamela; mis hijos y mis nietos Heidi y Erik Steinert y Emma y Andrew Steinert; Martin Lodish, Kristin Schardt, y Sophia, Joshua y Tobias Lodish; y Stephanie Lodish, Bruce Peabody e Isaac y Violet Peabody; los mentores Norton Zindery y Sydney Brenner; y también David Baltimore y Jim Darnell por colaborar en las primeras ediciones de este libro; (Arnold Berk) mi esposa Sally, Jerry Berk, Shirley Berk, Shirley Berk, Angelina Smith, David Clayton y Phil Sharp; (Chris A. Kaiser) mi esposa Kathy O'Neill; (Monty Krieger) mi esposa Nancy Krieger, mis padres I. Kay Krieger y Mildred Krieger, y los niños Jonathan Krieger y Joshua Krieger; mis mentores Robert Stroud, Michael Brown y Joseph Goldstein; (Anthony Bretscher) mi esposa Janice y mis hijas Heidi y Erika, y mis consejeros A. Dale Kaiser y Klaus Weber; (Hidde Ploegh) mi esposa Anne Mahon; (Angelika Amon) mi esposo Johannes Weis, Theresa y Clara Weis, Gerry Fink y Frank Solomon.

Parte I Fundamentos químicos y moleculares

- 1 Moléculas, células y evolución 1
- 2 Fundamentos químicos 23
- 3 Estructura y función de las proteínas 59

Parte II Genética y biología molecular

- 4 Mecanismos genéticos moleculares 115
- 5 Técnicas de genética molecular 171
- 6 Genes, genómica, y cromosomas 223
- 7 Control transcripcional de la expresión génica 279
- 8 Control génico postrasduccional 345

Parte III Estructura y función celular

- 9 Cultivo, visualización y perturbación de células 397
- 10 Estructura de las biomembranas 443
- 11 Transporte de iones y moléculas pequeñas a través de la membrana 473
- 12 Energética celular 517
- 13 El movimiento de las proteínas hacia la membrana y orgános 577
- 14 Tránsito, secreción y endocitosis vesiculares 627
- 15 Transducción de la señal y receptores acoplados a proteína G 673
- 16 Vías de señalización que controlan la expresión génica 721
- 17 Organización y movimiento celular I: microfilamentos 773
- 18 Organización y movimiento celular II: microtúbulos y filamentos intermedios 821
- 19 El ciclo celular de las células eucariontes 873

Parte IV Crecimiento celular y desarrollo

- 20 Integración de células en tejidos 925
- 21 Células madre, asimetría celular y muerte celular 977
- 22 Células nerviosas 1019
- 23 Inmunología 1059
- 24 Cáncer 1113

Parte I Fundamentos químicos y moleculares

Los siguientes capítulos presentan datos experimentales que explican cómo sabemos lo que sabemos sobre la estructura y la función de las células 22

1 Moléculas, células y evolución 1

1.1 Las moléculas de la vida

- Las proteínas dan estructura a las células y llevan a cabo la mayoría de las tareas celulares 6
- Los ácidos nucleicos contienen información codificada para la síntesis de proteínas en el momento y lugar oportunos 7
- Los fosfolípidos son las unidades monoméricas de todas las membranas celulares 10

1.2 Genomas, arquitectura y función celular

- Los procariontes incluyen las bacterias verdaderas y las archaea 10
- Escherichia coli* se utiliza ampliamente en la investigación biológica 13
- Todas las células eucariontes tienen muchos orgánulos iguales y otras estructuras subcelulares 13
- El DNA celular está empaquetado dentro de los cromosomas 15
- Todas las células eucariontes utilizan un ciclo similar para regular su división celular 15

1.3 De las células a los tejidos: los organismos unicelulares y los metazoos se utilizan para las investigaciones de biología celular molecular 16

- Los eucariontes unicelulares se usan para estudiar aspectos fundamentales de la estructura y función de la célula eucarionte 16
- Las mutaciones en la levadura conducen a la identificación de proteínas clave del ciclo celular 17
- La multicelularidad requiere adhesión célula-célula y célula-matriz 17
- Los tejidos se organizan en órganos 18
- El plan corporal y los tejidos rudimentarios se forman temprano en el desarrollo embrionario 18
- Los invertebrados, los peces y otros organismos sirven como sistemas experimentales para el estudio del desarrollo humano 19
- Los ratones se utilizan con frecuencia para generar modelos de enfermedades humanas 20
- Los virus son parásitos celulares que se utilizan extensamente en las investigaciones de biología celular y molecular 21
- Las enfermedades genéticas aclaran aspectos importantes de la función celular 22

2 Fundamentos químicos 23

2.1 Enlaces covalentes e interacciones no covalentes 24

- La estructura electrónica de un átomo determina el número y la geometría de los enlaces covalentes que puede formar 25
- En los enlaces covalentes, los electrones pueden compartirse por igual o de manera desigual 26
- Los enlaces covalentes son mucho más fuertes y más estables que las interacciones no covalentes 28
- Las interacciones iónicas son atracciones entre iones de cargas opuestas 28
- Los enlaces de hidrógeno son interacciones no covalentes que determinan la solubilidad en agua de las moléculas sin carga 28
- Las interacciones de van der Waals son de atracción débil y causadas por dipolos transitorio 30
- El efecto hidrófobo hace que las moléculas no polares se adhieran entre sí 31
- La complementariedad molecular, debido a las interacciones no covalentes, conduce a un ajuste del tipo llave y cerradura entre las biomoléculas 32

2.2 Unidades monoméricas químicas de las células 33

- Los aminoácidos que componen las proteínas solo difieren en sus cadenas laterales 33
- Cinco nucleótidos diferentes construyen los ácidos nucleicos 36
- Los monosacáridos se ensamblan mediante enlaces covalentes para formar polisacáridos lineales y ramificados 37
- Los fosfolípidos se asocian de forma no covalente para formar la estructura básica de bicapa de las biomoléculas 40

2.3 Reacciones químicas y equilibrio químico 43

- Una reacción química está en equilibrio cuando las velocidades directa e inversa de las reacciones se igualan 43
- La constante de equilibrio refleja la extensión de una reacción química 44
- Las reacciones químicas en las células están en equilibrio estacionario 44

Las constantes de disociación de las reacciones de unión reflejan la afinidad de las moléculas que interactúan	44
Los líquidos biológicos tienen valores de pH característicos	45
Los ácidos liberan iones hidrógeno y las bases los incorporan	46
Las soluciones amortiguadoras mantienen el pH de los líquidos intracelulares y extracelulares	47

2.4 Energética bioquímica

Varias formas de energía son importantes para los sistemas biológicos	48
Las células pueden transformar un tipo de energía en otro	49
El cambio en la energía libre determina si una reacción química ocurrirá espontáneamente	49
El ΔG° de una reacción se puede calcular a partir de su K_{eq}	51
La velocidad de una reacción depende de la energía de activación necesaria para energizar los reactivos durante un estado de transición	51
La vida depende del acoplamiento de reacciones químicas desfavorables con otras energéticamente favorables	52
La hidrólisis de ATP libera cantidad sustancial de energía libre y conduce muchos procesos celulares	52
El ATP es generado durante la fotosíntesis y la respiración	54
El NAD ⁺ y el FAD se acoplan a muchas reacciones biológicas de oxidación y reducción	54

3 Estructura y función de las proteínas 59

3.1 Estructura jerárquica de las proteínas 61

La estructura primaria de una proteína es su disposición lineal de aminoácidos	61
Las estructuras secundarias son los elementos cruciales de la arquitectura proteica	62
La estructura terciaria es el plegamiento global de una cadena polipeptídica	64
Diferentes formas de representar la conformación de las proteínas confieren diferentes tipos de información	64
Los motivos estructurales son combinaciones regulares de estructuras secundarias	65
Los dominios son módulos de estructura terciaria	67
Múltiples polipéptidos se ensamblan en estructuras cuaternarias y complejos supramoleculares	68
Los miembros de una familia de proteínas tienen un ancestro común en la evolución	69

3.2 Plegamiento de proteínas 70

Los enlaces peptídicos planos limitan las formas en las cuales pueden plegarse las proteínas	71
La secuencia de aminoácidos de una proteína determina su plegamiento	71
El plegamiento de proteínas in vivo está promovido por las chaperonas	72
Las proteínas plegadas en forma alternativa tienen implicación en las enfermedades	76

3.3 Unión de las proteínas y catálisis enzimática 77

La unión específica de ligandos subyace a las funciones de la mayoría de las proteínas	77
Las enzimas son catalizadores altamente eficientes y específicos	78
Un sitio activo de la enzima se une al sustrato y efectúa la catálisis	79
Las proteasas de serinas demuestran cómo opera el sitio activo de una enzima	80
Las enzimas de una vía común con frecuencia están asociadas entre sí	84

3.4 Regulación de la función de las proteínas 85

La síntesis y degradación regulada de las proteínas es una propiedad fundamental de las células	85
El proteosoma es una maquinaria molecular usada para la degradación de las proteínas	85
La ubiquitina marca a las proteínas citosólicas para su degradación en los proteosomas	87
Los enlaces no covalentes permiten la regulación alostérica o cooperativa de las proteínas	88
La unión no covalente de calcio y el GTP se emplea ampliamente como interruptor alostérico para controlar la actividad de las proteínas	88
La fosforilación y la desfosforilación regulan en forma covalente la actividad de las proteínas	90
La ubiquitinación y la desubiquitinación regulan en forma covalente la actividad de las proteínas	90
La rotura o fragmentación proteolítica activa irreversiblemente algunas proteínas o las inactiva	92
La regulación de orden superior incluye el control de la localización y concentración de las proteínas	92

3.5 Purificación, detección y caracterización de proteínas 93

La centrifugación puede separar las partículas y moléculas que difieren en masa o densidad	93
La electroforesis separa las moléculas sobre la base de su cociente carga a masa	93
La cromatografía líquida resuelve proteínas de acuerdo con su masa, carga o capacidad de unión	96
Los ensayos con enzimas y anticuerpos específicos pueden detectar proteínas individuales	97
Los radioisótopos son herramientas indispensables para detectar moléculas biológicas	99
La espectrometría de masas puede determinar la masa y secuencia de las proteínas	101
La estructura primaria de una proteína puede determinarse con métodos químicos y a partir de secuencias génicas	104
La conformación de las proteínas se determina mediante métodos físicos sofisticados	104

3.6 Proteómica 106

La proteómica es el estudio de todas las proteínas en un sistema biológico o un grupo grande de ellas	106
---	-----

Las técnicas avanzadas de espectrometría de masas son críticas para el análisis proteómico	108
--	-----

Parte II Genética y biología molecular

4 Mecanismos genéticos moleculares 115

4.1 Estructura de los ácidos nucleicos 117

Una hebra de ácido nucleico es un polímero lineal con una direccionalidad extremo a extremo	117
El DNA nativo es una doble hélice de hebras antiparalelas complementarias	118
El DNA puede sufrir separación reversible de las hebras	120
El estrés de torsión en el DNA se alivia por acción enzimática	121
Diferentes tipos de RNA muestran varias conformaciones relacionadas con sus funciones	122

4.2 Transcripción de los genes que codifican proteínas y formación de mRNA funcional 124

Una hebra molde de DNA se transcribe a una cadena complementaria de RNA por la RNA polimerasa	124
La organización de genes difiere en el DNA procarionte y eucarionte	126
Los mRNA precursores eucariontes son procesados para formar los mRNA funcionales	128
El corte y empalme alternativo de RNA aumenta el número de proteínas expresadas por un único gen eucarionte	129

4.3 La decodificación de los mRNA por los tRNA 131

El RNA mensajero lleva información desde el DNA en un código genético de tres letras	131
La estructura plegada de los tRNA promueve sus funciones de decodificación	133
Entre los codones y los anticodones con frecuencia ocurre el apareamiento de bases no estándar	134
Los aminoácidos se activan cuando se unen en forma covalente a los tRNA	135

4.4 Síntesis escalonada de las proteínas en los ribosomas 136

Los ribosomas son máquinas de síntesis proteica	136
El metionil-tRNA ^{Met} reconoce el codón de iniciación UG	137
La iniciación de la traducción en los eucariontes generalmente ocurre en el primer AUG cercano al extremo 5' de un mRNA	137
Durante la elongación de la cadena cada aminoacil-tRNA entrante se mueve a través de tres sitios de ribosómicos	140
La traducción se termina por factores de liberación cuando se llega a un codón de terminación	142
Los polisomas y el reciclaje rápido de los ribosomas incrementan la eficiencia de la traducción	142

Las superfamilia de las proteínas GTPasa funciona en varios pasos de control de calidad de la traducción	143
Las mutaciones sin sentido provocan la terminación prematura de la síntesis proteica	143

4.5 Replicación del DNA 145

Las DNA polimerasas requieren un cebador para iniciar la replicación	145
El DNA dúplex se desenrolla y las hebras hijas se forman en la horquilla de replicación del DNA	145
Varias proteínas participan en la replicación del DNA	147
La replicación del DNA ocurre bidireccionalmente desde cada origen	149

4.6 Reparación y recombinación del DNA 151

Las DNA polimerasas introducen errores de copiado y también los corrigen	151
El daño químico y por radiación al DNA puede provocar mutaciones	151
Los sistemas de reparación por escisión del DNA de alta fidelidad reconocen y reparan el daño	152
La escisión de base repara apareamientos erróneos de T-G y bases dañadas	153
La escisión de apareamiento incorrecto repara otros apareamientos incorrectos y pequeñas inserciones y deleciones	153
La escisión de nucleótidos repara los aductos químicos que distorsionan la forma normal del DNA	154
Dos sistemas emplean la recombinación para reparar las roturas del DNA de doble hebra	155
La recombinación homóloga puede reparar el daño al DNA y generar diversidad genética	156

4.7 Los virus: los parásitos del sistema genético celular 160

La mayoría de los rangos de hospedadores virales son estrechos	160
Las cápsides virales son disposiciones regulares de uno o unos pocos tipos de proteínas	160
Los virus pueden clonarse y contarse en ensayos en placa	160
Los ciclos líticos de crecimiento virales conducen a la muerte de las células huéspedes	161
El DNA del virus se integra en el genoma de la célula huésped en algunos ciclos de crecimiento virales no líticos	164

5 Técnicas de genética molecular 171

5.1 Análisis genético de mutaciones para identificar y estudiar genes 172

Los alelos mutantes dominantes y recesivos suelen tener efectos opuestos en la función del gen	172
La segregación de mutaciones en experimentos de cruzamientos de cepas revela si son dominantes o recesivas	173
Pueden utilizarse mutaciones condicionales para estudiar genes esenciales en levaduras	175

Las mutaciones letales recesivas en los diploides pueden identificarse mediante endogamia y mantenerse en heterocigotos	176	Se necesita un análisis posterior para localizar un gen de enfermedad en el DNA clonado	209
Las pruebas de complementación determinan si diferentes mutaciones recesivas están en el mismo gen	177	Muchas enfermedades hereditarias son el resultado de múltiples defectos genéticos	210
Los dobles mutantes son útiles en la evaluación del orden en el cual funcionan las proteínas	178	5.5 Inactivación de la función de genes específicos en los eucariontes	212
La supresión genética y la letalidad sintética pueden revelar proteínas interactuantes o redundantes	179	Los genes normales de levadura pueden reemplazarse con alelos mutantes por recombinación homóloga	212
Pueden identificarse genes mediante su posición en el mapa en el cromosoma	180	La transcripción de genes ligados a un promotor regulado puede controlarse experimentalmente	213
5.2 Clonación de DNA y caracterización	182	Genes específicos pueden ser inactivados de forma permanente la línea germinal de ratones	213
Las enzimas de restricción y las DNA ligasas permiten la inserción de los fragmentos de DNA dentro de los vectores de clonación	183	La recombinación de células somáticas puede inactivar genes en tejidos específicos	214
Los vectores plasmídicos de <i>E. coli</i> son adecuados para clonar fragmentos aislados de DNA	184	Los alelos dominantes negativos pueden inhibir funcionalmente algunos genes	215
Las bibliotecas de cDNA representan las secuencias de los genes que codifican proteínas	185	La interferencia del RNA causa la inactivación génica mediante destrucción del mRNA correspondiente	216
Los cDNA preparados mediante transcripción inversa de los mRNA celulares pueden clonarse para generar bibliotecas de cDNA	186	6 Genes, genómica y cromosomas	223
Las bibliotecas de DNA pueden rastrearse mediante hibridación con una sonda de oligonucleótido	188	6.1 Estructura de genes eucariontes	225
Las bibliotecas genómicas de levaduras pueden construirse con vectores lanzadera y rastrearse mediante complementación funcional	188	La mayoría de los eucariontes contienen intrones y producen mRNA que codifican proteínas únicas	225
La electroforesis en gel permite la separación del vector de DNA de los fragmentos clonados	191	En los genomas eucariontes se encuentran unidades de transcripción simples y complejas	225
La reacción en cadena de la polimerasa amplifica una secuencia específica de DNA a partir de una mezcla compleja	192	Los genes que codifican proteínas pueden estar solos o pertenecer a una familia génica	227
Las moléculas de DNA clonado se secuencian de forma rápida mediante métodos basados en la PCR	195	Los productos génicos más utilizados están codificados por múltiples copias de genes	229
5.3 Uso de los fragmentos de DNA clonados para estudiar la expresión génica	198	Los genes que no codifican proteínas codifican RNA funcionales	230
Las técnicas de hibridación permiten la detección de fragmentos de DNA específicos y mRNA	198	6.2 Organización cromosómica de los genes y el DNA no codificante	231
Las micromatrices de DNA pueden utilizarse para evaluar la expresión de muchos genes a la vez	199	Los genomas de muchos organismos contienen DNA no funcional	231
El análisis de grupos de experimentos de expresión múltiple identifica genes corregulados	200	La mayoría de las secuencias simples de DNA están concentradas en localizaciones cromosómicas específicas	232
Los sistemas de expresión de <i>E. coli</i> pueden producir grandes cantidades de proteínas a partir de genes clonados	201	Las huellas genéticas dependen de las diferencias en la longitud de los DNA de secuencia simple	233
Los vectores de expresión plasmídicos pueden ser diseñados para utilizarlos en sistemas animales	203	El DNA espaciador no clasificado ocupa una porción significativa del genoma	233
5.4 Localización e identificación de genes de enfermedades humanas	206	6.3 Elementos transponibles (móviles) de DNA	234
Las enfermedades monogénicas muestran uno de los tres patrones de herencia	206	El movimiento de los elementos móviles involucra un intermediario DNA o RNA	235
Los polimorfismos de DNA se utilizan como marcadores para el mapeo por ligamiento de mutaciones humanas	207	Los transposones de DNA están presentes en los procariontes y los eucariontes	236
Los estudios de ligamiento pueden mapear genes de enfermedades con una resolución de alrededor de 1 centimorgan	208	Los retrotransposones LTR se comportan como los retrovirus intracelulares	238
		Los retrotransposones sin LTR transponen mediante un mecanismo diferente	240
		En el DNA genómico se encuentran otros RNA retrotranspuestos	243

Los elementos móviles de DNA han tenido una influencia significativa en la evolución 243

6.4 DNA de orgánulos 245

Las mitocondrias contienen múltiples moléculas de mtDNA 245

El mtDNA tiene herencia citoplásmica 246

El tamaño, la estructura y la capacidad decodificante del mtDNA varían considerablemente entre organismos 246

Los productos de genes mitocondriales no son exportados 248

Las mitocondrias evolucionaron a partir de un acontecimiento endosimbiótico que involucra una bacteria del tipo *Rickettsia* 249

El código genético mitocondrial difiere del código nuclear estándar 249

Las mutaciones en el DNA mitocondrial causan diversas enfermedades genéticas en los seres humanos 250

Los cloroplastos contienen DNA grandes que suelen codificar más de un centenar de proteínas 251

6.5 Genómica: análisis amplio del genoma de la estructura y la expresión génica 252

Las secuencias almacenadas sugieren funciones recién identificadas de proteínas y genes 252

La comparación de secuencias relativas de diferentes especies puede brindar indicios acerca del parentesco evolutivo entre proteínas 253

Los genes pueden identificarse dentro de secuencias del DNA genómico 253

El número de genes que codifican proteínas en el genoma de un organismo no está directamente relacionado a su complejidad biológica 254

6.6 Organización estructural de los cromosomas eucariontes 256

La cromatina existe en las formas extendida y condensada 256

Las modificaciones de las colas de histonas controlan la condensación y la función de la cromatina 258

Las proteínas no histonas organizan los bucles largos de cromatina 263

Proteínas no histonas adicionales regulan la transcripción y la replicación 265

6.7 Morfología y elementos funcionales de los cromosomas eucariontes 266

El número, el tamaño y la forma de los cromosomas en la metafase son específicos de especie 266

Durante la metafase, los cromosomas pueden distinguirse por patrones de bandas y la coloración 267

La pintura cromosómica y la secuenciación de DNA revelan la evolución de los cromosomas 268

Los cromosomas politénicos en interfase surgen mediante amplificación del DNA 269

Tres elementos funcionales son necesarios para la replicación y la herencia estable de los cromosomas 270

Las secuencias de centrómero varían enormemente en longitud y complejidad 271

La adición de las secuencias teloméricas por la telomerasa evita el acortamiento de los cromosomas 273

7 Control transcripcional de la expresión génica 279

7.1 Control de la expresión génica en bacterias 282

La iniciación de la transcripción por las RNA polimerasas bacterianas requiere de la asociación con un factor sigma 282

La iniciación de la transcripción del operón *lac* puede reprimirse o activarse 282

Pequeñas moléculas regulan la expresión de muchos genes bacterianos por medio de los represores y los activadores de unión al DNA 284

La iniciación de la transcripción a partir de algunos promotores requiere factores sigma alternativos 285

La transcripción por la σ^{54} RNA polimerasa está controlada por activadores que se unen lejos del promotor 285

Muchas respuestas bacterianas están controladas por sistemas reguladores de dos componentes 285

Control de la elongación de la transcripción 286

7.2 Panorama general del control génico en eucariontes 288

Los elementos reguladores en el DNA eucarionte se pueden encontrar junto a los sitios de inicio de la transcripción o a muchas kilobases de distancia 289

Tres RNA polimerasas eucariontes catalizan la formación de diferentes RNA 290

La subunidad más grande en la RNA polimerasa II tiene una repetición carboxilo terminal esencial 293

7.3 Promotores y factores de transcripción generales de la RNA polimerasa II 295

La RNA polimerasa II inicia la transcripción de las secuencias de DNA correspondientes a la caperuza 5' de los mRNA 295

La caja TATA, los iniciadores y las islas CpG funcionan como promotores en el DNA eucarionte 295

Los factores de transcripción generales posicionan la RNA polimerasa II en los sitios de inicio y asisten en la iniciación 297

La iniciación de la transcripción in vivo por la RNA polimerasa II requiere proteínas adicionales 301

Los factores de elongación regulan las etapas iniciales de la transcripción en la región proximal al promotor 301

7.4 Secuencias reguladoras en los genes que codifican proteínas y las proteínas mediante las cuales funcionan 302

Los elementos próximos del promotor ayudan a regular genes eucariontes 302

Los amplificadores distantes suelen estimular la transcripción por la RNA polimerasa II 303

La mayoría de los genes eucariontes son regulados por múltiples elementos de control de la transcripción 304

Los ensayos de huella genética y de retardo en gel detectan las interacciones entre el DNA y las proteínas 305

Los activadores estimulan la transcripción y están compuestos por distintos dominios funcionales	305
Los represores inhiben la transcripción y funcionan al revés que los activadores	307
Los dominios de unión al DNA se pueden clasificar dentro de numerosos tipos estructurales	308
Dominios de activación y represión estructuralmente diversos regulan la transcripción	311
Las interacciones de factores de transcripción incrementan las opciones de control génico	312
Complejos multiproteicos se forman sobre los potenciadores	314
7.5 Mecanismos moleculares de represión y activación de la transcripción	315
Formación de genes de silenciamiento de la heterocromatina	315
Los represores pueden dirigir la desacetilación de histonas en genes específicos	318
Los activadores pueden dirigir la acetilación de histonas en genes específicos	318
Los factores de remodelación de la cromatina contribuyen a activar o reprimir la transcripción	319
El complejo mediador forma un puente molecular entre los dominios de activación y la Pol II	320
El sistema de doble híbrido de levadura	321
7.6 Regulación de la actividad de los factores de transcripción	323
Todos los receptores nucleares comparten una estructura de dominio común	324
Los elementos de respuesta al receptor nuclear contienen repeticiones directas o invertidas	324
La unión de hormona a un receptor nuclear regula su actividad como un factor de transcripción	325
Los metazoos regulan la transición de la Pol II de la iniciación a la elongación	325
La terminación de la Pol II también está regulada	326
7.7 Regulación epigenética de la transcripción	327
Represión epigenética por metilación del DNA	327
La metilación de las histonas en otras lisinas específicas está conectada a los mecanismos epigenéticos de la represión génica	328
Control epigenético por parte de los complejos Polycomb y Trithorax	330
Los RNA no codificantes dirigen la represión epigenética en los metazoos	331
Las plantas y la levadura usan metilación de las histonas y el DNA dirigida por RNA cortas	333
7.8 Otros sistemas de transcripción eucariontes	336
La iniciación de la transcripción por Pol I y Pol III es análoga a la de la Pol II	336
Los DNA de cloroplastos y mitocondrias se transcriben mediante RNA polimerasas específicas de orgánulo	338

8 Control génico postraduccional	345
8.1 Procesamiento del pre-mRNA eucarionte	348
La caperuza 5' se añade a los RNA nacientes poco tiempo después de la iniciación de la transcripción	348
Un grupo diverso de proteínas con dominios de unión al RNA conservados se asocian con los pre-mRNA	349
El proceso de corte y empalme se produce en secuencias cortas, conservadas en los pre-mRNA a través de dos reacciones de transesterificación	351
Durante el proceso de corte y empalme, los snRNA forman apareamientos de bases con el pre-mRNA	352
Los espliceosomas, ensamblados a partir de los snRNP y un pre-mRNA, llevan a cabo el proceso de corte y empalme	353
La elongación de la cadena por la RNA polimerasa II está acoplada a la presencia de factores del procesamiento del RNA	356
Las proteínas SR contribuyen a la definición del exón en los pre-mRNA largos	356
Los intrones del grupo II de autoprosesamiento proporcionan pistas acerca de la evolución de los snRNA	357
La escisión 3' y la poliadenilación de los pre-mRNA están estrechamente acopladas	358
Las exonucleasas nucleares degradan el RNA que es procesado y eliminado de los pre-Mrna	359
8.2 Regulación del procesamiento del pre-mRNA	360
El corte y empalme alternativo genera transcritos con diferentes combinaciones de exones	361
Una cascada regulada de corte y empalme de RNA controla la diferenciación sexual en <i>Drosophila</i>	361
Los represores y activadores del corte y empalme del RNA controlan este proceso en sitios alternativos	362
La edición del RNA altera las secuencias de algunos pre-mRNA	364
8.3 Transporte del mRNA a través de la envoltura nuclear	365
Las macromoléculas entran y salen del núcleo a través de los complejos del poro nuclear	365
Los pre-mRNA en los espliceosomas no son exportados desde el núcleo	367
La proteína Rev regula el transporte de los mRNA virales no procesados	368
8.4 Mecanismos citoplasmáticos de control postranscripcional	370
Los micro-RNA reprimen la traducción de mRNA específicos	371
La interferencia por RNA induce la degradación de los mRNA perfectamente complementarios	373
La poliadenilación citoplasmática estimula la traducción de algunos mRNA	374
La degradación de los mRNA en el citoplasma se produce por medio de diversos mecanismos	375

La síntesis proteica se puede regular de manera global	376	La microscopia confocal y de desconvolución amplifica la visualización de objetos fluorescentes tridimensionales	411
Las proteínas de unión al RNA de secuencia específica controlan la traducción del mRNA específico	379	La microscopia TIRF proporciona una imagen excepcional en un solo plano focal	415
Mecanismos de vigilancia evitan la traducción de los mRNA procesados inadecuadamente	380	FRAP revela la dinámica de los componentes celulares	415
Localización de los mRNA que permiten la producción de proteínas en regiones específicas dentro del citoplasma	380	FRET mide la distancia entre los cromóforos	416
8.5 Procesamiento del rRNA y tRNA	384	La microscopia de superresolución puede localizar proteínas de hasta el nanómetro de precisión	418
Los genes de pre-rRNA funcionan como organizadores nucleolares y son similares en todos los eucariontes	384	9.3 Microscopia electrónica: imagen de alta resolución	419
Los RNA nucleolares pequeños asisten en el procesamiento de los pre-rRNA	385	Se pueden obtener imágenes de moléculas o estructuras individuales después de una tinción negativa o de ser recubiertas con metal	419
Los intrones del grupo I de autoprocesamiento fueron los primeros ejemplos del RNA catalítico	389	Las células y los tejidos son cortados en secciones delgadas para su visualización mediante microscopia electrónica	420
Los pre-tRNA sufren una modificación amplia en el núcleo	390	La microscopia inmunoelectrónica localiza proteínas a nivel ultraestructural	421
Los cuerpos nucleares son dominios nucleares funcionalmente especializados	391	La microscopia crioelectrónica permite la visualización de muestras sin fijación o tinción	421
Parte III Estructura y función celular		La microscopia electrónica de barrido de muestras recubiertas con metal revela características de la superficie	423
9 Cultivo, visualización y perturbación de células	397	9.4 Aislamiento y caracterización de los orgánulos celulares	424
9.1 Crecimiento de células en cultivo	398	Los orgánulos en la célula eucarionte	424
El cultivo de células animales requiere de un medio rico en nutrientes y superficies sólidas especiales	398	La rotura de las células libera sus orgánulos y otros contenidos	427
Los cultivos celulares primarios y las cepas de células tienen un tiempo de vida limitado	399	La centrifugación puede separar muchos tipos de orgánulos	427
Las células transformadas pueden crecer indefinidamente en cultivo	400	Los anticuerpos específicos de orgánulos son útiles en la preparación de orgánulos altamente purificados	429
La citometría de flujo separa diferentes tipos de células	400	La proteómica revela la composición proteica de los orgánulos	430
El crecimiento de células en cultivos bidimensionales y tridimensionales imita el ambiente in vivo	401	9.5 Perturbación de funciones celulares específicas	430
Las células híbridas llamadas hibridomas producen abundantes anticuerpos monoclonales	402	En biología celular se utilizan fármacos	430
9.2 Microscopia óptica: exploración de las estructuras celulares y visualización de las proteínas dentro de las células	404	Las exploraciones químicas pueden identificar nuevos fármacos específicos	430
La resolución del microscopio óptico es de alrededor de 0,2 μm	404	Los RNA de interferencia pequeños (siRNA) pueden inhibir la expresión de proteínas específicas	432
La microscopia de contraste de fase y la de contraste de interferencia diferencial visualizan células no teñidas	405	La búsqueda genómica utiliza siRNA en el nematodo <i>C. elegans</i>	434
Las muestras se deben fijar, seccionar y teñir para obtener imágenes con detalles subcelulares	408	EXPERIMENTO CLÁSICO 9.1 Separación de orgánulos	441
La microscopia por fluorescencia puede localizar y cuantificar moléculas específicas en las células vivas	408	10 Estructura de las biomembranas	443
Determinación de las concentraciones de Ca^{2+} e H^{+} intracelulares con colorantes fluorescentes sensibles a los iones	409	10.1 La bicapa lipídica: composición y organización estructural	445
La microscopia de inmunofluorescencia puede detectar proteínas específicas en células fijadas	409	Los fosfolípidos forman bicapas espontáneamente	445
La marcación con proteínas fluorescentes permite la visualización de proteínas específicas en células vivas	411	Las bicapas fosfolipídicas forman un compartimiento sellado que rodea un espacio acuoso interno	446
		Las biomembranas contienen tres clases principales de lípidos	448

La mayoría de los lípidos y muchas proteínas tienen movilidad lateral en las biomembranas	450
La composición de los lípidos influye en las propiedades físicas de las membranas	452
La composición de los lípidos es diferente en las lamelas exoplasmática y citosólica	453
El colesterol y los esfingolípidos se agrupan con proteínas específicas en los microdominios de la membrana	454
Las células almacenan los excesos de lípidos en gotas lipídicas	455

10.2 Las proteínas de membrana: estructura y funciones básicas 455

Las proteínas interactúan con las membranas de tres maneras distintas	456
La mayoría de las proteínas transmembranas tienen hélices α que abarcan la membrana	456
Láminas β múltiples en las porinas forman "barriles" que se expanden en la membrana	460
Los lípidos unidos mediante enlaces covalentes anclan algunas proteínas a las membranas	460
Todas las proteínas transmembrana y los glucolípidos están orientados de modo asimétrico en la bicapa	461
Los motivos de unión a lípidos ayudan a dirigir las proteínas periféricas hacia la membrana	462
Las proteínas pueden ser eliminadas de las membranas con detergentes o soluciones salinas concentradas	462

10.3 Los fosfolípidos, esfingolípidos y colesterol: síntesis y movimiento intracelular 464

Los ácidos grasos se ensamblan a partir de bloques estructurales de dos carbonos mediante varias enzimas importantes	465
Las proteínas citosólicas pequeñas facilitan el movimiento de los ácidos grasos	465
Los ácidos grasos son incorporados a los fosfolípidos principalmente en la membrana del RE	465
Las flipasas mueven los fosfolípidos de una lamela de la membrana a la opuesta	467
El colesterol se sintetiza mediante enzimas en el citosol y la membrana del RE	467
El colesterol y los fosfolípidos son transportados entre los orgánulos por diversos mecanismos	468

11 Transporte de iones y moléculas pequeñas a través de la membrana 473

11.1 Generalidades del transporte transmembrana 474

Solo los gases y las pequeñas moléculas sin carga atraviesan las membranas por difusión simple	474
Tres clases principales de proteínas de membrana transportan los iones y las moléculas a través de las biomembranas	475

11.2 Transporte facilitado de glucosa y agua 477

El transporte con uniportador es más rápido y más específico que la difusión simple	477
La baja K_m del uniportador GLUT1 permite que se transporte la glucosa hacia el interior de la mayoría de las células de mamífero	478
El genoma humano codifica una familia de proteínas GLUT transportadoras de azúcares	479
Las proteínas de transporte pueden estudiarse empleando membranas artificiales y células recombinantes	480
La presión osmótica provoca el movimiento del agua a través de las membranas	480
Las acuaporinas incrementan la permeabilidad al agua de las membranas celulares	481

11.3 Bombas impulsadas por ATP y ambiente iónico intracelular 483

Existen cuatro clases principales de bombas impulsadas por ATP	483
Las bombas iónicas impulsadas por ATP generan y mantienen gradientes iónicos a través de las membranas celulares	485
La relajación muscular depende de ATPasas de Ca^{2+} que bombean Ca^{2+} desde el citosol hacia el interior del retículo sarcoplasmático	486
El mecanismo de acción de la bomba de Ca^{2+} se conoce en detalle	486
La calmodulina regula las bombas de la membrana plasmática que controlan las concentraciones de Ca^{2+} en el citosol	487
Las ATPasa Na^+/K^+ mantiene las concentraciones intracelulares de Na^+ y K^+ en las células animales	489
Las ATPasas de H^+ clase V mantienen la acidez de los lisosomas y de las vacuolas	490
Las proteínas ABC exportan una gran variedad de fármacos y toxinas desde la célula	491
Ciertas proteínas ABC "voltean" fosfolípidos y otros sustratos liposolubles desde una lamela de la membrana hacia la otra	492
El regulador transmembrana ABC en la fibrosis quística (CFTR) es un canal de cloro, no una bomba	494

11.4 Canales iónicos sin compuerta y potencial de membrana en reposo 495

El movimiento selectivo de los iones crea un gradiente eléctrico a través de la membrana	495
El potencial de membrana en reposo en las células animales depende en gran medida del flujo de iones K^+ a través de los canales de K^+ abiertos	497
Los canales iónicos son selectivos para ciertos iones en virtud de un "filtro selectivo" molecular	497
La técnica de fijación de membrana permite la medición de los movimientos iónicos a través de canales individuales	499
Los canales iónicos nuevos pueden caracterizarse por una combinación de expresión de ovocitos y fijación de la membrana	501

11.5 Cotransporte por simportadores y antiportadores 502

El ingreso de Na^+ en las células de mamífero está termodinámicamente favorecido	502
---	-----

Los simportadores ligados a Na^+ permiten a las células animales importar glucosa y aminoácidos en contra de gradientes de concentración elevados	502	El transporte de electrones en las mitocondrias está acoplado al bombeo de protones	533
Un simportador bacteriano de Na^+ /aminoácido revela la forma en que opera el simportador	504	Flujo de electrones fluyen “cuesta abajo” a través de una serie de transportadores de electrones	534
Un antiportador de Na^+ ligado a Ca^{2+} regula la fuerza de la contracción del músculo cardíaco	504	Cuatro complejos multiproteína grandes acoplan el transporte de electrones al bombeo de protones a través de la membrana mitocondrial interna	535
Varios cotransportadores regulan el pH citosólico	505	Los potenciales de reducción de los transportadores electrónicos en la cadena de transporte de electrones favorecen el flujo de electrones del NADH hasta el O_2	539
Un antiportador aniónico es esencial para transportar CO_2 en los eritrocitos	506	Los complejos multiproteicos de la cadena de transporte de electrones se ensamblan en supercomplejos	540
Numerosas proteínas de transporte permiten que las vacuolas vegetales acumulen iones y metabolitos	507	Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son subproductos tóxicos del transporte de electrones que pueden dañar las células	541
11.6 Transporte transcelular	508	Los experimentos que usan complejos de la cadena de transporte de electrones purificados establecen la estequiometría del bombeo de protones	542
Se requieren múltiples proteínas de transporte para movilizar la glucosa y los aminoácidos a través de los epitelios	508	La fuerza protón-motriz en las mitocondrias se debe en gran parte a un gradiente de voltaje a través de la membrana mitocondrial interna	542
La terapia de rehidratación simple depende del gradiente osmótico creado por absorción de glucosa y Na^+	509	12.4 Aprovechamiento de la fuerza protón-motriz para sintetizar ATP	544
Las células parietales acidifican el contenido del estómago y mantienen un pH citosólico neutro	509	El mecanismo de la síntesis de ATP es compartido entre las bacterias, las mitocondrias y los cloroplastos	544
La reabsorción ósea requiere la función coordinada de una bomba protonica clase V y un canal proteico específico de cloro	510	La ATP sintasa incluye los complejos multiproteicos F_0 y F_1	546
EXPERIMENTO CLÁSICO 11.1 Tropezando con el transporte activo	515	La rotación de la subunidad $\text{F}_1\gamma$ conduce el movimiento de protones a través de F_0 , impulsando la síntesis de ATP	547
12 Energética celular	517	Múltiples protones deben pasar a través de la ATP sintasa para sintetizar un ATP	549
12.1 Primer paso de la captura de energía de la glucosa: glucólisis	519	La rotación del anillo c de F_0 es conducida por protones que fluyen a través de los canales transmembrana	549
Durante la glucólisis (etapa I), las enzimas citosólicas convierten la glucosa en piruvato	520	El intercambio ATP-ADP a través de la membrana mitocondrial interna es impulsado por la fuerza protón-motriz	550
La velocidad de glucólisis se ajusta para satisfacer las necesidades de ATP de la célula	520	La velocidad de oxidación mitocondrial normalmente depende de las concentraciones de ADP	551
La glucosa se fermenta cuando el oxígeno escasea	522	Las mitocondrias de grasa parda utilizan la fuerza protón-motriz para generar calor	551
12.2 Mitocondrias y ciclo del ácido cítrico	524	12.5 Fotosíntesis y pigmentos que absorben luz	552
Las mitocondrias son orgánulos dinámicos con dos membranas estructural y funcionalmente diferentes	524	Las membranas tilacoides en los cloroplastos son los sitios de la fotosíntesis en las plantas	553
En la primera parte de la etapa II, el piruvato es convertido a acetil CoA y a electrones de alta energía	526	Tres de las cuatro etapas en la fotosíntesis se producen solo durante la iluminación	553
En la segunda parte de la etapa II, el ciclo del ácido cítrico oxida el grupo acetilo en el acetil CoA a CO_2 y genera electrones de alta energía	527	Cada fotón de luz tiene una cantidad definida de energía	555
Los transportadores en la membrana mitocondrial interna ayudan a mantener las concentraciones citosólicas y de la matriz adecuadas de NAD^+ y NADH	529	El transporte de fotoelectrones desde el centro de reacción energizado de la clorofila a produce una separación de carga	556
La oxidación mitocondrial de los ácidos grasos genera ATP	529	Los complejos de captación de la luz y los complejos antenas internos incrementan la eficiencia de la fotosíntesis	557
La oxidación peroxisómica de los ácidos grasos no genera ATP	531	12.6 Análisis molecular de los fotosistemas	559
12.3 Cadena de transporte de electrones y generación de la fuerza protón-motriz	532	El único fotosistema de las bacterias púrpuras genera una fuerza protón-motriz pero no O_2	559
La oxidación de NADH y FADH_2 libera una cantidad significativa de energía	532		

Los cloroplastos contienen dos fotosistemas funcional y espacialmente distintos	561	Un oligosacárido preformado N-ligado se agrega a muchas proteínas en el RE rugoso	595
El flujo lineal de electrones a través de ambos fotosistemas de plantas, PSII y PSI, genera una fuerza protón-motriz, O_2 y NADPH	561	Las cadenas laterales de oligosacáridos pueden promover el plegamiento y la estabilidad de las glucoproteínas	596
Un complejo generador de oxígeno está localizado en la superficie del centro de reacción PSII	562	Los enlaces disulfuros son formados y reordenados por proteínas en la luz del RE	596
Múltiples mecanismos protegen a las células contra el daño de especies de oxígeno reactivas durante el transporte fotoelectrónico	563	Las chaperonas y otras proteínas del RE facilitan el plegamiento y el ensamblaje de las proteínas	598
El flujo cíclico de electrones a través de PSI genera una fuerza protón-motriz, pero no NADPH ni O_2	564	Las proteínas plegadas inadecuadamente en el RE inducen la expresión de catalizadores del plegamiento proteico	599
La actividad relativa de los fotosistemas I y II está regulada	565	Las proteínas no ensambladas o mal plegadas del RE con frecuencia son transportadas hacia el citosol para su degradación	600
12.7 Metabolismo del CO_2 durante la fotosíntesis	567	13.4 Direccionamiento de las proteínas hacia las mitocondrias y los cloroplastos	601
La rubisco fija CO_2 en el estroma del cloroplasto	567	Las secuencias señalización N-terminales anfipáticas dirigen las proteínas hacia la matriz mitocondrial	603
La síntesis de sacarosa usando CO_2 fijado se completa en el citosol	567	La importación de las proteínas hacia la mitocondria requiere receptores de la membrana externa y translocones en ambas membranas	603
La luz y la rubisco activasa estimulan la fijación del CO_2	569	Los estudios con proteínas quiméricas demuestran características importantes de la importación mitocondrial	605
La fotorrespiración compite con la fijación del carbono y está reducida en las plantas C_4	569	Se requiere un triple aporte de energía para incorporar proteínas a las mitocondrias	606
13 El movimiento de proteínas hacia la membrana y orgánulos	577	Múltiples señales y vías dirigen las proteínas hacia los compartimientos submitocondriales	606
13.1 Direccionamiento de proteínas hacia la membrana del RE y a través de ésta	579	El direccionamiento de las proteínas hacia el estroma de los cloroplastos es similar al de las proteínas de la matriz mitocondrial	610
Los experimentos de marcado con pulsos con membranas purificadas del RE demostraron que las proteínas secretadas atraviesan la membrana del RE	579	Las proteínas se direccionan hacia los tilacoides por mecanismos relacionados con la translocación a través de la membrana citoplasmática de las bacterias	610
Una secuencia señalización N-terminal hidrófoba dirige las proteínas secretadas nacientes hacia el RE	580	13.5 Direccionamiento de las proteínas a los peroxisomas	612
La translocación cotraduccional se inicia con dos proteínas que hidrolizan GTP	582	El receptor citosólico direcciona las proteínas con una secuencia SKL en el C-terminal hacia la matriz del peroxisoma	612
El paso de los polipéptidos crecientes a través del translocón es impulsado por la traducción	583	Las proteínas de la membrana y de la matriz del peroxisoma se incorporan por vías diferentes	613
La hidrólisis del ATP impulsa la translocación postraduccional de ciertas proteínas secretoras en las levaduras	584	13.6 Transporte hacia el interior y el exterior del núcleo	615
13.2 Inserción de las proteínas de membrana dentro del RE	587	Las moléculas grandes y pequeñas ingresan en el núcleo y salen de éste por medio de los complejos del poro nuclear	615
Varias clases topológicas de proteínas integrales de membrana se sintetizan en el RE	587	Los receptores de transporte nuclear escoltan a las proteínas que contienen señales de localización nuclear hacia el interior del núcleo	617
Las secuencias internas de detención de la transferencia y señalización-anclaje determinan la topología de las proteínas de paso único	588	Un segundo tipo de receptores de transporte nuclear escoltan las proteínas que contienen señales de exportación nuclear el exterior del núcleo	619
Las proteínas de paso múltiple tienen secuencias topogénicas internas múltiples	591	La mayoría de los mRNA se exportan desde el núcleo por un mecanismo independiente de Ran	619
Un ancla de fosfolípidos mantiene algunas proteínas de la superficie celular unidas a la membrana	592		
La topología de una proteína de membrana puede deducirse a menudo a partir de su secuencia	592		
13.3 Modificaciones, plegamiento y control de calidad de las proteínas en el RE	594		

14 Tránsito, secreción y endocitosis vesiculares

627

14.1 Técnicas para el estudio de la vía secretora

629

- El transporte de una proteína a través de la vía secretora puede ser ensayado en células vivas 629
- Los mutantes de levaduras definen etapas principales y muchos componentes del transporte de las vesículas 632
- Los ensayos de transporte libre de células permiten la disección de los pasos individuales en el transporte de vesículas 633

14.2 Mecanismos moleculares de formación y fusión de las vesículas

634

- El ensamblaje de una cubierta de proteína conduce a la formación de vesículas y la selección de moléculas carga 634
- Un conjunto conservado de proteínas GTPasas interruptoras controla el ensamblaje de diferentes cubiertas vesiculares 635
- Las secuencias diana de las proteínas carga hacen contactos moleculares específicos con las proteínas de la cubierta 636
- Las GTPasas Rab controlan el anclaje de las vesículas en las membranas diana 638
- Conjuntos apareados de proteínas SNARE median la fusión de vesículas con las membranas diana 639
- La disociación de los complejos SNARE después de la fusión de la membrana es impulsada por la hidrólisis del ATP 639

14.3 Etapas iniciales de la vía secretora

640

- Las vesículas COPII median el transporte desde el RE al aparato de Golgi 640
- Las vesículas COPI median el transporte retrógrado entre el aparato de Golgi y desde este hacia el RE 642
- El transporte anterógrado a través del aparato de Golgi ocurre por maduración de las cisternas 643

14.4 Etapas finales de la vía secretora

646

- Las vesículas cubiertas con clatrina o proteínas adaptadoras median el transporte desde el *trans*-Golgi 646
- Se requiere dinamina para que las vesículas de clatrina se desprendan 647
- Los residuos de manosa-6-fosfato dirigen proteínas solubles a los lisosomas 648
- El estudio de las enfermedades de almacenamiento lisosómico reveló componentes centrales de la vía de clasificación lisosómica 649
- La agregación de proteínas en el *trans*-Golgi puede funcionar para la clasificación de las proteínas en vesículas de secreción reguladas 651
- Algunas proteínas son sometidas a procesamiento proteolítico después de abandonar el *trans*-Golgi 651
- Varias vías clasifican las proteínas de membrana a la región apical o basolateral de las células polarizadas 652

14.5 Endocitosis mediada por receptor

654

- Las células captan lípidos de la sangre en forma de complejos lipoproteicos grandes bien definidos 656
- Los receptores para las lipoproteínas de baja densidad y otros ligandos contienen señales de clasificación que las marcan para la endocitosis 657
- El pH ácido de los endosomas tardíos provoca la disociación de la mayoría de los complejos receptor-ligando 658
- La vía endocítica entrega hierro a las células sin disociar el complejo receptor-transferrina en los endosomas 659

14.6 Direccionamiento de las proteínas de membrana y materiales citosólicos al lisosoma

661

- Los endosomas multivesiculados segregan proteínas de membrana destinadas a la membrana lisosómica desde las proteínas destinadas a la degradación lisosómica 661
- Los retrovirus brotan de la membrana plasmática por un proceso similar a la formación de endosomas multivesiculados 663

EXPERIMENTO CLÁSICO 14.1 Seguimiento de una proteína hacia el exterior de la célula

671

15 Transducción de la señal y receptores acoplados a proteína G

673

15.1 Transducción de la señal: desde la señal extracelular hasta la respuesta celular

675

- Las moléculas de señalización pueden actuar en forma local o a distancia 675
- La unión de moléculas de señalización activa receptores sobre células diana 676
- La proteincinasa y las fosfatasa se utilizan en prácticamente todas las vías de señalización 677
- Las proteínas de unión a GTP se utilizan con frecuencia en la transducción de señales como interruptores 678
- Los "segundos mensajeros" intracelulares transmiten y amplifican señales a partir de muchos receptores 679

15.2 Estudio de los receptores de la superficie celular y proteínas de transducen las señales

681

- La constante de disociación es una medida de la afinidad de un receptor con su ligando 681
- Los ensayos de unión se utilizan para detectar receptores y determinar sus afinidades y especificidad para ligandos 682
- La respuesta celular máxima a una molécula de señalización en general no requiere la activación de todos los receptores 683
- La sensibilidad de una célula a las señales externas está determinada por el número de receptores de superficie y sus afinidades por el ligando 684

Los receptores pueden purificarse mediante técnicas de afinidad	685	La relajación inducida por señal del músculo liso vascular está mediada por una vía de Ca^{2+} -óxido nítrico-cGMP-activada por la proteína cinasa G	711
Es posible utilizar ensayos de inmunoprecipitación y técnicas de afinidad para estudiar la actividad de proteínas de transducción de la señal	685	La integración de los segundos mensajeros Ca^{2+} y cAMP regula la glucogenólisis	711
15.3 Receptores acoplados a la proteína G: estructura y mecanismo	687	EXPERIMENTO CLÁSICO 15.1 La infancia de la transducción de señales: estimulación GTP de la síntesis de cAMP	719
Todos los receptores acoplados a proteína G comparten la misma estructura básica	687		
Los receptores acoplados a proteína G activados por ligando catalizan el intercambio de GTP por GDP en la subunidad α de una proteína G trimérica	689		
Diferentes proteínas G son activadas por distintos GPCR y, a su vez, regulan diversas proteínas efectoras	691		
15.4 Receptores acoplados a proteína G que regulan los canales iónicos	693	16 Vías de señalización que controlan la expresión génica	721
Los receptores de acetilcolina en el músculo cardíaco activan una proteína G que abre los canales de K^+	693		
La luz activa las rodopsinas acopladas a proteína G en las células bastones del ojo	694	16.1 Receptores que activan las tirosincinasa proteicas	723
La activación de la rodopsina por la luz lleva al cierre de los canales de cationes regulados por cGMP	695	Numerosos factores regulan la división celular y el metabolismo son ligandos para los receptores tirosincinasa	723
La amplificación de señal torna sumamente sensible la vía de transducción de señal de la rodopsina	696	La unión del ligando promueve la dimerización de un RTK y conduce a la activación de su cinasa intrínseca	724
La terminación rápida de la vía de transducción de señal de rodopsina es esencial para la visión aguda	696	Los homo-oligómeros y hetero-oligómeros de los receptores del factor de crecimiento epidérmico unen miembros de la superfamilia del factor de crecimiento epidérmico	726
Las células bastón se adaptan a las concentraciones variables de luz ambiental mediante tráfico intracelular de arrestina y transducina	698	Las citocinas influyen en el desarrollo de muchos tipos celulares	728
15.5 Receptores acoplados a proteína G que activan o inhiben la adenilciclase	699	La unión de una citosina a su receptor activa una tirosincinasa estrechamente unida a la proteína JAK	728
La adenilciclase es estimulada e inhibida por diferentes complejos ligando-receptor	699	Los residuos de fosfotirosina son superficies de unión para proteínas múltiples con dominios conservados	730
Estudios estructurales establecieron cómo $G_{\alpha s}$ • GTP se une y activa la adenilciclase	700	Dominios SH2 en acción: las cinasas JAK activan factores de transcripción STAT	730
El cAMP activa la proteína cinasa A mediante liberación de las subunidades inhibitorias	701	Múltiples mecanismos reprimen la señalización de los RTK y los receptores de citosinas	731
El metabolismo del glucógeno está regulado por la activación inducida por hormona de la proteína cinasa A	701	16.2 La vía Ras/MAP cinasa	734
La activación mediada por cAMP de la proteína cinasa A produce diversas respuestas en diferentes tipos de células	702	Ras, una proteína interruptora GTPasa, opera corriente abajo de la mayoría de los receptores RTK y citocinas	735
En la vía cAMP-proteína cinasa A se produce la amplificación de la señal	703	Estudios genéticos en <i>Drosophila</i> identificaron proteínas transductoras de la señal clave en la vía Ras/MAP cinasa	735
CREB conecta el cAMP y la proteína cinasa A a la activación de la transcripción génica	703	Los receptores tirosincinasa y las JAK cinasas están vinculados a Ras por proteínas adaptadoras	737
Las proteínas de anclaje localizan efectos del cAMP en regiones celulares específicas	704	La unión de Sos a la Ras inactiva provoca un cambio de conformación que desencadena el intercambio de GTP por GDP	738
Múltiples mecanismos regulan en forma negativa la señalización de la vía GPCR/cAMP/PCA	705	Las señales pasan de la Ras activada a una cascada de proteína cinasas y termina con la MAP cinasa	738
15.6 Receptores acoplados a proteína G que desencadenan elevaciones en el Ca^{2+} citosólico	707	La fosforilación de la MAP cinasa resulta en un cambio de conformación que incrementa su actividad catalítica y promueve la dimerización de la cinasa	740
Las fosfolipasas C activadas generan dos segundos mensajeros claves derivados del lípido de membrana fosfatidilinositol	708	La MAP cinasa regula la actividad de muchos factores de transcripción que controlan los genes de respuesta temprana	741
El complejo Ca^{2+} -calmodulina media muchas de las respuestas celulares de las señales externas	711	Los receptores acoplados a la proteína G transmiten señales a la MAP cinasa en las vías de apareamiento de las levaduras	742
		Las proteínas plataforma separan múltiples vías de las cinasas MAP en las células eucarióticas	744

16.3 Las vías de señalización de los fosfoinosítidos

- La fosfolipasa C γ es activada por algunos RTK y receptores de citocina 745
- El reclutamiento de la PI-3 cinasa a los receptores activados conduce a la síntesis de tres fosfatidilinositoles fosforilados 745
- La acumulación de fosfatos PI 3 en la membrana plasmática conduce a la activación de varias cinasas 746
- La proteincinasa B activada induce muchas respuestas celulares 747
- La vía cinasa PI-3 está regulada negativamente por la fosfatasa PTEN 747

16.4 Las serina-cinasas receptoras que activan Smad

- Tres proteínas receptoras separadas TGF- β participan en la unión de la TGF- β y activan la transducción de la señal 748
- Los receptores TGF- β activados fosforilan los factores de transcripción Smad 748
- Los bucles de retroalimentación negativa regulan la señalización TGF- β /Smad 749

16.5 Vías de señalización controladas por ubiquitinación: Wnt, Hedgehog y NF- κ B

- La señalización Wnt desencadena la liberación de un factor de transcripción desde un complejo proteico citosólico 752
- La señalización de Hedgehog alivia la represión de los genes diana 753
- La señalización Hedgehog en los vertebrados involucra los cilios primarios 755
- La degradación de una proteína inhibitoria activa el factor de transcripción NF- κ B 757
- Las cadenas de poliubiquitina sirven como plataformas que vinculan los receptores a proteínas corriente abajo en la vía NF- κ B 759

16.6 Vías de señalización controladas por la escisión proteica: Notch/Delta, SREBP

- Con la unión de Delta, el receptor Notch se escinde y libera un factor de transcripción componente 760
- Las metaloproteasas de la matriz catalizan la escisión de muchas proteínas de señalización desde la superficie celular 761
- La escisión inadecuada de la proteína precursora amiloide puede llevar a la enfermedad de Alzheimer 762
- La proteólisis intramembrana regulada de la SREBP libera un factor de transcripción que actúa para mantener los niveles de fosfolípidos y colesterol 762

16.7 Integración de las respuestas celulares a múltiples vías de señalización

- La insulina y el glucagón trabajan juntos para mantener un nivel estable de glucosa en la sangre 765
- Múltiples vías de transducción de las señales interactúan para regular la diferenciación de adipocitos a través del PPAR γ , el regulador maestro de la transcripción 767

17 Organización y movimiento celular I: microfilamentos 773

17.1 Microfilamentos y estructuras de actina 776

- La actina es antigua, abundante y muy conservada 776
- Los monómeros de G-actina se ensamblan en polímeros largos, helicoidales, de F-actina 777
- La F-actina tiene polaridad estructural y funcional 778

17.2 Dinámica de los filamentos de actina 779

- La polimerización de la actina in vitro procede en tres pasos 779
- Los filamentos de actina crecen más rápidamente en los extremos (+) que en los extremos (-) 779
- El recambio rotatorio de los filamentos de actina es acelerado por profilina y cofilina 782
- La timosina- β_4 proporciona un reservorio de actina para la polimerización 782
- Las proteínas del casquete bloquean el ensamblaje y el desensamblaje en los extremos de los filamentos de actina 783

17.3 Mecanismos de ensamblaje de los filamentos de actina 784

- Las forminas ensamblan filamentos no ramificados 784
- El complejo nuclear Arp2/3 nuclea el ensamblaje de los filamentos ramificados 785
- Los movimientos intracelulares pueden ser impulsados por la polimerización de la actina 787
- Los microfilamentos actúan en la endocitosis 788
- Las toxinas que perturban el depósito de monómeros de actina son útiles para estudiar la dinámica de esta 789

17.4 Organización de las estructuras celulares basadas en actina 790

- El entrecruzamiento de proteínas organiza los filamentos de actina en haces o redes 790
- Las proteínas adaptadoras vinculan los filamentos de actina con las membranas 791

17.5 Las miosinas: proteínas motoras basadas en actina 793

- Las miosinas tienen dominios cabeza, cuello y cola con diferentes funciones 794
- Las miosinas constituyen una gran familia de proteínas motoras mecanoquímicas 796
- Los cambios de conformación en la cabeza de la miosina acoplan la hidrólisis de ATP al movimiento 797
- Las cabezas de miosina dan pasos individuales a lo largo de los filamentos de actina 799
- La miosina V avanza mano sobre mano a lo largo de un filamento de actina 799

17.6 Movimientos impulsados por la miosina 801

Los filamentos gruesos de miosina y los filamentos delgados de actina del músculo esquelético se deslizan unos sobre otros durante la contracción	801
El músculo esquelético se estructura mediante proteínas de estabilización y andamiaje	802
La contracción de los músculos esqueléticos está regulada por el Ca^{2+} y las proteínas que unen actina	802
La actina y la miosina II forman haces contráctiles en las células no musculares	804
Los mecanismos dependientes de la miosina regulan la contracción en las células del músculo liso y en las no musculares	804
Las vesículas unidas a la miosina V son transportadas a lo largo de los filamentos de actina	805

17.7 Migración celular: mecanismos, señalización y quimiotaxis **808**

La migración celular coordina la generación de fuerzas con la adhesión celular y el reciclado de la membrana	808
Las pequeñas proteínas Cdc42, Rac y Rho que unen GTP controlan la organización de la actina	810
La migración celular implica la regulación coordinada de Cdc42, Rac y Rho	812
Las células en migración son dirigidas por moléculas quimiotácticas	813
Los gradientes quimiotácticos inducen niveles de fosfoinosítido alterados entre la parte anterior y la posterior de una célula	814

EXPERIMENTO CLÁSICO 17.1 Una mirada a la contracción muscular **819**

18 Organización y movimiento celular II: microtúbulos y filamentos intermedios **821**

18.1 Estructura y organización de los microtúbulos **821**

Las paredes de los microtúbulos son estructuras polarizadas, construidas a partir de dímeros de tubulina $\alpha\beta$	822
Los microtúbulos se ensamblan a partir de MTOC para generar organizaciones diversas	824

18.2 Dinámica de los microtúbulos **827**

Los microtúbulos individuales exhiben inestabilidad dinámica	827
El ensamblaje localizado y la "búsqueda y captura" ayudan a organizar los microtúbulos	829
Los fármacos que afectan la polimerización de la tubulina son útiles experimentalmente y para el tratamiento de enfermedades	829

18.3 Regulación de la estructura y dinámica de los microtúbulos **830**

Los microtúbulos están estabilizados por proteínas que se unen a los lados	830
Las +TIP regulan las propiedades y funciones del extremo (+) de los microtúbulos	831
Otras proteínas que se unen a los extremos regulan el desensamblaje de los microtúbulos	831

18.4 Cinasas y dineínas: proteínas motoras de los microtúbulos **833**

Los orgánulos de los axones son transportados a lo largo de los microtúbulos en ambas direcciones	833
La kinesina-1 impulsa el transporte anterógrado de vesículas a lo largo de los axones hacia el extremo (+) de los microtúbulos	834
Las kinesinas forman una gran familia de proteínas con funciones diversas	836
La kinesina-1 es un motor muy procesivo	837
Los motores de dineína transportan orgánulos hacia el extremo (-) de los microtúbulos	837
Las kinesinas y las dineínas cooperan en el transporte de orgánulos a través de la célula	841
Las modificaciones de la tubulina distinguen diferentes microtúbulos y sus motores de accesibilidades	842

18.5 Cilios y flagelos: estructuras de superficie construidas sobre microtúbulos **844**

Los cilios y flagelos eucariontes contienen largos dobletes de microtúbulos vinculados por puentes de motores de dineína	845
El batimiento de los cilios y flagelos se produce por el deslizamiento controlado de los microtúbulos de los dobletes externos	845
El transporte intraflagelar mueve el material hacia arriba y hacia abajo de los cilios y flagelos	846
Los cilios primarios son orgánulos sensoriales de las células en interfase	847
Los defectos en los cilios primarios son la base de muchas enfermedades	848

18.6 Mitosis **849**

Los centrosomas se duplican tempranamente en el ciclo celular en preparación para la mitosis	849
La mitosis puede dividirse en seis fases	849
El huso mitótico contiene tres clases de microtúbulos	851
La dinámica de los microtúbulos aumenta notablemente en la mitosis	851
Los ásteres mitóticos son separados por la kinesina-5 y orientados por la dineína	852
Los cromosomas son capturados y orientados durante la prometáfase	852
Los cromosomas duplicados son alineados por motores y por la dinámica de los microtúbulos	855
El complejo pasajero de los cromosomas regula la unión de los microtúbulos al cinetocoro	855
La anafase A mueve los cromosomas a los polos por acortamiento de los microtúbulos	856

La anafase B separa los polos por la acción combinada de las cinesinas y la dineína	857	Las cinasas dependientes de ciclinas son pequeñas proteincinasas que requieren una subunidad ciclina reguladora para su actividad	884
Existen mecanismos adicionales que contribuyen a la formación del huso	858	Las ciclinas determinan la actividad de las CDK	885
La citocinesis divide la célula duplicada en dos	858	Los niveles de ciclina están regulados por la degradación proteica	887
Las células vegetales reorganizan sus microtúbulos y construyen una nueva pared celular en la mitosis	859	Las CDK están reguladas por la fosforilación activadora e inhibidora	888
18.7 Filamentos intermedios	860	Los inhibidores de las CDK controlan la actividad ciclina-CDK	888
Los filamentos intermedios se ensamblan a partir de dímeros de subunidades	861	Alelos CDK especiales condujeron al descubrimiento de las funciones de las CDK	889
Las proteínas de los filamentos intermediarios se expresan de modo específico de los tejidos	862	19.4 Compromiso con el ciclo celular y replicación del DNA	890
Los filamentos intermedios son dinámicos	863	Las células están comprometidas irreversiblemente en la división celular en un punto del ciclo celular llamado START	890
Los defectos en las láminas y queratinas provocan muchas enfermedades	863	El factor de transcripción E2F y su regulador Rb controlan la transición de G1-fase S en los metazoarios	891
18.8 Coordinación y cooperación entre elementos del citoesqueleto	865	Las señales extracelulares gobiernan la entrada en el ciclo celular	892
Las proteínas asociadas a los filamentos intermedios contribuyen a la organización celular	865	La degradación de un inhibidor CDK de la fase S desencadena la replicación del DNA	892
Los microfilamentos y microtúbulos cooperan para transportar melanosomas	865	La replicación en cada origen es iniciada una vez y solo una vez durante el ciclo celular	894
Cdc42 coordina a microtúbulos y los microfilamentos durante la migración celular	866	Las hebras de DNA duplicadas se unen durante la replicación	896
El avance de los conos de crecimiento neural es coordinado por microfilamentos y microtúbulos	866	19.5 Entrada en mitosis	897
19 El ciclo celular de las células eucariontes	873	La activación precipitada de las CDK mitóticas inicia la mitosis	897
19.1 Generalidades del ciclo celular y su control	875	Las CDK mitóticas promueven la ruptura de la envoltura nuclear	898
El ciclo celular es una serie de eventos ordenados que llevan a la replicación celular	875	Las CDK mitóticas promueven la formación del huso mitótico	899
Las cinasas dependientes de ciclina controlan el ciclo celular de los eucariontes	876	La condensación cromosómica facilita la segregación	901
Varios principios clave gobiernan el ciclo celular	876	19.6 Fin de la mitosis: segregación de cromosomas y salida de la mitosis	903
19.2 Organismos modelo y métodos para estudiar el ciclo celular	877	La escisión de las cohesinas mediada por las separasas inicia la segregación de los cromosomas	903
Las levaduras en gemación y fisión son sistemas poderosos para el análisis genético del ciclo celular	877	El CPA/C actúa la separasa a través de la ubiquitinación de la securina	903
Los ovocitos de rana y los embriones iniciales facilitan la caracterización bioquímica del motor del ciclo celular	878	La inactivación de las CDK mitóticas desencadena la salida de la mitosis	904
Las moscas de la fruta revelan la interacción entre el desarrollo y el ciclo celular	880	La citocinesis crea dos células hijas	905
El estudio de los cultivos de tejidos celulares revela la regulación del ciclo celular en los mamíferos	881	19.7 Mecanismos de vigilancia en la regulación del ciclo celular	906
Los investigadores emplean múltiples herramientas para estudiar el ciclo celular	881	Las vías de puntos de control establecen dependencias y evitan errores en el ciclo celular	907
19.3 Regulación de la actividad de la cinasa dependiente de ciclina (CDK)	883	La vía del punto de control del crecimiento asegura que las células solo entran en el ciclo celular después de una suficiente biosíntesis de macromoléculas	907
		La respuesta al daño al DNA detiene el avance del ciclo celular cuando el DNA está comprometido	908

La vía del punto de control del ensamblaje del huso evita la segregación de cromosomas hasta que los estos se unen con precisión al huso mitótico	910	20.3 La matriz extracelular I: la lámina basal	945
La vía del punto de control de la posición del huso asegura que el núcleo se reparta adecuadamente entre las dos células hijas	912	La lámina basal proporciona un soporte para el ensamblaje de células en los tejidos	946
19.8 Meiosis: un tipo especial de división celular	913	La laminina, una proteína multiadhesiva de la matriz, ayuda a entrecruzar componentes de la membrana basal	947
Pistas intracelulares y extracelulares regulan la entrada a la meiosis	913	El colágeno tipo IV formador de láminas es el principal componente estructural de la lámina basal	947
Varios factores clave distinguen la meiosis de la mitosis	915	El perlecano, un proteoglicano, forma enlaces cruzados entre los componentes de la lámina basal y los receptores de la superficie celular	950
La recombinación y una subunidad de cohesina específica de la meiosis son necesarias para la segregación especializada de cromosomas en la meiosis I	915	20.4 Matriz extracelular II: tejido conectivo	951
La co-orientación de los cinetocoros hermanos es crítica para la segregación de los cromosomas en la meiosis I	918	Los colágenos fibrilares son las principales proteínas fibrosas en la MEC y en los tejidos conectivos	951
La replicación del DNA es inhibida entre dos divisiones meióticas	918	El colágeno fibrilar se secreta y se ensambla en fibrillas fuera de la célula	952
EXPERIMENTO CLÁSICO 19.1 Biología celular emerge del mar: el descubrimiento de las ciclinas	923	Los colágenos tipo I y II se asocian con colágenos no fibrilares para formar diversas estructuras	953
Parte IV Crecimiento celular y desarrollo		Los proteoglicanos y sus GAG constituyentes cumplen diversas funciones en la MEC	954
20 Integración de células en tejidos	925	El hialuronano resiste la compresión, facilita la migración celular y otorga al cartílago propiedades similares a las del gel	956
20.1 Adhesión entre células y entre célula y matriz: panorama general	927	Las fibronectinas interconectan células y matriz, influyen en la forma, la diferenciación y el movimiento celular	957
Las moléculas de adhesión celular se unen entre sí y a las proteínas intracelulares	927	Las fibras elásticas permiten que muchos tejidos sufran estiramientos y relajamientos repetidos	959
La matriz extracelular participa en la adhesión, la señalización y otras funciones	929	Las metaloproteasas remodelan y degradan la matriz extracelular	960
La evolución de moléculas de adhesión multifacéticas tornó posible la evolución de diversos tejidos animales	932	20.5 Interacciones adhesivas en células móviles y no móviles	961
20.2 Uniones entre células y entre célula y MEC y sus moléculas de adhesión	933	Las integrinas liberan señales entre las células y sus ambientes tridimensionales	961
Las células epiteliales tienen superficies apicales, laterales y basales distintas	933	La regulación de la adhesión mediada por integrinas y la señalización controlan el movimiento celular	962
Tres tipos de uniones median las interacciones entre célula y célula y entre célula y MEC	934	Las conexiones entre la MEC y el citoesqueleto son defectuosas en la distrofia muscular	964
Las cadherinas median las adhesiones en las uniones de adherencia y los desmosomas	935	Las IgCAM median la adhesión entre célula y célula en los tejidos neuronales y en otros	965
Las integrinas median las adhesiones entre célula y MEC, incluyendo aquellas en los hemidesmosomas de las células epiteliales	939	El movimiento de leucocitos hacia el interior de los tejidos está orquestado por una secuencia precisamente sincronizada de interacciones adhesivas	965
Las uniones estrechas sellan cavidades del cuerpo y restringen la difusión de los componentes de la membrana	940	20.6 Tejidos vegetales	967
Las uniones de hendidura compuestas por conexinas permiten que moléculas pequeñas pasen directamente entre células adyacentes	943	La pared celular vegetal es un laminado de fibrillas de celulosa en una matriz de glucoproteínas	968
		La pérdida de rigidez de la pared celular permite el crecimiento de la célula vegetal	969
		Los plasmodesmos conectan directamente los citosoles de células adyacentes en las plantas superiores	969
		Solo se han identificado unas pocas moléculas de adhesión en las plantas	970
		21 Células madre, asimetría celular y muerte celular	977

21.1 Desarrollo temprano de metazoos y células madre embrionarias	979	Las proteínas Bax y Bak proapoptóticas forman poros en la membrana mitocondrial externa	1013
La fecundación unifica el genoma	979	La liberación de citocromo c y las proteínas SMAC/DIABLO conduce a la formación del apoptosoma y la activación de las caspasas	1013
La segmentación del embrión de mamífero conduce a los primeros acontecimientos de diferenciación	979	Los factores tróficos inducen la inactivación de Bad, una proteína proapoptótica BH3-only	1013
La masa celular interna es la fuente de células madre embrionarias (ES)	981	La apoptosis de vertebrados está regulada por las proteínas proapoptóticas BH3-only que son activadas por estrés ambiental	1014
Múltiples factores controlan la pluripotencialidad de las células ES	983	El factor de necrosis tumoral y las señales mortales relativas estimulan el asesinato celular mediante la activación de caspasas	1015
La clonación animal demuestra que la diferenciación puede revertirse	984		
Las células somáticas pueden generar células madre pluripotenciales (iPS)	984		
21.2 Células madre y nichos en organismos multicelulares	986	22 Células nerviosas	1019
Las células madre originan tanto células madre como células diferenciadas	986	22.1 Neuronas y glía: componentes básicos del sistema nervioso	1020
Las células madre para diferentes tejidos ocupan nichos sustanciales	986	La información fluye a través de las neuronas desde las dendritas hacia los axones	1020
Las células germinales producen espermatozoides y ovocitos	987	La información se mueve a lo largo de los axones en forma de pulsos de flujo de iones llamados potenciales de acción	1021
Las células madre intestinales generan continuamente todas las células del epitelio intestinal	988	La información fluye neuronas vía sinapsis	1022
Las células madre neurales forman las células nerviosas y gliales en el sistema nervioso central	991	El sistema nervioso utiliza circuitos de señalización compuestos de múltiples neuronas	1022
Las células madre hematopoyéticas forman todas las células sanguíneas	993	Las células de la glía forman vainas de mielina y sostienen a las neuronas	1023
Los meristemos son nichos para las células madre en las plantas	995	22.2 Canales iónicos regulados por voltaje y la propagación de potenciales de acción	1025
21.3 Mecanismos de polaridad celular y división celular asimétrica	997	La magnitud de los potenciales de acción es cercana a E_{Na} y es causada por el flujo de Na^+ a través de los canales de Na^+ abiertos	1025
La polarización celular y la asimetría antes de la división celular siguen una jerarquía común	998	La apertura y el cierre secuencial de los canales de Na^+ y K^+ regulados por voltaje generan potenciales de acción	1025
El tráfico de la membrana polarizada permite a las levaduras crecer de manera asimétrica durante el apareamiento	998	Los potenciales de acción se propagan unidireccionalmente sin disminución	1029
Las proteínas Par dirigen la asimetría celular en el embrión nematodo	998	Las células nerviosas pueden conducir muchos potenciales de acción en ausencia de ATP	1029
Las proteínas Par y otros complejos de polaridad están involucrados en la polaridad de las células epiteliales	1001	Las α hélices S4 sensibles al voltaje se mueven en respuesta a la despolarización de la membrana	1030
La vía de la polaridad celular plana orienta las células dentro del epitelio	1002	El movimiento del segmento inactivador del canal hacia el poro abierto bloquea el flujo de iones	1032
Las proteínas Par también están involucradas en la división celular asimétrica de las células madre	1004	La mielinización incrementa la velocidad de conducción del impulso	1032
21.4 Muerte celular y su regulación	1006	Los potenciales de acción "saltan" de nodo a nodo en los axones mielinizados	1033
La muerte celular programada se produce a través de la apoptosis	1007	Dos tipos de glía producen vainas de mielina	1033
Las proteínas conservadas evolutivamente participan en la vía apoptótica	1007	22.3 Comunicación en las sinapsis	1036
Las caspasas amplifican la señal apoptótica inicial y destruyen las proteínas celulares clave	1009	La formación de las sinapsis requiere del ensamblado de estructuras pre y postsinápticas	1037
Las neurotrofinas estimulan la supervivencia de las neuronas	1010	Los neurotransmisores son transportados a las vesículas sinápticas por proteínas de antiporte ligadas a H^+	1038
Las mitocondrias cumplen una función central en la regulación de la apoptosis en las células de vertebrados	1011	Las vesículas sinápticas cargadas con neurotransmisores se localizan cerca de la membrana plasmática	1039

El flujo de Ca^{2+} hacia el interior dispara la liberación de neurotransmisores	1040
Una proteína de unión al calcio regula la fusión de vesículas sinápticas con la membrana plasmática	1041
Moscas mutantes carentes de dinamina no pueden reciclar las vesículas sinápticas	1042
La señalización en las sinapsis es terminada por la degradación o la recaptación de neurotransmisores	1042
La apertura de canales de cationes regulados por acetilcolina da lugar a la contracción muscular	1043
Las cinco subunidades en el receptor nicotínico de acetilcolina contribuyen al canal iónico	1044
Las células nerviosas toman una decisión todo o nada para generar un potencial de acción	1045
Las uniones de endidura de tipo gap permiten que ciertas neuronas se comuniquen directamente	1045

22.4 Percibiendo el entorno: tacto, dolor, gusto y olfato	1047
Los mecanorreceptores son canales catiónicos regulados	1047
Los receptores del dolor también son canales catiónicos regulados	1048
Los cinco sabores primarios son detectados por subconjuntos de células en cada yema gustativa	1048
Una gran cantidad de receptores detectan olores	1050
Cada neurona receptora olfativa expresa un único tipo de receptor de odorante	1051

23 Inmunología 1059

23.1 Generalidades de la defensa del huésped	1061
Los patógenos ingresan en el cuerpo mediante diferentes rutas y se replican en sitios distintos	1061
Los leucocitos circulan por el cuerpo y residen en los tejidos y ganglios linfáticos	1061
Los límites mecánicos y físicos forman una primera barrera de defensa contra los patógenos	1062
La inmunidad innata proporciona una segunda línea de defensa después de que las barreras mecánicas y químicas han sido cruzadas	1062
La inflamación es una respuesta compleja a las heridas que incluye la respuesta inmunitaria innata y la adaptativa	1065
La inmunidad adaptativa, tercera línea de defensa, tiene especificidad	1066

23.2 Inmunoglobulinas: estructura y función	1068
Las inmunoglobulinas han conservado una estructura que consiste en cadenas pesadas y ligeras	1068
Existen múltiples isotipos de inmunoglobulinas, cada uno con diferentes funciones	1068
Cada linfocito B produce una única inmunoglobulina, generada clonalmente	1069

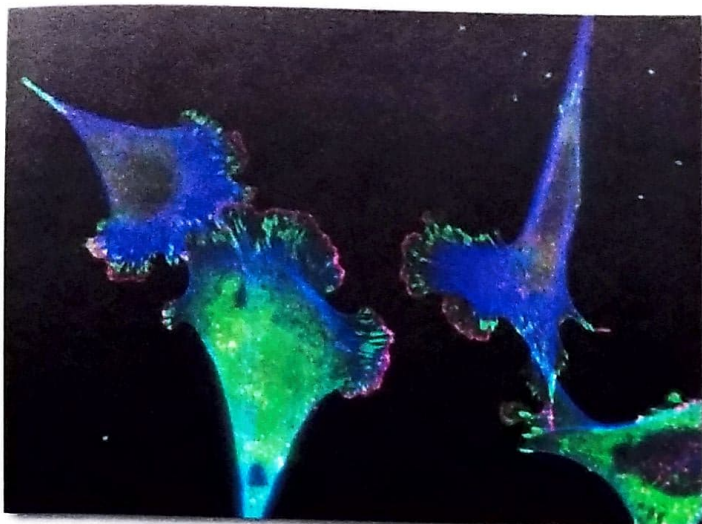
Los dominios de las inmunoglobulinas tienen pliegues característicos compuestos por dos láminas β estabilizadas por un puente (enlace) disulfuro	1071
La región constante de una inmunoglobulina determina sus propiedades funcionales	1072

23.3 Generación de diversidad de anticuerpos y desarrollo de linfocitos B	1073
Un gen de cadena ligera funcional requiere el ensamblaje de segmentos de genes V y J	1074
El reordenamiento del loci de cadena pesada involucra segmentos genéticos V, D y J	1075
La hiperpermutación somática permite la generación y la selección de anticuerpos con mejoras en las afinidades	1077
El desarrollo de linfocitos B requiere el aporte de un receptor del linfocito pre-B	1077
Durante una respuesta adaptativa, los linfocitos B dejan de producir Ig ligados a membranas y comienzan a secretar Ig	1079
Los linfocitos B pueden cambiar el isotipo de inmunoglobulina que sintetizan	1080

23.4 EL MHC y la presentación del antígeno	1081
El MHC determina la habilidad de dos individuos no emparentados de la misma especie de aceptar o rechazar injertos	1081
La actividad de matar de los linfocitos T citotóxicos está restringida por antígenos específicos y el MHC	1082
Los linfocitos T con diferentes propiedades funcionales son guiados por dos clases distintivas de moléculas MHC	1082
Las moléculas MHC se unen a antígenos peptídicos e interactúan con los receptores de linfocito T	1084
La presentación de antígenos es un proceso por el cual fragmentos de proteínas se unen a productos MHC y son adheridos a la superficie celular	1086
La vía MHC clase I presenta antígenos citosólicos	1087
La vía MHC clase II presenta antígenos entregados a la vía endocítica	1089

23.5 Linfocitos T: receptores y desarrollo	1092
La estructura del receptor de linfocito T se asemeja a la porción F(ab) de una inmunoglobulina	1093
Los genes TCR son reordenados de manera similar a los genes de inmunoglobulinas	1093
Los receptores de linfocitos T son muy diversos, con muchos de sus residuos variables codificados en las uniones entre los segmentos genéticos V, D y J	1095
La señalización a través de los receptores antígeno específico provoca la proliferación y diferenciación de los linfocitos T y B	1095
Los linfocitos T capaces de reconocer moléculas de MHC se desarrollan a través de selección negativa y positiva	1097
Los linfocitos T requieren dos tipos de señales para una activación completa	1098
Los linfocitos T citotóxicos portan el correceptor CD8 y están especializados en matar	1099

Los linfocitos T producen una colección de citocinas que proporcionan señales a otras células del sistema inmunitario	1099	Los virus que causan cáncer contienen oncogenes o activan protooncogenes celulares	1127
Los linfocitos T CD4 se dividen en tres grandes clases según su producción de citocinas y la expresión de marcadores de superficie	1100	Las mutaciones de pérdida de función en los genes supresores de tumores son oncogénicas	1128
Los leucocitos se mueven en respuesta a señales quimiotácticas que proporcionan las quimiocinas	1101	Las mutaciones heredadas en los genes supresores de tumores aumentan el riesgo de cáncer	1128
23.6 La colaboración de las células del sistema inmunitario en la respuesta adaptativa	1102	Los cambios epigenéticos pueden contribuir a la tumorigénesis	1129
Los receptores tipo Toll distinguen una gran variedad de patrones macromoleculares derivados de patógenos	1102	24.3 Cáncer y alteración de las vías reguladoras del crecimiento	1131
La activación por unión de los receptores tipo Toll conduce a la activación de células presentadoras de antígeno	1104	Los modelos en ratón del cáncer humano nos enseñan acerca del inicio de la enfermedad y su progresión	1131
La producción de anticuerpos de alta afinidad requiere la colaboración de los linfocitos T y linfocitos B	1104	Los receptores oncogénicos pueden promover la proliferación en ausencia de factores de crecimiento externos	1132
Las vacunas generan inmunidad protectora contra una variedad de patógenos	1105	Los activadores virales de los receptores de factores de crecimiento actúan como oncoproteínas	1133
EXPERIMENTO CLÁSICO 23.1 Dos genes se convierten en uno: reordenamiento somático de los genes de inmunoglobulinas	1111	Muchos oncogenes codifican proteínas de transducción de la señal constitutivamente activas	1134
24 Cáncer	1113	La producción inapropiada de factores de transcripción nucleares puede inducir la transformación	1136
		Las aberraciones en las vías de señalización que controlan el desarrollo están asociadas con muchos cánceres	1137
		La biología celular molecular está cambiando la manera en que se trata el cáncer	1138
24.1 Células tumorales y aparición del cáncer	1114	24.4 Cáncer y mutación de los reguladores de la división celular y de puntos de control	1140
Las células tumorales metastásicas son invasoras y pueden diseminarse	1115	Las mutaciones que promueven el paso no regulado de la fase G ₁ a la fase S son oncogénicas	1140
Los cánceres usualmente se originan en células proliferantes	1116	La pérdida de p53 suprime el punto de control de daño en el DNA	1141
El entorno local afecta la formación de tumores heterogéneos por células madre del cáncer	1117	Los genes apoptóticos pueden funcionar como protooncogenes de genes supresores de tumores	1143
El crecimiento de un tumor requiere de la formación de nuevos vasos sanguíneos	1117	Los micro-RNA son una nueva clase de factores oncogénicos	1143
Mutaciones específicas transforman células cultivadas en tumorales	1118	24.5 Carcinógenos y genes cuidadores en cáncer	1144
Varias líneas de evidencia apoyan un modelo de impacto múltiple de inducción del cáncer	1119	Los carcinógenos inducen cáncer por daño al DNA	1144
Mutaciones oncogénicas sucesivas pueden rastrearse en cánceres de colon	1121	Algunos carcinógenos han sido vinculados con cánceres específicos	1145
Las células de cáncer difieren de las células normales en formas fundamentales	1122	La pérdida de los sistemas de reparación del DNA puede producir cáncer	1146
El análisis de una micromatriz de DNA de los patrones de expresión puede revelar diferencias sutiles entre células tumorales	1123	La expresión de la telomerasa contribuye a la inmortalización de las células cancerosas	1148
24.2 La base genética del cáncer	1124	GLOSARIO G-1	
Las mutaciones de ganancia de función convierten a los protooncogenes en oncogenes	1125	ÍNDICE I-1	



Fibroblastos embrionarios de ratón cultivados teñidos para tres proteínas que forman el citoesqueleto. (Cortesía de Ana M. Pasapera, Clare M. Waterman)

Nada en biología tiene sentido, excepto a la luz de la evolución.

—Theodosius Dobzhansky
(ensayo en —*The American Biology Teacher* 35: 125–129, 1973)

La biología es una ciencia fundamentalmente diferente de la física o de la química, que tratan las propiedades inalterables de la materia, las cuales se pueden describir mediante ecuaciones matemáticas. Los sistemas biológicos siguen los supuestos de las reglas de la física y de la química, pero la biología es una ciencia histórica, ya que las formas y las estructuras del mundo viviente actual son el resultado de miles de millones de años de *evolución*. A través de la evolución, todos los organismos están relacionados en un árbol genealógico que se extiende desde organismos unicelulares primitivos que vivieron en el pasado distante hasta las diversas plantas, animales y microorganismos que viven en la era actual (Fig. 1-1, Cuadro 1-1). La gran visión de Charles Darwin (Fig. 1-2) fue el principio de selección natural: los organismos varían aleatoriamente y compiten dentro de su ambiente por los recursos. Sólo aquellos que sobreviven para reproducirse son capaces de transmitir sus rasgos genéticos.

A primera vista, el universo biológico parece ser sorprendentemente diverso: desde helechos diminutos hasta abetos altos, desde bacterias y

protozoarios unicelulares visibles sólo bajo un microscopio hasta animales multicelulares de todas las clases. Sin embargo, la desconcertante variedad de formas biológicas externas recubre una uniformidad poderosa: gracias a nuestro ancestro común, todos los sistemas biológicos están compuestos del mismo tipo de moléculas químicas y utilizan principios similares de organización a nivel celular. Aunque las clases básicas de moléculas biológicas se han conservado durante miles de millones de años de evolución, los patrones en los cuales son ensambladas para formar células y organismos han sufrido cambios considerables.

En la actualidad, se sabe que los **genes** están compuestos químicamente por **ácido desoxirribonucleico (DNA)**, y que, en última instancia, definen estructuras biológicas y mantienen la integración de la función celular. Muchos genes codifican **proteínas**: las moléculas primarias que forman estructuras de la célula y llevan a cabo actividades celulares. Las alteraciones en la estructura y organización de los genes, las **mutaciones**, proporcionan la variación aleatoria que puede alterar la estructura y la función biológica. Mientras que la gran mayoría de las mutaciones aleatorias no tiene efectos observables en la función de un gen o de una proteína, muchas son delecciones, y solo unas pocas confieren una ventaja evolutiva. En todos los organismos, las mutaciones en el DNA se producen constantemente; esto permite, en el transcurso del tiempo, que se produzcan alteraciones en las estructuras y

CONTENIDO

1.1	Las moléculas de la vida	4
1.2	Genomas, arquitectura y función celular	10

1.3	De las células a los tejidos: los organismos unicelulares y los metazoos se utilizan para las investigaciones de biología celular y molecular	16
-----	---	----

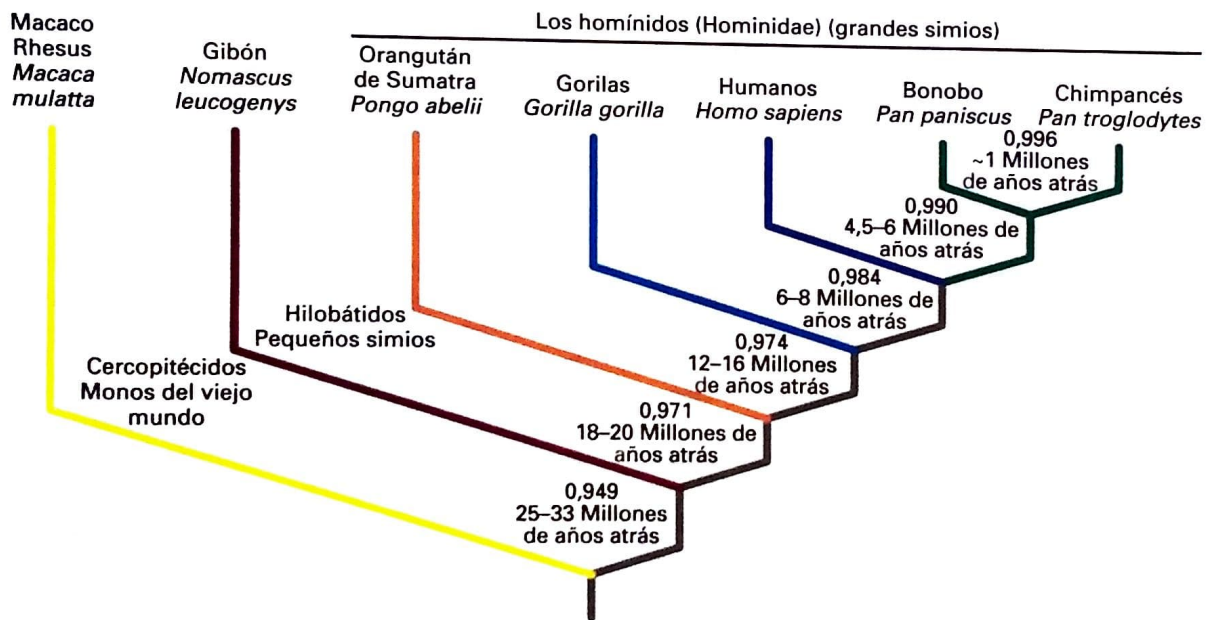
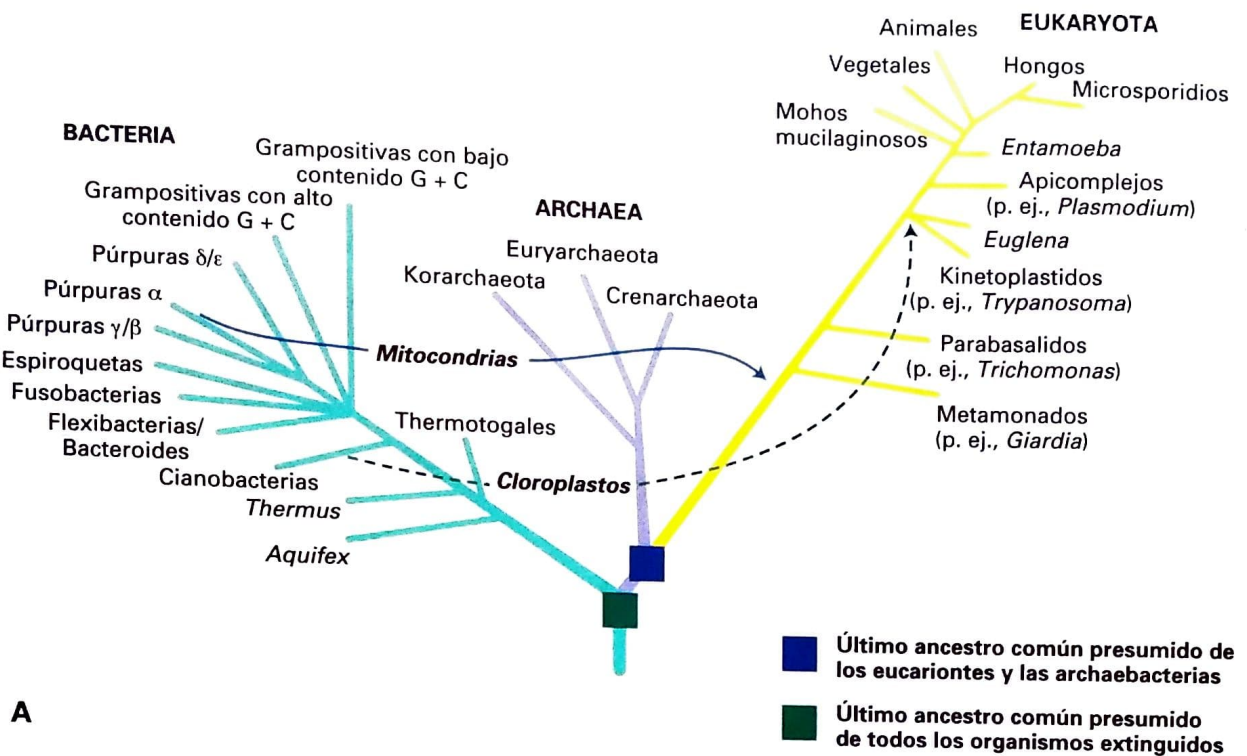


FIGURA 1.1 Todos los organismos vivos descienden de una célula ancestral común. (a) Todos los organismos, desde una bacteria simple hasta los mamíferos complejos, probablemente evolucionaron a partir de un ancestro unicelular común. Este árbol genealógico describe las relaciones evolutivas en tres linajes principales de organismos. La estructura del árbol se pudo establecer a partir de criterios morfológicos: las criaturas que se asemejan se las pusieron muy juntas. Más recientemente, se analizaron las secuencias de DNA y de proteínas encontradas en los organismos para enriquecer el criterio de asignación de las relaciones. A mayor similitud en estas secuencias macromoleculares, se cree que más estrechamente relacionados están los organismos. Los árboles basados en las comparaciones morfológicas y en el registro fósil suelen con-

cordar bien con aquellos basados en los datos moleculares. (b) La evolución de los grandes simios, de un pequeño mono y de un mono del Viejo Mundo con respecto a los seres humanos, según las estimaciones a partir de las divergencias entre sus secuencias de DNA genómicas. Se alinearon las secuencias de DNA de genomas completos, y se estimó la divergencia nucleotídica promedio en secuencias de DNA únicas. Las estimaciones de los diferentes tiempos en que divergieron las especies unas de otras, calculadas en millones de años, se indican en cada nodo; ~1 M. de años implica aproximadamente 1 millón de años o menos. (Parte [a] adaptado de J. R. Brown, 2005, "Universal tree of life", en la *Encyclopedia of Life Sciences*, Wiley InterScience [online]. Parte [b] adaptado de D. P. Locke y cols., 2011, *Nature* 469:529.)

Cuadro 1-1

Cronología de la evolución de la vida en la Tierra, determinada a partir del registro fósil

4 600 millones de años atrás	Se forma el planeta Tierra a partir del material que gira alrededor del Sol joven.
~3 900-2 500 millones de años atrás	Aparecen células que se asemejan a los procariontes. Estos primeros organismos son quimioautótrofos: usan dióxido de carbono como fuente de carbono y materiales inorgánicos oxidados para extraer energía.
3 500 millones de años atrás	Tiempo de vida del último ancestro universal; se produce la división entre bacterias y archaeas.
2 700 millones de años atrás	Evolucionan las cianobacterias fotosintetizadoras; usan el agua como un agente reductor, y se produce así el oxígeno como un producto de desecho.
1 850 millones de años atrás	Aparecen las células eucariontes unicelulares.
1 200 millones de años atrás	Evolucionan organismos multicelulares simples, mayormente consisten en colonias de células de complejidad limitada.
580-500 millones de años atrás	El filo más moderno de animales comienza a aparecer en el registro fósil durante la explosión Cámbrica.
535 millones de años atrás	Diversificaciones importantes en el océano: cordados, artrópodos (p. ej., trilobites, crustáceos), equinodermos, moluscos, braquiópodos, foraminíferos, radiolarios, etcétera.
485 millones de años atrás	Evolucionan los primeros vertebrados con huesos reales (peces sin mandíbula).
434 millones de años atrás	Surgen las primeras plantas primitivas en tierra.
225 millones de años atrás	Aparecen los primeros dinosaurios (prosaurópodos) y los peces teleósteos.
220 millones de años atrás	Los bosques de gimnospermas dominan la tierra; los herbívoros crecen a tamaños enormes.
215 millones de años atrás	Evolucionan los primeros mamíferos.
65,5 millones de años atrás	El acontecimiento de extinción del cretácico-terciario erradica alrededor de la mitad de todas las especies animales, incluyendo todas las de dinosaurios.
6,5 millones de años atrás	Evolucionan los primeros homínidos.
2 millones de años atrás	Aparecen los primeros miembros del género Homo.
350 mil años atrás	Aparecen los Neandertales.
200 mil años atrás	Los humanos anatómicamente modernos aparecen en África.
30 mil años atrás	Extinción de los Neandertales.

funciones celulares que puedan resultar ventajosas. En raras ocasiones, se crean estructuras nuevas; más a menudo, las estructuras antiguas se adaptan a las circunstancias nuevas. Mediante el reordenamiento o la multiplicación de componentes que evolucionaron previamente, es posible lograr un cambio más rápido en lugar de esperar que surja un enfoque por completo nuevo. Por ejemplo, en un organismo particular, un gen puede duplicarse de forma aleatoria; una copia del gen y su proteína codificada pueden retener la función original mientras que,

con el paso del tiempo, la segunda copia del gen muta de manera tal que su proteína adquiere una función levemente diferente o incluso una nueva función completamente distinta. La organización celular de los organismos cumple un papel fundamental en este proceso debido a que permite que surjan estos cambios mediante alteraciones pequeñas en las células que evolucionaron previamente y que les otorgan nuevas habilidades. El resultado es que organismos estrechamente relacionados tienen genes, proteínas y organización celular muy similares.



FIGURA 1-2 Charles Darwin (1809-1882). Cuatro años después de su viaje épico en el buque *HMS Beagle*, Darwin comenzó a formular en sus cuadernos privados su concepto de la selección natural, que sería publicado en el *Origen de las especies* (1859). (Walt Anderson/Visuals Unlimited, Inc.)

Los sistemas vivos, incluyendo el cuerpo humano, consisten en elementos tan estrechamente relacionados que estos por sí solos no pueden apreciarse por completo. Los organismos contienen órganos, los órganos están compuestos por tejidos, los tejidos consisten en células, las células se forman a partir de moléculas (Fig. 1-3). La unidad de los sistemas vivos está coordinada por muchos niveles de interrelación: las moléculas transportan mensajes desde un órgano hasta otro y de célula a célula, y los tejidos están delimitados e integrados en otros tejidos mediante moléculas secretadas por las células. En general, todos los niveles en los que nosotros fragmentamos los sistemas biológicos están interconectados.

Para aprender acerca de los sistemas biológicos, sin embargo, se debe examinar una porción pequeña de un sistema vivo a la vez. La biología de las células es un punto de inicio lógico debido a que un organismo puede visualizarse como células que interactúan, que son lo más parecido a una unidad biológica autónoma existente. El último ancestro común de toda la vida en la Tierra fue una célula, y, a nivel celular, toda la vida es notablemente similar. Todas las células utilizan las mismas unidades monoméricas moleculares, similares métodos de almacenamiento, mantenimiento y expresión de la información genética, y de procesos similares de metabolismo energético, transporte molecular, señalización, desarrollo y estructura.

En este capítulo, se introducen las características comunes de las células. Se comienza con una descripción breve de las principales moléculas

pequeñas y macromoléculas que se encuentran en los sistemas biológicos. Luego se analizarán los aspectos fundamentales de la estructura y la función celular que se conservan hasta los organismos actuales, y el uso de organismos procariontes o procariotas (organismos unicelulares sin un núcleo) para estudiar las moléculas básicas de la vida.

En la tercera sección, se analizarán la formación de tejidos a partir de células individuales y los tipos diversos de organismos unicelulares y multicelulares que se usan en las investigaciones de biología molecular celular.

Uno de los ejes de este capítulo es el DNA, ya que, en la actualidad, tenemos la secuencia completa de los genomas de más de un centenar de organismos y que han proporcionado información acerca de la evolución de los genes de los organismos. Estudios recientes, por ejemplo, indican que los genomas del ser humano y del chimpancé son alrededor de un 99% idénticos en secuencia, y es probable que los ancestros de estas especies hayan divergido a partir de un organismo simiesco hace entre 4,5 y 6 millones de años (véase la Fig. 1-1b). Esta conclusión es consistente con el registro fósil (véase el Cuadro 1-1). Los biólogos utilizan la evolución como una herramienta de investigación: si un gen y su proteína se han conservado en, por decir, todos los **metazoos** (animales multicelulares), pero no se encuentran en los organismos unicelulares, es probable que la proteína tenga una función importante en todos los metazoos y, por lo tanto, es más adecuado para la investigación. En la segunda y la tercera sección de este capítulo, se tratarán los motivos que llevan a los científicos a elegir organismos “modelo” unicelulares o multicelulares particulares para estudiar genes y proteínas específicas que son importantes para la función celular.

1.1 Las moléculas de la vida

Mientras que los polímeros grandes son el centro de la biología molecular celular, las moléculas pequeñas son el escenario sobre el cual se establecen todos los procesos. El agua, los iones inorgánicos y una amplia variedad de moléculas orgánicas relativamente pequeñas (Fig. 1-4) representan del 75 al 80% de todo el volumen celular. Estas moléculas pequeñas, incluyendo el agua, sirven como sustrato para muchas de las reacciones que ocurren dentro de la célula, incluyendo el metabolismo energético y la señalización celular. Las células adquieren estas moléculas pequeñas de diferentes formas. Los iones, el agua y muchas moléculas orgánicas pequeñas se importan a la célula (Cap. 11); otras moléculas pequeñas se sintetizan dentro de la célula, a menudo, mediante una serie de reacciones químicas.

Incluso en las estructuras de muchas moléculas pequeñas, como los azúcares, las vitaminas y los aminoácidos, se pueden ver las huellas de la evolución. Por ejemplo, todos los aminoácidos, excepto la glicina, tienen un átomo de carbono asimétrico, incluso solo el estereoisómero L, nunca el estereoisómero D, que se incorpora a las proteínas. De la misma manera, en las células invariablemente se encuentra el estereoisómero D de la glucosa, nunca su imagen especular, el estereoisómero L (véase la Fig. 1-4). En una etapa temprana de la evolución biológica, nuestro ancestro celular común adquirió la capacidad para catalizar reacciones con un estereoisómero en lugar de otro. Se desconoce cómo se produjeron estas selecciones; pero, en la actualidad, estas elecciones están inhabilitadas.

Una molécula pequeña muy importante y conservada universalmente es la **adenosina trifosfato (ATP)**, que almacena rápidamente la energía química disponible en dos de sus enlaces químicos (Fig. 1-5). Cuando uno de estos enlaces ricos en energía en el ATP se rompe, se forma **ADP (adenosina difosfato)**, la energía liberada puede aprovecharse para impulsar

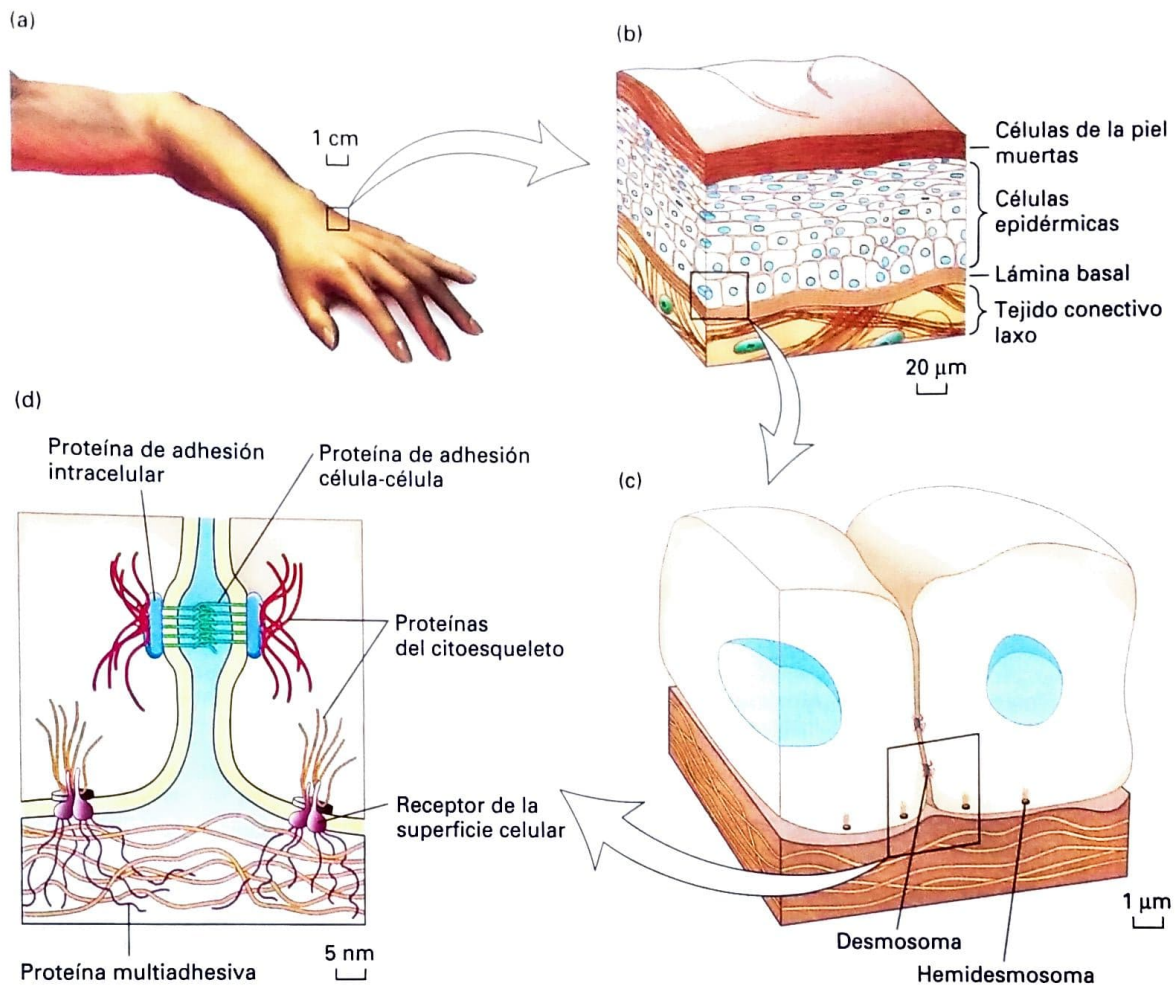


FIGURA 1-3 Los sistemas vivos como el cuerpo humano consisten en elementos estrechamente interrelacionados. (a) La superficie de nuestra mano está cubierta por un órgano vivo, la piel, que está compuesta por varias capas de tejido. (b) Una cubierta dura de células muertas de la piel protege el cuerpo de las lesiones, de las infecciones y de la deshidratación. Esta capa se renueva constantemente con células epidérmicas vivas, que también originan el pelo y el pelaje en los animales. Las capas más profundas del músculo y del tejido conectivo le otorgan a

la piel su tono y firmeza. (c) Los tejidos se forman a través de estructuras de adhesión subcelular (desmosomas y hemidesmosomas) que unen unas células con otras y a una capa subyacente de fibras de soporte. (d) En el centro de la adhesión celular, se encuentran sus componentes estructurales: moléculas de fosfolípidos que constituyen la membrana superficial celular, y moléculas de proteínas grandes. Las moléculas de proteína que atraviesan la membrana celular suelen formar enlaces fuertes con fibras internas y externas que están compuestas de múltiples proteínas.

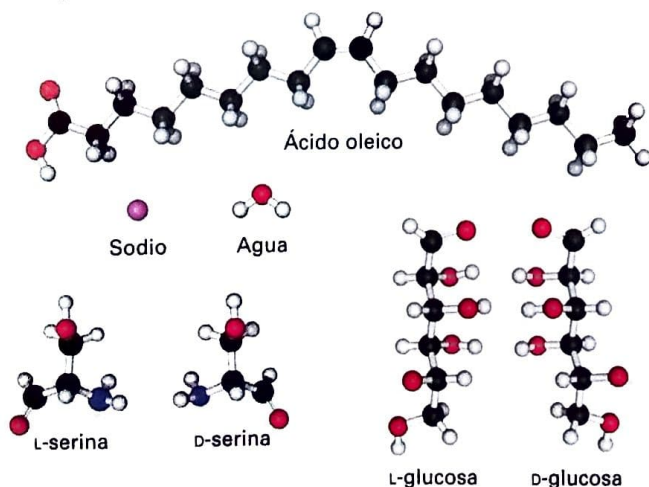


FIGURA 1-4 Algunas de las muchas moléculas pequeñas que se encuentran en las células. Solo las formas L de los aminoácidos, como la serina, se incorporan a las proteínas, no sus imágenes especulares D; solo la forma D de la glucosa, no su imagen especular L, puede ser metabolizada a dióxido de carbono y agua.

un proceso que requiere energía como la contracción muscular o la biosíntesis de proteína. Para obtener energía para sintetizar ATP, todas las células degradan moléculas de alimentos. Por ejemplo, cuando se degrada azúcar a dióxido de carbono y agua, la energía almacenada en los enlaces químicos de la molécula de azúcar se libera y gran parte puede ser “capturada” en enlaces ricos en energía en el ATP (Cap. 12). Todas las células bacterianas, vegetales y animales pueden sintetizar ATP mediante este proceso. Además, las plantas y otros pocos organismos pueden aprovechar la energía lumínica para formar ATP mediante la **fotosíntesis**.

Otras moléculas pequeñas (p. ej., las hormonas y los factores de crecimiento) actúan como señales que dirigen las actividades de la célula (Caps. 15 y 16), y las células nerviosas se comunican unas con otras mediante la liberación y la detección de ciertas moléculas de señalización (Cap. 22). El poderoso efecto en nuestro cuerpo de un evento aterrador proviene de la inundación instantánea de nuestro cuerpo con la pequeña molécula de la hormona adrenalina, que moviliza la respuesta de “lucha o huida”.

Ciertas moléculas pequeñas (**monómeros**) se pueden unir para formar **polímeros**, también denominados “**macromoléculas**”, mediante la repetición de un único tipo de reacción de unión química covalente

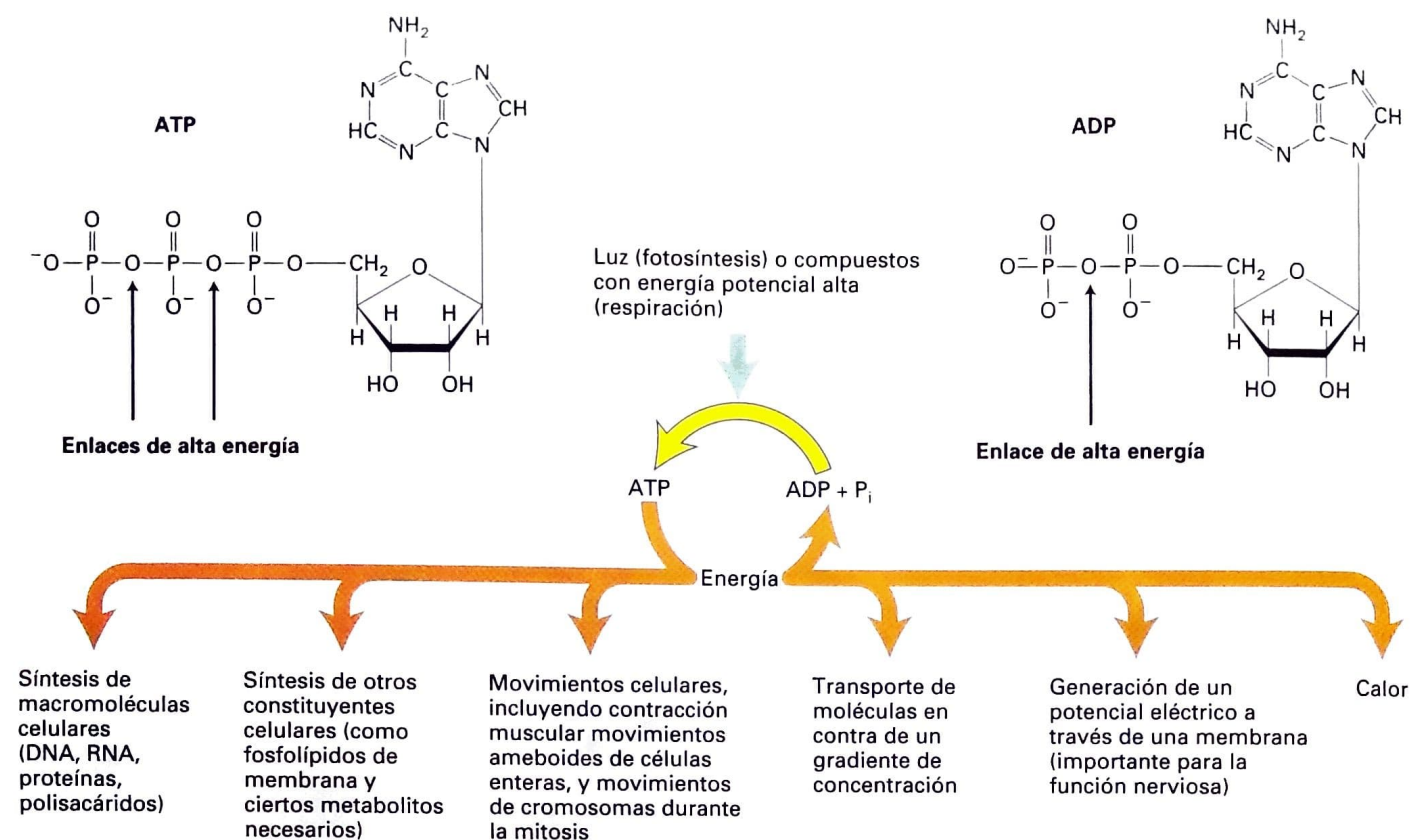


FIGURA 1-5 El adenosín trifosfato (ATP) es la molécula más común usada por las células para capturar y transferir energía. El ATP suele estar formado de adenosina difosfato (ADP) y fosfato inorgánico (P_i) mediante la fotosíntesis en

las plantas, y por la degradación de azúcares y grasas en la mayoría de las células. La energía liberada por el desdoblamiento (hidrólisis) de P_i del ATP conduce hacia muchos procesos celulares.

(véase la Fig. 2-1). Las células producen tres tipos de macromoléculas grandes: polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos (Fig. 1-6). Los azúcares, por ejemplo, son los monómeros usados para formar polisacáridos. Diferentes polímeros de D-glucosa forman el componente celulosa de las paredes celulares vegetales y el glucógeno, una forma de almacenamiento de la glucosa que se encuentra en el hígado y en los músculos. La célula es cuidadosa en proporcionar la mezcla adecuada de moléculas pequeñas necesarias como precursoras para la síntesis de las macromoléculas.

Las proteínas dan estructura a las células y llevan a cabo la mayoría de las tareas celulares

Las proteínas son las macromoléculas celulares más abundantes y versátiles desde el punto de vista funcional. Las células ensartan 20 **aminoácidos** diferentes en una cadena lineal para formar proteínas (véase la Fig. 2-14), que suelen extenderse desde 100 hasta 1 000 aminoácidos. Durante su polimerización, la cadena lineal de aminoácidos se pliega en una forma compleja que le otorga una estructura tridimensional distintiva y una función a cada proteína (véase la Fig. 1-16). Los seres humanos obtienen aminoácidos ya sea sintetizándolos a partir de otras moléculas o por degradación de proteínas que ingerimos.

Las proteínas cumplen una variedad de funciones en la célula. Muchas proteínas son **enzimas**, que aceleran (catalizan) reacciones químicas que involucran moléculas pequeñas o macromoléculas (Cap. 3). Ciertas proteínas catalizan pasos en la síntesis de proteínas; otras catalizan la síntesis de otras macromoléculas como el DNA y el RNA. Las **proteínas del citoesqueleto** sirven como componentes estructurales de

una célula, por ejemplo, al formar un esqueleto interno; otras impulsan el movimiento de estructuras subcelulares como los cromosomas, e incluso de células enteras, mediante el uso de la energía almacenada en los enlaces químicos del ATP (Caps. 17 y 18). Otras proteínas unen células adyacentes o forman parte de la matriz extracelular (véase la Fig. 1-3). Las proteínas pueden ser sensores que cambian su forma con la temperatura, las concentraciones de iones o de otras propiedades del cambio celular. Muchas proteínas de la superficie celular que están embebidas en la membrana (plasmática) importan y exportan una variedad de moléculas pequeñas e iones (Cap. 11). Algunas proteínas, como la insulina, son hormonas; otras son receptores de hormonas que unen sus proteínas diana o blanco y luego generan una señal que regula un aspecto específico de la función celular. Otras clases importantes de proteínas unen segmentos específicos de DNA, las cuales activan o desactivan genes (Cap. 7). De hecho, mucho de la biología celular y molecular consiste en el estudio de la función de las proteínas específicas en tipos celulares específicos.

¿Cómo pueden 20 aminoácidos formar todas las proteínas diferentes necesarias para llevar a cabo estas tareas tan variadas? A primera vista, parece imposible. Pero si una proteína "típica" tiene alrededor de 400 aminoácidos de longitud, existen 20⁴⁰⁰ secuencias de aminoácidos diferentes posibles. Incluso si se asume que muchas de estas podrían ser funcionalmente equivalentes, inestables o de algún modo desechables, el número de proteínas posibles es astronómico.

A continuación, podríamos preguntarnos cuántas moléculas de proteínas necesita una célula para funcionar y mantenerse. Para estimar este número, tomemos una célula eucariote o eucariota típica (una célula

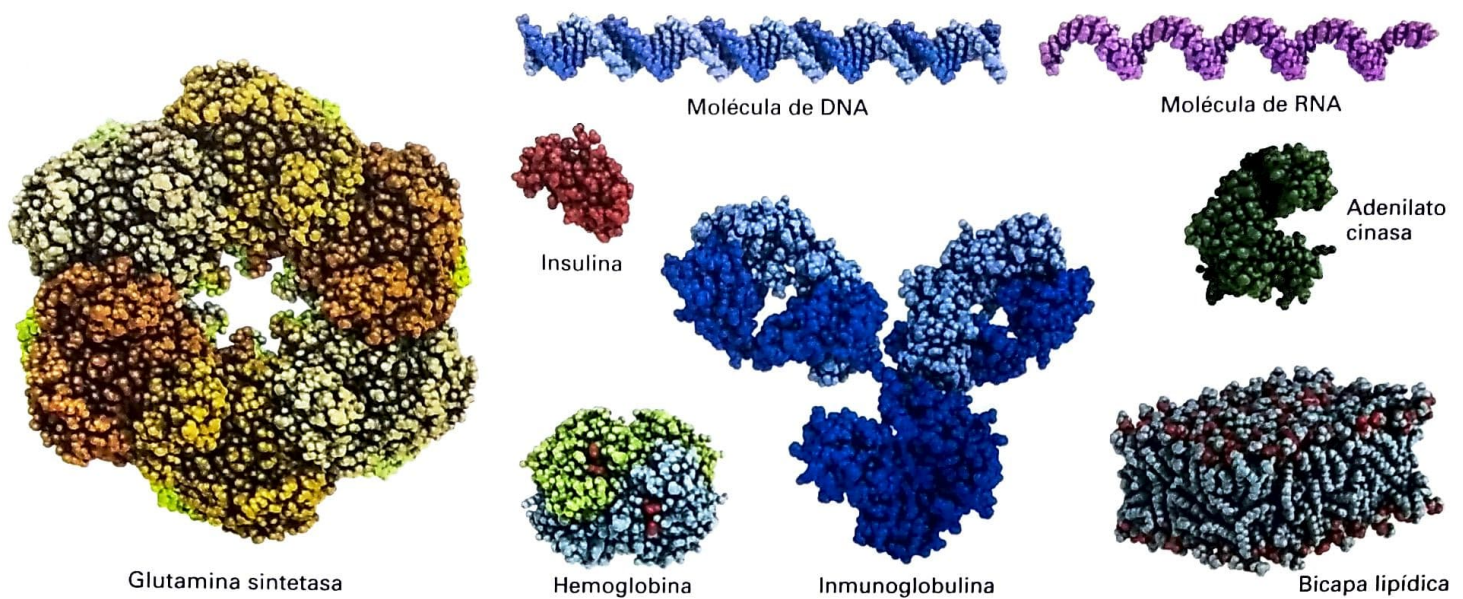


FIGURA 1-6 Modelos de algunas proteínas representativas dibujadas a la misma escala y comparadas con una porción pequeña de una lámina de bicapa lipídica, con una molécula de DNA y con una molécula de RNA. Cada proteína tiene una forma tridimensional definida, que se mantie-

ne unida por numerosos enlaces químicos. Las proteínas ilustradas incluyen enzimas (glutamina sintetasa y adenilato cinasa), un anticuerpo (inmunoglobulina), una hormona (insulina) y un transportador de oxígeno en la sangre (hemoglobina).

que contiene un núcleo), como un hepatocito (célula hepática). Esta célula, aproximadamente un cubo de $15\ \mu\text{m}$ ($0,0015\ \text{cm}$) de lado, tiene un volumen de $3,4 \times 10^{-9}\ \text{cm}^3$ (o mililitros, mL). Si se asume una densidad celular de $1,03\ \text{g/mL}$, la célula podría pesar $3,5 \times 10^{-9}$ gramos. Puesto que las proteínas representan aproximadamente 20% del peso de una célula, el peso total de la proteína celular es $7 \times 10^{-10}\ \text{g}$. Una proteína promedio tiene un peso molecular de $52,700\ \text{g/mol}$; se puede calcular el número total de moléculas de proteína por hepatocito como alrededor de $7,9 \times 10^9$ del peso de la proteína total y del número de Avogadro: el número de moléculas por mol de cualquier compuesto químico ($6,02 \times 10^{23}$).

Para avanzar con este cálculo un poco más, considere que un hepatocito contiene alrededor de 10 000 proteínas diferentes; así, cada célula contendría en promedio casi un millón de moléculas de cada tipo de proteína. En efecto, la abundancia de diferentes proteínas varía considerablemente, desde la proteína receptora que une insulina, bastante rara (alrededor de 20 000 moléculas por célula) hasta la abundante proteína estructural actina (5×10^8 moléculas por célula). Cada célula regula rigurosamente el nivel de cada proteína de manera tal que cada una está presente en la cantidad apropiada para su funcionamiento celular, como se detalla en los Caps. 7 y 8.

Los ácidos nucleicos contienen información codificada para la síntesis de proteínas en el momento y lugar oportunos

La macromolécula que acapara la mayor atención pública es el ácido desoxirribonucleico (DNA), cuyas propiedades funcionales la convirtieron en la “molécula maestra” de la célula. La estructura tridimensional del DNA, propuesta por primera vez por James D. Watson y Francis H. C. Crick hace alrededor de 60 años (Fig. 1-7), consiste en dos hebras helicoidales largas que están enrolladas alrededor de un eje común para formar una **doble hélice** (Fig. 1-8). La estructura de doble hélice del DNA, una de las construcciones más maravillosas de la naturaleza, es

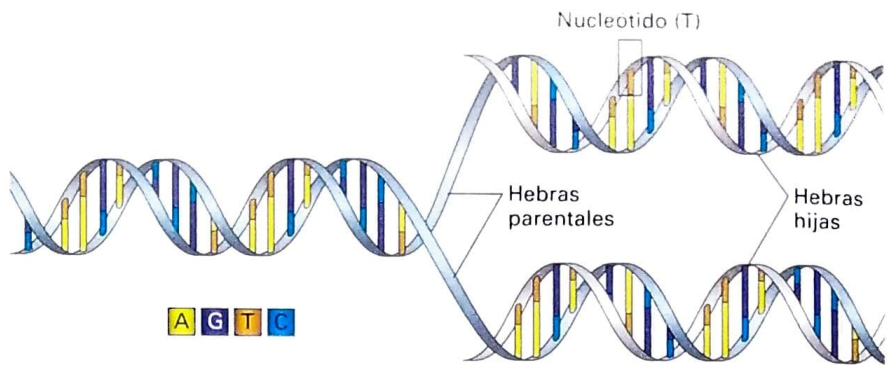
crucial para el fenómeno de herencia: la transferencia de características determinadas genéticamente de una generación a la siguiente.

Las hebras del DNA están compuestas de monómeros que se denominan **nucleótidos**; a menudo suelen referirse como *bases* debido a que sus estructuras contienen bases orgánicas cíclicas (Cap. 4). Cuatro



FIGURA 1-7 James D. Watson (izquierda) y Francis H. C. Crick (derecha) con el modelo de doble hélice de DNA que construyeron en 1952-1953. Su modelo en definitiva resultó ser correcto en todos sus aspectos esenciales. (A. Barrington Brown/Science Photo Researcher. De J. D. Watson, 1968, *The double helix*, Atheneum, Copyright 1968, p. 215; Cortesía de A. C. Barrington Brown.)

FIGURA 1-8 El DNA consiste en dos hebras complementarias enrolladas una alrededor de la otra para formar una doble hélice. La doble hélice está estabilizada por enlaces de hidrógeno entre las bases A y T y entre las bases C y G. Durante la replicación, las dos hebras se desenrollan y se usan como moldes para producir hebras complementarias. El resultado es dos copias de la doble hélice original, cada una contiene una de las hebras originales y una hebra (complementaria) hija nueva.



nucleótidos –abreviados A, T, C y G– se unen para formar una hebra de DNA, con la parte de las bases que se proyecta hacia el interior del esqueleto de la hebra. Las dos hebras se unen a través de las bases y se

enrollan para formar una doble hélice. Cada doble hélice de DNA tiene una construcción simple: siempre que en una hebra se encuentre una A, la otra hebra tiene una T, y cada C se aparea con una G (véase la Fig.

Cuadro 1-2 **Tamaños de los genomas de organismos usados en la investigación en biología molecular celular que han sido completamente secuenciados**

Bacteria	Pares de bases (millones)	Proteínas codificadas	Cromosomas	Referencia
<i>Mycoplasma genitalum</i>	0,58	482	1	A
<i>Helicobacter pylori</i>	1,67	1 587	1	A
<i>Haemophilus influenza</i>	1,83	1 737	1	A
<i>Escherichia coli</i>	4,64	4 289	1	A
<i>Bacillus subtilis</i>	4,22	4 245	1	A
Archaea				
<i>Methanococcus jannaschii</i>	1,74	1 785	3	A
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	2,99	2 960	1	A
Eucariontes				
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12,16	5 885	16	B
<i>Drosophila melanogaster</i>	168	13 781	4	C
<i>Caenorhabditis elegans</i>	100	20 424	6	D
<i>Danio rerio</i>	1 505	19 929	25	C
<i>Gallus gallus</i> (gallo)	1 050	14 923	39	C
<i>Mus musculus</i>	3 421	22 085	20	C
<i>Homo sapiens</i>	3 279	21 077	23	C
<i>Arabidopsis thaliana</i>	135	27 416	5	E

Cuadro cortesía del Dr. Fran Leitter. Fuentes: A, <http://cmr.jcvi.org/cgi-bin/CMR/shared/Genomes.cgi>; B, <http://www.yeastgenome.org/>; C, <http://uswest.ensembl.org/info/about/species.html>; D, <http://wiki.wormbase.org/index.php/WS222>; E, http://www.arabidopsis.org/portals/genAnnotation/gene_structural_annotation_data.jsp.

1-8). Este apareamiento **complementario** de las dos hebras es tan fuerte que si se separan las hebras complementarias, se vuelven a aparear de forma espontánea en condiciones adecuadas de concentración salina y de temperatura. Tal **hibridación del ácido nucleico** es extremadamente útil para la detección de una hebra mediante el uso de la otra, como se verá en el Cap. 5.

La información genética que contiene el DNA reside en su secuencia: en el ordenamiento lineal de los nucleótidos a lo largo de la hebra. Segmentos específicos de DNA, denominados “genes”, contienen instrucciones para sintetizar proteínas específicas. Los genes suelen contener dos partes: la *región codificante* determina la secuencia aminoácida de una proteína; la *región reguladora* une proteínas específicas y controla cuándo y en qué células se sintetiza la proteína.

La mayoría de las bacterias tiene unos pocos cientos de genes; las levaduras y otros eucariontes unicelulares tienen alrededor de 5 000. Los seres humanos y otros metazoos tienen entre 13 000 y 23 000, mientras que muchas plantas, como la *Arabidopsis*, tienen más (Cuadro 1-2). Como se analizó anteriormente en este capítulo, muchos genes bacterianos codifican proteínas que se conservan a través de todos los organismos vivos. Estas proteínas catalizan reacciones que se producen de manera universal, como el metabolismo de la glucosa y la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas. Los estudios en las células bacterianas han revelado conocimientos profundos acerca de estos procesos básicos de la vida. De modo similar, muchos genes en los eucariontes unicelulares, como las levaduras, codifican proteínas que se conservan a través de todos los eucariontes. A continuación, se verá cómo se han usado las levaduras para estudiar procesos, como la división celular, que han revelado conocimientos profundos sobre enfermedades humanas como el cáncer.

Las células utilizan dos procesos en serie para convertir la información codificada en el DNA en proteínas (Fig. 1-9). En el primero, denominado **transcripción**, la región codificante de un gen se copia a un **ácido ribonucleico (RNA)** de hebra simple cuya secuencia es la misma que una de las dos hebras del DNA de doble hebra. Una enzima grande, la **RNA polimerasa**, cataliza la unión de los nucleótidos en una cadena de RNA usando al DNA como un molde. En las células eucariontes, el producto de RNA inicial es procesado para dar una molécula de **RNA mensajero (mRNA)**, más pequeña, que se mueve hacia fuera del núcleo hasta el citoplasma. Aquí, el **ribosoma**, un complejo molecular enorme compuesto tanto de RNA como de proteínas, lleva a cabo el segundo proceso, llamado **traducción**. Durante la traducción, el ribosoma se ensambla y une los aminoácidos en el orden preciso dictado por la secuencia de mRNA de acuerdo con el **código genético** casi universal. En el Capítulo 4, se analizan en detalle los componentes celulares que llevan a cabo la transcripción y la traducción.

Además de su función en la transferencia de la información del núcleo al citoplasma, el RNA sirve como componente para construir un complejo molecular. Por ejemplo, el ribosoma se forma a partir de cuatro cadenas de RNA que se unen a más de 50 proteínas para realizar una lectura notablemente precisa y eficiente del mRNA y sintetizar así la proteína. Mientras que la mayoría de las reacciones químicas en las células son catalizadas por proteínas, unas pocas, como la formación del enlace peptídico que conecta los aminoácidos con las proteínas, son catalizadas por las moléculas de RNA.

Antes de que se secuenciara el genoma humano completo parecía que solo alrededor del 5% del DNA humano codificaba para proteínas, y durante muchos años la mayoría del genoma humano fue considerado ¡“DNA basura”! Sin embargo, hace algunos años, hemos aprendido en realidad que mucho de ese DNA basura es copiado a miles de mo-

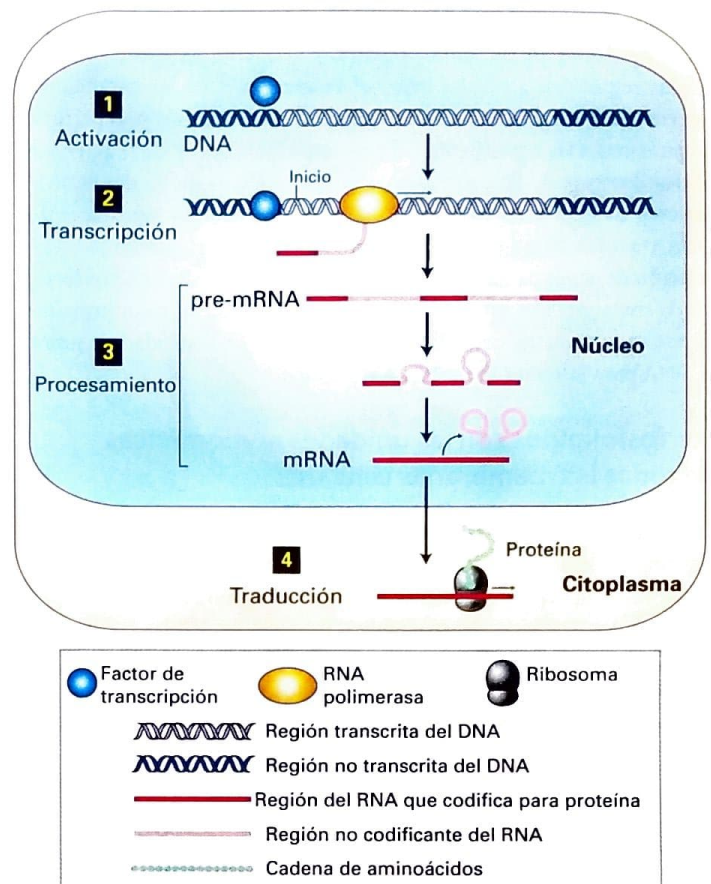


FIGURA 1-9 La información codificada en el DNA es convertida a las secuencias aminoácidas de las proteínas mediante un proceso de múltiples pasos. Paso **1**: los factores de transcripción se unen a las regiones reguladoras de los genes específicos que controlan, y los activan. Paso **2**: a continuación del ensamblaje de un complejo de iniciación multiproteico unido al DNA, la RNA polimerasa comienza la transcripción de un gen activado en una localización específica: el sitio de iniciación. La polimerasa se mueve a lo largo del DNA y une los nucleótidos en un transcrito de pre-mRNA de hebra simple usando una de las hebras de DNA como un molde. Paso **3**: el transcrito es procesado para eliminar las secuencias no codificantes. Paso **4**: en una célula eucarionte, el RNA mensajero maduro (mRNA) se mueve hacia el citoplasma, donde se une a ribosomas que leen su secuencia y ensamblan una proteína mediante la unión química de aminoácidos en una cadena lineal.

léculas del RNA que, si bien no codifican para proteínas, sirven para fines igualmente importantes en la célula (Cap. 6). Los pequeños *micro RNA*, de 20 a 25 nucleótidos de largo, son abundantes en las células de los metazoos y se unen y reprimen la actividad de los mRNA diana o blanco. Según algunas estimaciones, estos mRNA pequeños pueden regular de forma indirecta la actividad de la mayoría los genes, aunque los mecanismos y ubicuidad de este tipo de regulación aún están en exploración (Cap. 8). Diversos RNA largos no codificantes se unen al DNA o a las proteínas cromosómicas y afectan la estructura del cromosoma y la síntesis, el procesamiento y la estabilidad del RNA. Sin embargo, se conoce la función de muy pocos de estos abundantes RNA no codificantes.

Todos los organismos deben controlar cuándo y dónde se transcriben sus genes. Casi todas las células en nuestro cuerpo contienen el conjunto completo de genes humanos; pero, en cada tipo de célula, solo están activos, o se activan, algunos genes y se los usa para sintetizar

proteínas. Por ejemplo, los hepatocitos producen algunas proteínas que no se producen en las células renales, y viceversa. Más aún, muchas células responden a señales externas o a cambios en las condiciones externas activando o desactivando genes, adaptándose así su repertorio de proteínas a las necesidades del momento. Tal control de la actividad génica depende de las proteínas de unión al DNA que se denominan **factores de transcripción**, y que se unen a secuencias específicas del DNA y actúan como interruptores, activando o reprimiendo la transcripción de genes particulares (véanse la Fig. 1-9 y el Cap. 7). Los factores de transcripción suelen funcionar como complejos multiproteicos donde cada proteína contribuye con su propia especificidad de unión al DNA para seleccionar los genes regulados.

Los fosfolípidos son las unidades monoméricas de todas las membranas celulares

En esencia, cualquier célula es simplemente un compartimiento con un interior acuoso que está separado del ambiente externo por una membrana superficial (la membrana plasmática) que evita el flujo libre de las moléculas hacia dentro y fuera. Además, las células eucariontes tienen membranas internas extensas, que, a su vez, subdividen la célula en múltiples compartimientos: los orgánulos.

En todos los organismos, las membranas celulares están compuestas principalmente por una bicapa (dos capas) de moléculas de fosfolípidos. Estas moléculas bipartitas tienen un extremo que “atrae el agua” (hidrófilo) y un extremo que “repele el agua” (hidrófobo). Las dos capas de fosfolípidos de una membrana están orientadas con todos los extremos hidrófilos apuntando hacia las superficies internas y externas de la membrana y los extremos hidrófobos enterrados dentro de su interior (Fig. 1-10). Cantidades pequeñas de otros lípidos, como el colesterol, están insertados dentro del marco fosfolipídico. Las membranas fosfolipídicas son impermeables al agua, a todos los iones y, virtualmente, a todas las moléculas pequeñas hidrófilas. Así, cada membrana

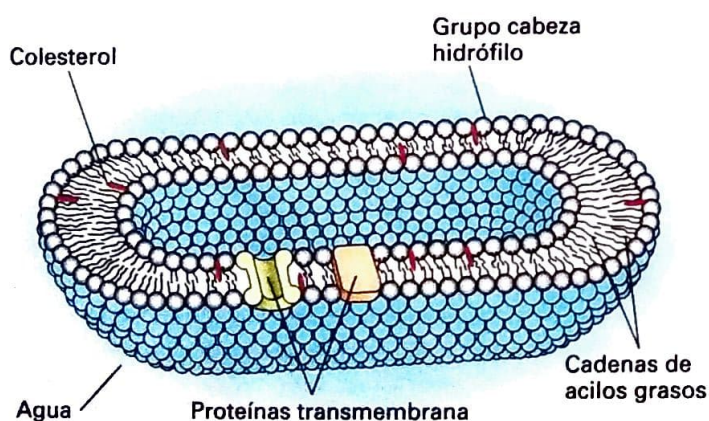


FIGURA 1-10 El interior acuoso de las células está rodeado por la membrana plasmática: una cubierta de dos capas de fosfolípidos. Las moléculas de fosfolípidos están orientadas con sus cadenas de ácidos grasos hidrófobas (líneas negras serpenteantes) hacia el interior y con sus grupos cabezas hidrófilos (esferas blancas) hacia el exterior. Por lo tanto, ambos lados de la membrana están recubiertos por grupos cabezas, principalmente fosfatos cargados adyacentes a los espacios acuosos dentro y fuera de la célula. Todas las membranas biológicas tienen la misma estructura básica de bicapa fosfolipídica. El colesterol (rojo) y varias proteínas están embebidos en la bicapa. El espacio interior es realmente mucho más grande en relación con el volumen de la membrana plasmática de lo que se describe aquí.

en cada célula también contiene grupos de proteínas que permiten que iones específicos y pequeñas moléculas la atraviesen. Otras proteínas de membrana sirven para adherir la célula a otras células o a polímeros que la rodean; incluso otras están encargadas de darle forma a la célula o permitir que su forma cambie. En los Caps. 10 y 11, se aprenderá más acerca de las membranas y cómo las moléculas las atraviesan.

Mediante la división celular, siempre surgen nuevas células a partir de las células parentales. Hemos visto que la síntesis de nuevas moléculas de DNA es moldeada por las dos hebras del DNA parental de manera tal que cada molécula de DNA hija tiene la misma secuencia que su progenitora. En paralelo, las membranas se forman por la incorporación de lípidos y proteínas a las membranas ya existentes en la célula parental, y estas se dividen entre las células hijas por fisión. Así, la síntesis de membrana, de modo similar a la síntesis de DNA, también está moldeada por una estructura parental.

1.2 Genomas, arquitectura y función celular

El universo biológico consiste en dos tipos de células: procariontes y eucariontes. Las células procariontes, como las bacterias, consisten en un único compartimiento que está rodeado por la membrana plasmática, carecen de un núcleo definido y tiene una organización interna relativamente simple (Fig. 1-11).

Las células eucariontes, a diferencia de las procariontes, contienen un núcleo delimitado por membrana y abundantes membranas internas que delimitan los **orgánulos** (Fig. 1-12). La región de la célula que se encuentra entre la membrana plasmática y el núcleo es el **citoplasma**, abarca el **citósol** (agua, iones disueltos, moléculas pequeñas y proteínas) y los orgánulos. Los eucariontes incluyen cuatro reinos: las plantas, los animales, los hongos y los protistas. Los procariontes comprenden el quinto y el sexto reino: las eubacterias (bacterias verdaderas) y las archaea.

La secuenciación del genoma brinda conocimientos profundos acerca de la función y de la evolución de genes y proteínas conservadas y no conservadas que se encuentran en múltiples organismos. En la siguiente sección, se describirán algunas características estructurales y funcionales básicas de las células procariontes y eucariontes y se las relacionará con los conocimientos obtenidos a partir de sus secuencias genómicas. Se enfatizan las proteínas conservadas que se encuentran en múltiples y diversas especies, y se explicará por qué los científicos han elegido varias de estas especies como **organismos modelo**: sistemas en los cuales los aspectos específicos de la función y del desarrollo celular sirven como modelo para el estudio de otras especies (Fig. 1-13).

Los procariontes incluyen las bacterias verdaderas y las archaea

En los últimos años, el análisis detallado de las secuencias del DNA a partir de organismos procariontes reveló dos reinos diferentes: las eubacterias, a menudo llamadas simplemente “bacterias”, y las archaea. Las eubacterias, un tipo numeroso de procariontes, son organismos unicelulares; incluyen a las cianobacterias, o algas verde azules, que pueden ser unicelulares o cadenas filamentosas de células. En la Figura 1-11, se ilustra la estructura general de una célula bacteriana típica; las células archaea tienen una estructura similar.

Las células bacterianas suelen ser de 1 a 2 μm de tamaño, consisten en un único compartimiento cerrado que contiene el citoplasma, el cual está delimitado por la membrana plasmática. Aunque las células bacterianas no

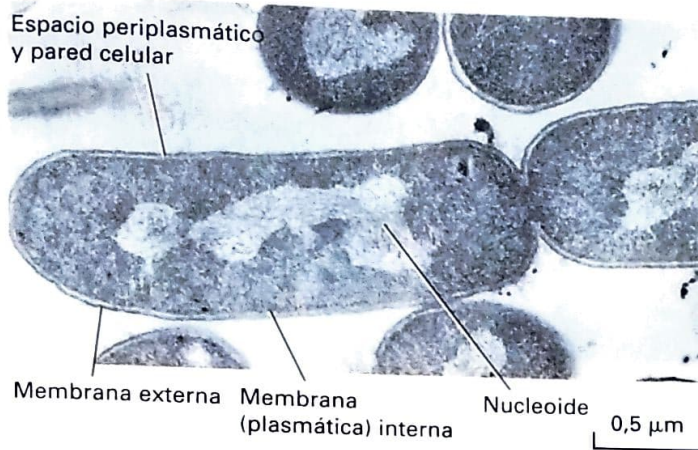
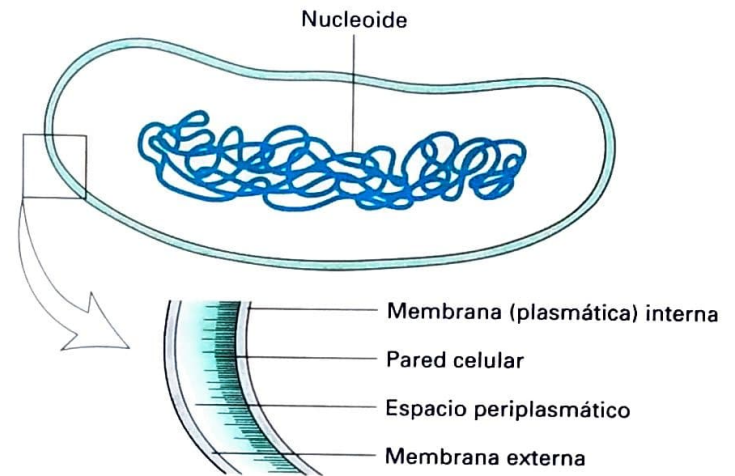


FIGURA 1-11 Las células procariontes tienen una estructura relativamente simple. (Izquierda) Microfotografía electrónica de una sección delgada de *Escherichia coli*, una bacteria intestinal común. El nucleoide, que consiste en el DNA bacteriano, no está delimitado por una membrana. *E. coli* y otras bacterias gramnegativas están rodeadas por dos membranas separadas por el espacio periplasmático. La pared celular delgada está adyacente a la membrana interna.



(Derecha) El dibujo del artista muestra el nucleoide (azul) y una ampliación de las capas que rodean al citoplasma. La mayoría de las células están compuestas de agua, proteínas, iones, y de otras moléculas que son demasiado pequeñas para ser representadas en la escala de este dibujo. (Microfotografía electrónica cortesía de L. D. J. Burdett y R. G. E. Murray. Ilustración de D. Goodsell.)

tienen un núcleo definido, el único genoma de DNA circular se encuentra muy plegado y condensado en una región central de la célula. Por el contrario, la mayoría de los ribosomas se encuentra en una región de la célula libre de DNA. Algunas bacterias también tienen una invaginación de la membrana celular, denominada *mesosoma*, que está asociada con la síntesis del DNA y con la secreción de proteínas. Muchas proteínas se encuentran localizadas de forma precisa dentro del citosol o en la membrana plasmática, por lo que indica la presencia de una organización interna elaborada.

Las células bacterianas tienen una pared celular, que se extiende adyacente al lado externo de la membrana plasmática. La pared celular está compuesta de capas de peptidoglucano –un complejo de proteínas y de oligosacáridos– que contribuyen a proteger la célula y a mantener su forma. Algunas bacterias (p. ej., *E. coli*) tienen una pared celular interna delgada y una membrana externa separada de la pared celular interna por el espacio periplasmático. Tales bacterias no se tiñen con la técnica de Gram y, por lo tanto, se las clasifica gramnegativas. Otras

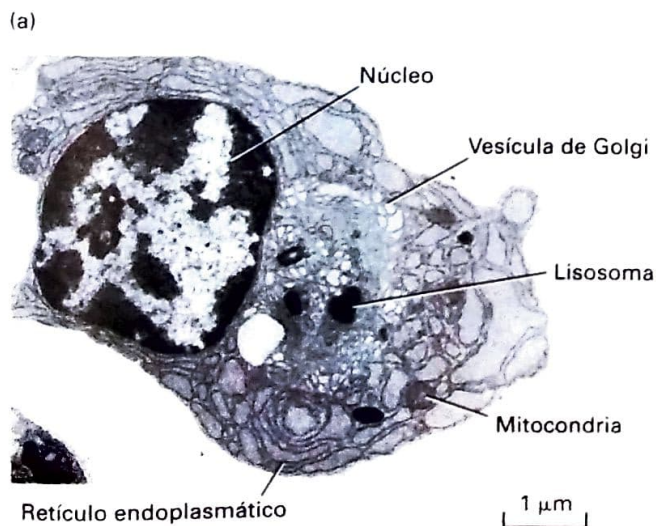
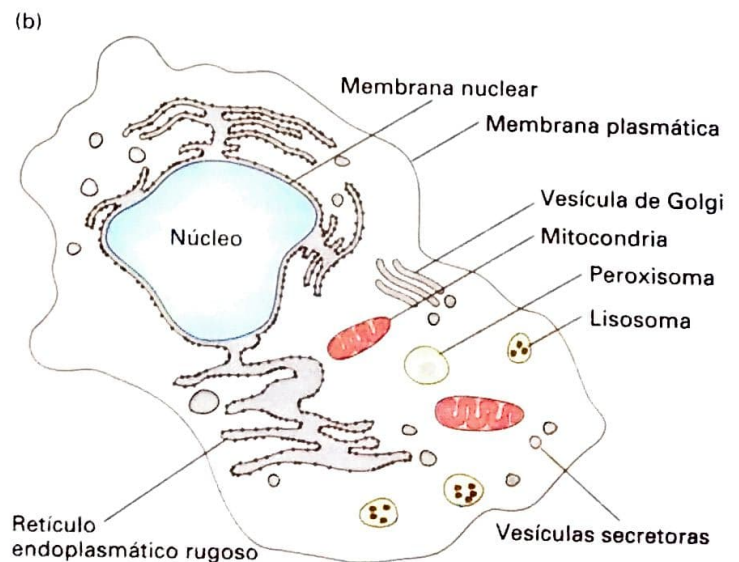


FIGURA 1-12 Las células eucariontes tienen una estructura interna compleja con muchos orgánulos delimitados por membranas. (a) Microfotografía electrónica y (b) diagrama de una célula plasmática, un tipo de glóbulo blanco que secreta anticuerpos. Una membrana simple (la membrana plasmática) rodea la célula, y el interior de la célula contiene muchos compartimentos delimitados por membranas, u orgánulos. La característica que define a las células eucariontes es la separación del DNA celular dentro de un núcleo definido, que está delimitado por



una membrana doble. La membrana nuclear externa se continúa con el retículo endoplasmático rugoso: una fábrica para el ensamblado de proteínas secretadas y de membranas. Las vesículas de Golgi procesan y modifican las proteínas secretadas y de membranas, la mitocondria genera energía, los lisosomas digieren material celular y lo reciclan, los peroxisomas procesan moléculas usando oxígeno, y las vesículas secretoras transportan materiales celulares hasta la superficie y lo liberan. (De P. C. Cross y K. L. Mercer. 1993. *Cell and Tissue Ultrastructure: A Functional Perspective*, W. H. Freeman and Company.)

(a)



Virus

Proteínas involucradas en el DNA, RNA y síntesis proteica
Regulación génica
Cáncer y control de la proliferación celular
Transporte de proteínas y orgánulos dentro de las células
Infección e inmunidad
Técnicas de terapia génica posibles

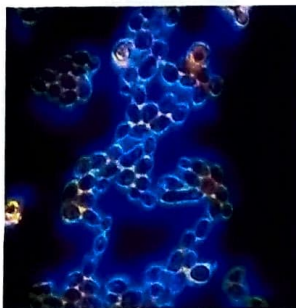
(b)



Bacterias

Proteínas involucradas en el DNA, RNA, síntesis proteica, metabolismo
Regulación génica
Dianas para antibióticos nuevos
Ciclo celular
Señalización

(c)



Levadura (*Saccharomyces cerevisiae*)

Control del ciclo celular y división celular
Secreción de proteína y biogénesis de membrana
Función del citoesqueleto
Diferenciación celular
Envejecimiento
Regulación génica y estructura del cromosoma

(d)



Lombriz (*Caenorhabditis elegans*)

Desarrollo del plan corporal
Linaje celular
Formación y función del sistema nervioso
Control de muerte celular programada
Proliferación celular y genes del cáncer
Envejecimiento
Comportamiento
Regulación génica y estructura de los cromosomas

(e)



Mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*)

Desarrollo del plan corporal
Generación de linajes de células diferenciadas
Formación del sistema nervioso, cardíaco y muscular
Muerte celular programada
Control genético del comportamiento
Genes del cáncer y control de la proliferación celular
Control de la polarización celular
Efectos de los fármacos, el alcohol, los pesticidas

(f)



Pez cebra

Desarrollo de los tejidos corporales de vertebrados
Formación y función del cerebro y el sistema nervioso
Defectos de nacimiento
Cáncer

(g)



Ratones, incluyendo células cultivadas

Desarrollo de los tejidos corporales
Función del sistema inmunitario de mamíferos
Formación y función del sistema nervioso y cerebral
Modelos de cánceres y otras enfermedades humanas
Regulación génica y herencia
Enfermedades infecciosas

(h)



Planta (*Arabidopsis thaliana*)

Desarrollo y formación de patrones de tejidos
Genéticas de biología celular
Aplicaciones en la agricultura
Fisiología
Regulación génica
Inmunidad
Enfermedades infecciosas

FIGURA 1-13 Cada organismo experimental utilizado en biología celular tiene ventajas para ciertos tipos de estudios. Los virus (a) y las bacterias (b) tienen genomas pequeños susceptibles a la disección genética. Muchos conocimientos acerca del control génico inicialmente provinieron a partir de estudios con estos organismos. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* (c) tiene la organización celular de un eucarionte, pero es un organismo unicelular simple que es fácil de cultivar y manipular genéticamente. En el nematodo *Caenorhabditis elegans* (d), que tiene un número pequeño de células dispuestas en una forma casi idéntica en cada gusano, se puede trazar la formación de cada célula individual. La mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* (e) se utilizó por primera vez para descubrir las propiedades de los cromosomas y ha sido especialmente valiosa para la identificación de genes que controlan el desarrollo embrionario. Muchos de estos genes están conservados evolutivamente en los seres humanos. El pez cebra *Danio rerio* (f) se usó para las búsquedas genéticas rápidas para identificar genes que controlan el desarrollo y la organogénesis de los vertebrados. De los sistemas animales

experimentales, los ratones (*Mus musculus*) (g) son evolutivamente cercanos a los seres humanos y han proporcionado modelos para el estudio de numerosas enfermedades genéticas e infecciosas. La maleza de la familia de la mostaza *Arabidopsis thaliana* (h) se ha usado para búsquedas genéticas para identificar genes involucrados en casi cada aspecto de la vida de las plantas. Se ha completado la secuenciación del genoma para muchos virus y especies bacterianas: la levadura *S. cerevisiae*, el gusano *C. elegans*, la mosca de la fruta *D. melanogaster*, seres humanos, ratón, pez cebra y la planta *A. thaliana*. También se han secuenciado los genomas de otros organismos, en particular de las ranas, erizos de mar, pollos y mohos del trigo, y continúan siendo inmensamente valorados para la investigación biológica. Cada vez más, se utiliza una gran variedad de otras especies, sobre todo para estudios de evolución de las células y de mecanismos.

(Parte [a]) Visuals Unlimited, Inc. Parte [b]) Kari Lountmaa/Science Photo Library/Photo Researchers, Inc. Parte [c]) Scimat/Photo Researchers, Inc. Parte [d]) Photo Researchers, Inc. Parte [e]) Darwin Dale/Photo Researchers, Inc. Parte [f]) Inge Spence/Visuals Unlimited, Inc. Parte [g]) J. M. Labat/Jancana/Visuals Unlimited, Inc. Parte [h]) Darwin Dale/Photo Researchers, Inc.)

bacterias (p. ej., *Bacillus polymyxa*) que tienen una pared celular más gruesa y no tienen membrana externa incorporan la tinción de Gram y, por ende, se las clasifica grampositivas.

Partiendo de la hipótesis de que los organismos similares divergieron más recientemente a partir de un ancestro común de lo que lo hicieron los organismos disímiles, los investigadores idearon un árbol de linaje evolutivo que se muestra en la Figura 1-1a. De acuerdo con este árbol, los archaea y los eucariontes divergieron de las bacterias más de mil millones de años antes de que lo hicieran entre sí (Cuadro 1-1). Además de las distinciones de secuencia de DNA que definen a los tres grupos de organismos, las membranas celulares de las archaea tienen propiedades químicas que difieren marcadamente de las de las bacterias y de los eucariontes.

Muchos archaea se desarrollan en ambientes inusuales, a menudo extremos, que pueden asemejarse a las condiciones ancestrales que existieron cuando apareció la vida por primera vez en la Tierra. Por ejemplo, los halófilos (“afinidad por la sal”) requieren concentraciones salinas elevadas para sobrevivir, y los termoacidófilos (“afinidad por el calor y el ácido”) proliferan en manantiales de azufre (80 °C), donde es común un pH menor a 2. Incluso otras archaea viven en entornos libres de oxígeno y generan metano (CH₄) al combinar agua con dióxido de carbono.

***Escherichia coli* se utiliza ampliamente en la investigación biológica**

El linaje bacteriano incluye el germen *Escherichia coli*: un microorganismo que es el favorito para uso experimental y, en la naturaleza, es muy común hallarlo en el suelo y en el intestino de los animales. *E. coli* y otras bacterias tienen numerosas ventajas como organismos experimentales. Crecen rápidamente en un medio simple y barato que contiene glucosa y sales, en el cual pueden sintetizar todos los aminoácidos, lípidos, vitaminas y otras moléculas pequeñas esenciales. Al igual que todas las bacterias, *E. coli* tiene mecanismos admirablemente concisos para el control de la actividad génica que, en la actualidad, se comprenden bien. Con el tiempo, los investigadores han desarrollado sistemas poderosos para el análisis genético de este organismo. Estos sistemas se ven facilitados por el tamaño pequeño de los genomas bacterianos, la facilidad de obtención de mutantes, la disponibilidad de técnicas para la transferencia de genes a las bacterias, una enorme riqueza de conocimientos acerca del control génico bacteriano y de las funciones proteicas, y la relativa simplicidad del mapeo de genes uno respecto de otro en el genoma bacteriano. En el Capítulo 5, se verá cómo *E. coli* se usa en la investigación del DNA recombinante.

Las bacterias tales como *E. coli*, que proliferan en ambientes tan diversos como el suelo y el intestino humano, tienen alrededor de 4 000 genes que codifican casi el mismo número de proteínas (véase el Cuadro 1-2). Las bacterias parásitas, como las especies *Mycoplasma*, adquieren aminoácidos y otros nutrientes a partir de sus células huésped, y carecen de genes para las enzimas que catalizan las reacciones en la síntesis de aminoácidos y de ciertos lípidos. Muchos genes bacterianos que codifican proteínas esenciales para el DNA, el RNA, la síntesis de proteínas y la función de membrana se conservan en todos los organismos, y mucho de nuestro conocimiento de estos procesos celulares importantes se dilucidó primero en *E. coli*. Por ejemplo, ciertas proteínas de membrana de *E. coli*, que importan aminoácidos a través de la membrana plasmática, están estrechamente relacionadas en secuencia, estructura y función con proteínas de membrana en ciertas células de cerebro de mamífero que

importan moléculas de señalización de célula nerviosa a célula nerviosa, denominadas **neurotransmisores** (Caps. 11 y 22).

Todas las células eucariontes tienen muchos orgánulos iguales y otras estructuras subcelulares

Los **eucariontes** comprenden todos los miembros de los reinos vegetal y animal, así como del de hongos (p. ej., levaduras, setas, mohos) y los protozoos (*proto*, primitivo; *zoo*, animal), que son exclusivamente unicelulares. Las células suelen tener 10-100 µm de ancho, en general son mucho más grandes que las bacterias. Un típico fibroblasto humano, una célula del tejido conectivo, tiene alrededor de 15 µm de ancho con un volumen y un peso seco algunas miles de veces más que una célula de *E. coli*. Una ameba, un protozoo unicelular, puede tener un diámetro celular de aproximadamente 0,5 mm, más de 30 veces que el de un fibroblasto.

Las células eucariontes, al igual que las procariontes, están rodeadas por una membrana plasmática. Sin embargo, a diferencia de las células procariontes, la mayoría de las eucariontes (el eritrocito humano es una excepción) también contiene membranas internas extensas que delimitan compartimientos, los **orgánulos**, y los separa del resto del **citoplasma**, la región de la célula que está fuera del núcleo (véase la Fig. 1-12). Muchos orgánulos están rodeados por una única membrana fosfolipídica, pero el núcleo, la mitocondria y el cloroplasto están rodeados por dos membranas. Cada tipo de orgánulo contiene un conjunto de proteínas específicas, que incluyen enzimas que catalizan reacciones químicas necesarias. Las membranas que definen estos compartimientos subcelulares controlan la composición iónica interna de manera que generalmente difieren de la del citosol circundante así como de la de otros orgánulos.

El orgánulo más grande en una célula eucarionte suele ser el núcleo, que alberga la mayoría del DNA celular. En las células animales y vegetales, la mayoría del ATP se produce por “máquinas moleculares”: complejos multiproteicos grandes que se localizan en los orgánulos, llamados **mitocondrias**. Las plantas realizan la fotosíntesis en los **cloroplastos**, orgánulos que contienen las máquinas moleculares para la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato, similar a los que se encuentran en las mitocondrias. En las membranas de las células bacterianas, se localizan maquinarias moleculares similares a las que generan ATP. Se cree que tanto las mitocondrias como los cloroplastos se originaron a partir de bacterias que establecieron residencia dentro de células eucariontes y luego se tornaron colaboradores (Cap. 12). Con el tiempo, muchos de los genes bacterianos “migraron” al núcleo celular y se incorporaron dentro del genoma nuclear de la célula. Tanto las mitocondrias como los cloroplastos contienen genomas pequeños que codifican unas pocas proteínas esenciales del orgánulo; las secuencias de estos DNA revelaron sus orígenes bacterianos.

Las células necesitan degradar partes obsoletas o desgastadas en moléculas pequeñas que pueden ser descartadas o recicladas. En los animales, esta tarea de limpieza está asignada en parte a los **lisosomas**: orgánulos repletos de enzimas de degradación. El interior de un lisosoma tiene un pH de alrededor de 5,0; mucho más ácido que el del citosol circundante. Esto contribuye a la degradación de los materiales por parte de las enzimas lisosomales, que pueden funcionar con este pH bajo. Para crear un ambiente de pH bajo, las proteínas localizadas en la membrana lisosómica bombean iones de hidrógeno al interior del lisosoma usando la energía suministrada por ATP (Cap. 11). Las plantas y los hongos contienen una vacuola, que también tiene un interior con pH bajo y almacena ciertas sales y nutrientes. Los **peroxisomas** son



FIGURA 1-14 Los tres tipos de filamentos del citoesqueleto tienen distribuciones características dentro de las células animales. Tres vistas de la misma célula. Un fibroblasto cultivado fue permeabilizado y luego tratado con tres preparaciones de anticuerpos diferentes. Cada anticuerpo se une específicamente a los monómeros de proteína que forman un tipo de filamento, que, a su vez, está unido químicamente a diferentes colorantes fluorescentes (azul, rojo o verde). La

visualización de la célula teñida en un microscopio fluorescente revela la localización de los filamentos unidos a una preparación anticuerpo-colorante particular. En este caso, los microtúbulos están teñidos de azul; los microfilamentos, de rojo; y los filamentos intermedios, de verde. Los tres sistemas de fibras contribuyen a la forma y a los movimientos de las células. (Cortesía de V. Small)

otro tipo de orgánulos pequeños que se encuentran en virtualmente todas las células eucariontes: se especializan en la degradación de los componentes lipídicos de las membranas.

El citoplasma de las células eucariontes contiene un conjunto de proteínas fibrosas que colectivamente se denomina el **citoesqueleto** (Caps. 17 y 18). Tres clases de fibras componen el citoesqueleto: los **microtúbulos** (20 nm de diámetro), formados de polímeros de la proteína tubulina; los **microfilamentos** (7 nm de diámetro), formados de la proteína actina; y **filamentos intermedios** (10 nm de diámetro), compuestos por una o más subunidades de proteína con forma de bastón (Fig. 1-14). El citoesqueleto da a la célula fuerza y rigidez, y ayuda así a mantener la forma de la célula. Las fibras del citoesqueleto también controlan el movimiento de las estructuras dentro de la célula; por ejemplo, algunas fibras del citoesqueleto conectan los orgánulos o proporcionan pistas a lo largo de las cuales se mueven los orgánulos y los cromosomas; otras fibras cumplen funciones en la motilidad celular. Así, el citoesqueleto es importante en la “organización” de la célula.

La rigidez y fuerza de la pared celular se deben a que la pared está compuesta de celulosa y de otros polímeros que rodean las células vegetales. Los hongos también están rodeados por una pared celular, pero su composición difiere de la de las paredes celulares bacterianas o vegetales.

Cada membrana de orgánulo y cada espacio en el interior de un orgánulo tienen un conjunto único de proteínas capaces de llevar a cabo sus funciones específicas. Para que las células funcionen adecuadamente, las numerosas proteínas que componen los diversos compartimientos deben ser transportadas desde donde son sintetizadas hasta su localización apropiada (Caps. 17 y 18). Algunas proteínas se sintetizan sobre los ribosomas que están libres en el citoplasma; desde allí, algunas proteínas son trasladadas hasta el núcleo mientras que otras son dirigidas hacia las mitocondrias, cloroplastos o peroxisomas, dependiendo de sus funciones específicas. Las proteínas secretadas por las células y la mayoría de las proteínas de membrana, por el contrario, se sintetizan en los ribosomas asociados con el **retículo endoplasmático o endoplásmico (RE)**. Este orgánulo produce, procesa y despacha proteínas y lípidos. Las cadenas proteicas producidas en el RE se mueven por lo general hacia el **complejo de Golgi**, donde se modifican antes de ser remitidas a sus destinos finales. Las proteínas que viajan de esta manera contienen secuencias cortas de aminoácidos o de cadenas de azúcar adheridas (oligosacáridos) que sirven como direcciones para enviarlas a sus destinos correctos. Estas direcciones funcionan porque son reco-

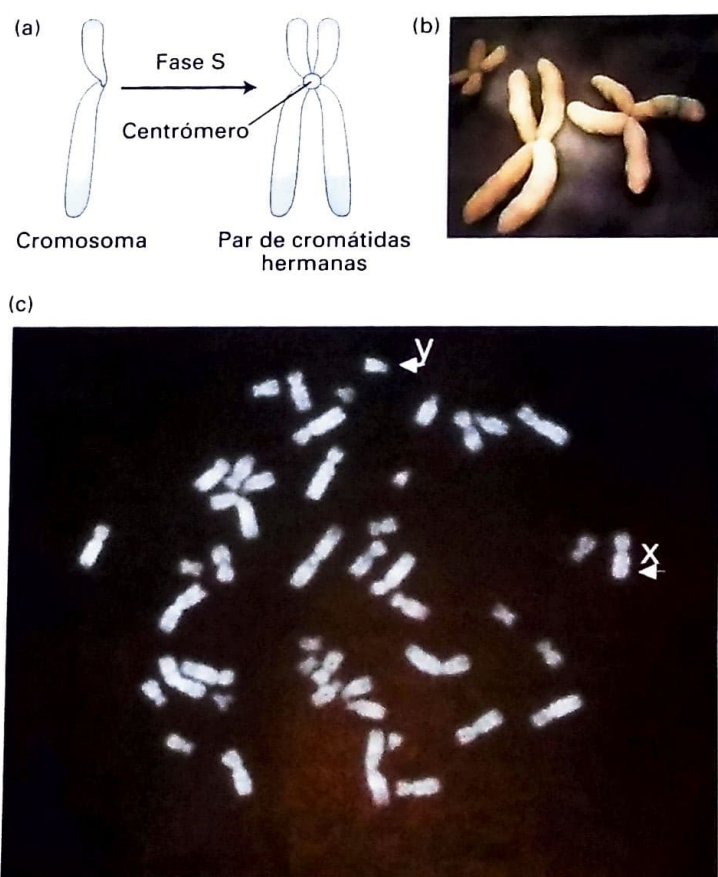


FIGURA 1-15 Los cromosomas individuales se pueden visualizar en las células durante la división celular (mitosis). (a) Durante la fase S del ciclo celular (véase la Figura 1-16), los cromosomas se duplican, y las “cromátidas hermanas”, cada una con una copia completa del DNA cromosómico, permanecen adheridas al centrómero. (b) Durante el proceso de división celular real (mitosis), el DNA cromosómico se compacta altamente y los pares de cromátidas hermanas se pueden visualizar en el microscopio electrónico, como se describe aquí. (c) La imagen por microscopía óptica de un extendido cromosómico a partir de una célula linfocítica masculina humana cultivada, la cual fue detenida en la etapa de metafase de la mitosis mediante tratamiento con el fármaco colcemida, que despolariza los microtúbulos. Existe una copia única de los cromosomas duplicados X e Y y dos de cada uno de los otros cromosomas.

(Parte [b] cortesía de Medical RF/The Medical File/Peter Arnold Inc. Parte [c] cortesía de Tatjana Pyntikova.)

nocidas y unidas por otras proteínas que realizan la clasificación y el envío hacia diversos compartimientos celulares.

El DNA celular está empaquetado dentro de los cromosomas

En la mayoría de las células procariontes, la mayoría o toda la información genética reside en una molécula de DNA circular única de alrededor de un milímetro de longitud; esta molécula se encuentra plegada sobre sí misma muchas veces, en la región central de la célula a un tamaño de un micrómetro (Fig. 1-11). Por el contrario, el DNA en el núcleo de las células eucariontes se distribuye entre las múltiples estructuras lineales largas, que se denominan **cromosomas**. La longitud y el número de cromosomas son los mismos en todas las células de un organismo, pero varían entre los diferentes tipos de organismos (véase el Cuadro 1-2). Cada cromosoma comprende una única molécula de DNA asociada con numerosas proteínas, y al DNA total de los cromosomas de un organismo se lo denomina su **genoma**. Los cromosomas, que se tiñen intensamente con colorantes básicos, son visibles con microscopio óptico y electrónico solo durante la división celular, cuando el DNA se encuentra altamente compactado (Fig. 1-15). Aunque la molécula del DNA genómico grande en los procariontes está asociada con proteínas y suele llamarse “cromosoma”, la organización del DNA dentro de un cromosoma bacteriano difiere en gran medida respecto del de los cromosomas en las células eucariontes.

Todas las células eucariontes utilizan un ciclo similar para regular su división celular

Los eucariontes unicelulares, los animales y las plantas usan esencialmente el mismo **ciclo celular**: una serie de acontecimientos que prepara a una célula para la división, y el proceso de división real se denomina **mitosis**. El ciclo celular eucarionte suele representarse mediante cuatro etapas (Fig. 1-16). Los cromosomas y el DNA que contienen se dupli-

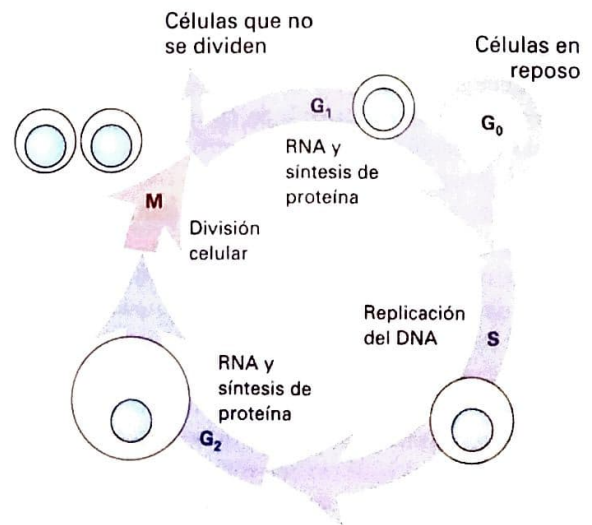
can durante la **fase S (síntesis)**. Los cromosomas replicados se separan durante la **fase M (mitótica)**, donde cada célula hija obtiene una copia de cada cromosoma durante la división celular. Las fases M y S están separadas por dos etapas, la **fase G₁** y la **fase G₂**, durante las cuales se sintetizan los mRNA y las proteínas y la célula incrementa su tamaño.

En los organismos unicelulares, ambas células hijas suelen asemejarse (aunque no siempre) a la célula parental. En los organismos multicelulares, cuando se dividen muchos tipos celulares, las hijas se asemejan mucho a su célula parental, por ejemplo, los hepatocitos se dividen para generar dos hepatocitos con las mismas características y funciones que su progenitora, como las células productoras de insulina en el páncreas. Por el contrario, las **células madre** y ciertas células indiferenciadas pueden generar múltiples tipos de células descendientes diferenciadas; estas células suelen dividirse de manera tal que las dos células hijas son diferentes. Tal **división celular asimétrica** es crítica para la generación de tipos celulares diferentes en el cuerpo (Cap. 21). A menudo, una célula hija se asemeja a su progenitora en que permanece indiferenciada y retiene su capacidad para dar lugar a múltiples tipos de células diferenciadas. La otra célula hija se divide muchas veces y cada célula hija se diferencia en un tipo específico de célula.

En condiciones óptimas, algunas bacterias, como *E. coli*, pueden dividirse para formar dos células hijas una vez cada 30 minutos. A la mayoría de las células eucariontes les toma un tiempo considerablemente más largo para crecer y dividirse, aunque las divisiones celulares en el embrión temprano de *Drosophila* requieren solo 7 minutos. Por otra parte, el ciclo celular en los eucariontes normalmente está muy regulado (Cap. 19). Este control evita el desequilibrio, el crecimiento excesivo de células y de tejidos si faltan los nutrientes esenciales o ciertas señales hormonales. Algunas células altamente especializadas en los animales adultos, como las células nerviosas y las células del músculo estriado, se dividen en ocasiones raras si es que lo hacen. Sin embargo, un organismo suele reemplazar sus células desgastadas o producir más células en respuesta a necesidades nuevas, como se ejemplifica con el crecimiento del músculo en respuesta al ejercicio o al daño.

ANIMACIÓN GENERAL: El ciclo de vida de una célula

FIGURA 1-16 Durante el desarrollo, todas las células eucariontes progresan de forma continua a través de 4 etapas del ciclo celular, y generan nuevas células hijas. En las células en proliferación, las cuatro fases del ciclo celular proceden sucesivamente, y duran entre 10 y 20 horas según el tipo celular y el estado del desarrollo. Las levaduras se dividen mucho más rápido. Durante la interfase, que consiste en las fases G₁, S y G₂, la célula aproximadamente duplica su masa. La replicación del DNA durante la fase S deja a la célula con cuatro copias de cada tipo de cromosoma. En la fase mitótica (M), los cromosomas se dividen en partes iguales dentro de dos células hijas, y el citoplasma se divide más o menos a la mitad en la mayoría de los casos. Bajo ciertas condiciones, como la inanición o cuando el tejido alcanza su tamaño final, las células finalizan el ciclo y permanecen en el estado de espera o reposo, llamado G₀. La mayoría de las células en G₀ pueden volver a comenzar el ciclo si las condiciones cambian.



Otro ejemplo es la formación adicional de eritrocitos cuando una persona asciende a una altitud elevada y necesita más capacidad para capturar oxígeno. El defecto fundamental en el cáncer es la pérdida de la capacidad para controlar el crecimiento y la división de las células. En el Capítulo 24, se analizarán los acontecimientos moleculares y celulares que conducen a la proliferación inadecuada y descontrolada de las células.

1.3 De las células a los tejidos: los organismos unicelulares y los metazoos se utilizan para las investigaciones de biología celular y molecular

El entendimiento actual acerca del funcionamiento molecular de las células proviene del estudio de solo unos pocos tipos de organismos, llamados *organismos modelo*. Debido a la conservación evolutiva de genes, proteínas, orgánulos, tipos celulares, y así sucesivamente, los descubrimientos acerca de las estructuras y el funcionamiento biológico obtenidos con un organismo experimental suelen aplicarse a otros. Así los investigadores en general conducen los estudios con el organismo que es más adecuado para responder rápida y totalmente la pregunta en cuestión, sabiendo que los resultados obtenidos en un organismo es probable que sean aplicables.

Como se ha visto, las bacterias son excelentes modelos para el estudio de diversas funciones celulares, pero carecen de los orgánulos que se encuentran en los eucariontes. Los eucariontes unicelulares, como las levaduras, se usan para estudiar muchos aspectos fundamentales de la estructura y función celular eucarionte. Los modelos multicelulares, o metazoos, son necesarios para estudiar los tejidos, los sistemas de órganos más complejos y el desarrollo. Como se verá en esta sección, se utilizan diversos organismos modelo eucariontes para comprender estos sistemas y mecanismos celulares complejos.

Los eucariontes unicelulares se usan para estudiar aspectos fundamentales de la estructura y función de la célula eucarionte

Un grupo de eucariontes unicelulares, las levaduras, ha probado ser excepcionalmente útil en el análisis genético y molecular de la formación y función celular eucarionte. Las levaduras y sus primos multicelulares, los mohos, que en forma colectiva constituyen los hongos, tienen una función ecológica importante en la degradación de restos animales y plantas para su reutilización. También sintetizan numerosos antibióticos y se los utiliza para la elaboración de pan, cerveza y vino.

La levadura común usada para elaborar pan y cerveza, *Saccharomyces cerevisiae*, aparece con frecuencia en este libro debido a que ha probado ser un organismo experimental extremadamente útil. En la mayoría de los eucariontes, si no en casi todos, se encuentran homólogos de muchas de las aproximadamente 6 000 diferentes proteínas expresadas en una célula de *S. cerevisiae* (Cuadro 1-2) y son importantes para la división celular o para el funcionamiento de orgánulos eucariontes individuales. Gran parte de lo que sabemos acerca de las proteínas en el retículo endoplasmático y en el aparato de Golgi, que promueven la secreción de proteínas, se elucidó por primera vez en las levaduras. Las levaduras también son esenciales para la identificación de muchas proteínas que regulan el ciclo celular

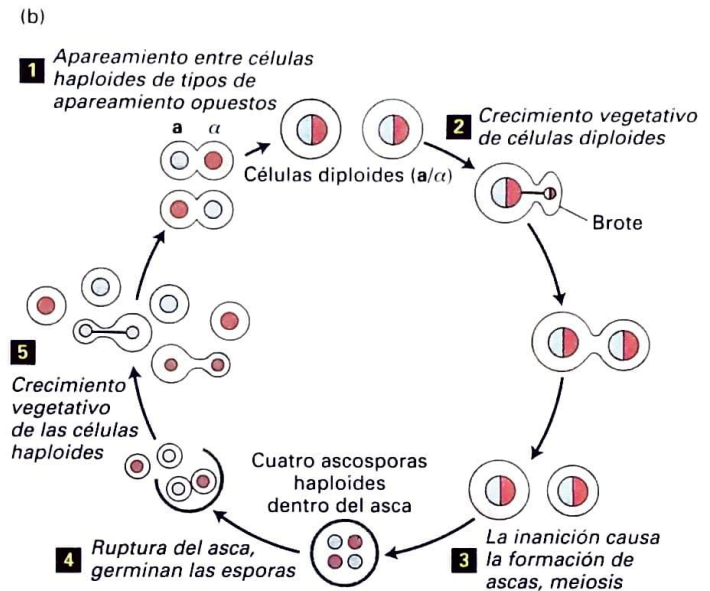


FIGURA 1-17 La levadura *Saccharomyces cerevisiae* puede crecer tanto como haploide como diploide y puede reproducirse de modo sexual o asexual. (a) Microfotografía electrónica de barrido de la levadura en gemación *Saccharomyces cerevisiae*. Estas células crecen mediante un tipo inusual de mitosis llamada "mitosis por gemación". Uno de los núcleos hijos permanece en la célula "madre"; el otro núcleo hijo es transportado al brote, el cual crece en tamaño y pronto es liberado como una célula nueva. Después de que cada célula brote se libera, queda una cicatriz en el sitio de la gemación, por lo tanto, se puede contar el número de brotes anteriores en la célula madre. Las células de color anaranjado son bacterias. (b) Las células de levadura haploides pueden tener diferentes tipos de apareamientos, llamados a y α ; ambos tipos contienen una copia simple de cada cromosoma de levadura, la mitad del número habitual, y crecen por gemación mitótica. Dos células haploides que difieren en el tipo de apareamiento, una a y otra α , se pueden fusionar para formar una célula diploide a/α , que contiene dos copias de cada cromosoma. Las células diploides sufren meiosis, un tipo especial de división celular, para formar ascasporas haploides. La ruptura de un asca libera cuatro esporas haploides, que pueden germinar en células haploides a y α . Estas se pueden multiplicar asexualmente. (Parte (a) M. Abbey/VisualsUnlimited, Inc.)

y catalizan la replicación y transcripción del DNA. *S. cerevisiae* (Fig. 1-17a) y otras levaduras ofrecen muchas ventajas a los biólogos celulares y moleculares:

- Gran cantidad de células de levadura pueden crecer fácilmente y de forma económica en cultivos a partir de una única célula; tales clones celulares tienen todos los mismos genes y las mismas propiedades bioquímicas. Las proteínas individuales o los complejos multiproteicos se pueden purificar a partir de grandes cantidades de células y luego estudiarlas en detalle.

- Ambas células de levaduras crecen por mitosis como haploides (contienen una copia de cada cromosoma) y como diploides (contienen dos copias de cada cromosoma); esto hace que el aislamiento y la caracterización de las mutaciones en los genes que codifican proteínas celulares esenciales sean relativamente sencillos.

- Las levaduras, al igual que muchos organismos, tienen un ciclo sexual que les permite intercambiar genes entre células. Bajo condiciones de inanición, las células diploides entran en meiosis, un tipo especial de división celular, para formar células hijas haploides, que son de dos tipos, células a y α . Las células haploides pueden crecer por mitosis. Si las células haploides a y α se encuentran una con otra, pueden fusionarse y formar una célula diploide a/α que contiene dos copias de cada cromosoma (Fig. 1-17b).

Con el uso de una especie única como *S. cerevisiae* como un organismo modelo, los resultados de los estudios llevados a cabo por decenas de miles de científicos alrededor del mundo, mediante múltiples técnicas experimentales, pueden combinarse para producir un nivel más profundo de comprensión de un único tipo de célula. Como se verá muchas veces en este libro, las conclusiones sobre la base de los estudios de *S. cerevisiae* suelen ser verdaderas para todos los eucariontes y forman las bases para la exploración de la evolución de procesos más complejos en animales multicelulares y plantas.

Las mutaciones en la levadura conducen a la identificación de proteínas clave del ciclo celular

Los estudios bioquímicos pueden decirnos mucho acerca de una proteína individual, pero no pueden probar si es necesaria para la división celular o para otro proceso celular. La importancia de una proteína se demuestra firmemente si una mutación que evita su síntesis o la torna no funcional afecta de manera adversa el proceso bajo estudio. Un organismo diploide, en general, porta dos versiones (alelos) de cada gen, uno derivado de cada progenitor. Existen dos excepciones importantes, como las de genes en los cromosomas X e Y en los machos de algunas especies, incluyendo la nuestra.

En los enfoques genéticos clásicos, los científicos aíslan y caracterizan mutantes que carecen de la capacidad para hacer algo que un organismo normal hace. A menudo, se realizan “búsquedas” genéticas amplias para encontrar diferentes individuos mutantes (p. ej., moscas de la fruta, células de levadura) que son incapaces de completar un cierto proceso, como la división celular o la formación muscular. Las mutaciones suelen ser producidas por tratamientos con un mutágeno: un agente químico o físico que promueve las mutaciones en un esquema en gran medida aleatorio. Pero ¿cómo se pueden aislar y mantener organismos o células mutantes que son defectuosos en algunos procesos, como la división celular, que son necesarios para la supervivencia?

Una manera es aislar organismos con mutaciones sensibles a la temperatura. Estos mutantes son capaces de crecer a la temperatura permisiva, pero no a otra, en general, a una temperatura más elevada, la temperatura no permisiva. Las células normales crecen a cualquier temperatura. En la mayoría de los casos, un mutante sensible a la temperatura produce una proteína alterada que funciona a la temperatura permisiva, pero se despliega y es no funcional a la temperatura no permisiva. Las búsquedas sensibles a la temperatura se realizan más

rápidamente con organismos haploides, como las levaduras, puesto que existe solo una copia de cada gen, y una mutación en él tendrá una consecuencia inmediata.

Al analizar los efectos de numerosas mutaciones sensibles a la temperatura que alteran la división de células haploides de la levadura, los genetistas descubrieron la mayoría de los genes necesarios para la división celular sin saber nada, inicialmente, acerca de qué proteínas codifican o cómo participan estas proteínas en los procesos. El gran poder de la genética es la capacidad para revelar la existencia y la relevancia de las proteínas sin conocer a priori sus identidades bioquímicas o sus funciones moleculares. Eventualmente, estos genes “definidos por mutación” fueron aislados y replicados (clonados) mediante técnicas de DNA recombinante, que se analizan en el Capítulo 5. Con los genes ya aislados, las proteínas codificadas podían ser producidas en el tubo de ensayo o en bacterias modificadas genéticamente o en cultivos celulares. Luego, los bioquímicos pudieron investigar si las proteínas se asociaban con otras proteínas, con DNA o si catalizaban reacciones químicas particulares durante la división celular (Cap. 19).

La mayoría de los genes del ciclo celular de las levaduras también se encuentran en las células humanas, y las proteínas codificadas tienen secuencias aminoácídicas similares. Las proteínas de diferentes organismos, pero con secuencias aminoácídicas similares, se dicen que son **homólogas**, y pueden tener las mismas funciones o similares. Cabe destacar, que se ha demostrado que una proteína del ciclo celular humano, cuando se expresa en una levadura mutante defectuosa en la proteína de levadura homóloga, es capaz de “salvar el defecto” de la levadura mutante (es decir, de permitir que la célula crezca normalmente); esto demuestra la capacidad de la proteína para funcionar en un tipo muy diferente de célula eucarionte. Este resultado experimental, que galardonó con el premio Nobel a Paul Nurse, fue en especial notable debido a que la célula ancestral común a la célula humana y a la levadura actual se cree que vivió hace más de mil millones de años. Claramente, el ciclo celular eucarionte y los genes y proteínas que lo catalizan han evolucionado temprano en la evolución biológica y se han conservado bastante durante un período muy largo del tiempo evolutivo. Es importante destacar que estudios posteriores demostraron que las mutaciones en muchas proteínas del ciclo celular de la levadura que permiten el crecimiento celular descontrolado también se producen con frecuencia en los cánceres humanos (Cap. 24), por lo que se reafirma de nuevo la importancia de las funciones conservadas de estas proteínas en todos los eucariontes.

La multicelularidad requiere adhesiones célula-célula y célula-matriz

La evolución de los organismos multicelulares muy probablemente comenzó cuando las células permanecieron asociadas en colonias pequeñas después de la división, en lugar de separarse en células individuales. Unos pocos procariontes y diversos eucariontes unicelulares, como muchos hongos y mohos, exhiben tal comportamiento social rudimentario. El florecimiento completo de la multicelularidad, sin embargo, se produjo en los organismos eucariontes cuyas células se diferenciaban y organizaban en grupos, o *tejidos*, en los cuales las células llevaban a cabo una función común y especializada. Los metazoos —ya se trate de invertebrados como la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* y el gusano *Caenorhabditis elegans*, o de vertebrados como los ratones y los seres humanos— contienen entre 13 000 y 23 000 genes que codifican proteínas, alrededor del triple o

el cuádruple de una levadura (Cuadro 1-2). Muchos de estos genes se conservan entre los metazoos y son esenciales para la formación y función de tejidos y órganos específicos.

Las células animales suelen “pegarse” entre sí y formar una cadena, una esfera o una lámina mediante **proteínas de adhesión celular** (a menudo denominadas “moléculas de adhesión celular”, o CAM) en sus superficies (Fig. 1-3). Algunas CAM unen células unas con otras; otros tipos unen células a la matriz extracelular y forman una unidad cohesiva. En los animales, la matriz acoge las células y permite que los nutrientes difundan hacia ellas y que los productos de desperdicio se alejen. Una matriz especializada, muy resistente llamada **lámina basal**, contiene múltiples proteínas como colágeno y polisacáridos, que forman una capa de soporte donde subyacen láminas de células que evitan que se rompan los agregados de células. Las células de las plantas superiores se encuentran encerradas en una red de cámaras formadas por paredes celulares entrelazadas que rodean las células, y están conectadas por puentes citoplasmáticos llamados **plasmodesmos**.

Los tejidos se organizan en órganos

Los grupos especializados de células diferenciadas forman tejidos que son, en sí mismos, los principales componentes de los órganos. Por ejemplo, el lumen de un vaso sanguíneo está recubierto con una capa laminar de células endoteliales, o **endotelio**, que evita que las células sanguíneas se filtren (Fig. 1-18). Una capa de tejido de músculo liso rodea el endotelio y la lámina basal y se contrae para limitar el flujo sanguíneo. Durante los momentos de pánico, la constricción de vasos periféricos pequeños envía más sangre a los órganos vitales. La capa de músculo de un vaso sanguíneo está envuelta en una capa externa de tejido conectivo: una red de fibras y células que reviste y protege las paredes de los vasos del estiramiento y la ruptura. Esta jerarquía de tejidos se copia en otros vasos sanguíneos, que difieren principalmente en el espesor de las capas. La pared de una arteria principal debe soportar mucha tensión y, por lo tanto, es más gruesa que un vaso sanguíneo menor. La estrategia de agrupamiento y la estratificación de diferentes tejidos también se utilizan para la formación de otros órganos complejos. En cada caso, la función del órgano está determinada por las funciones específicas de sus tejidos componentes, y cada tipo de célula en un tejido produce los grupos específicos de proteínas que le permiten al tejido llevar a cabo sus funciones.

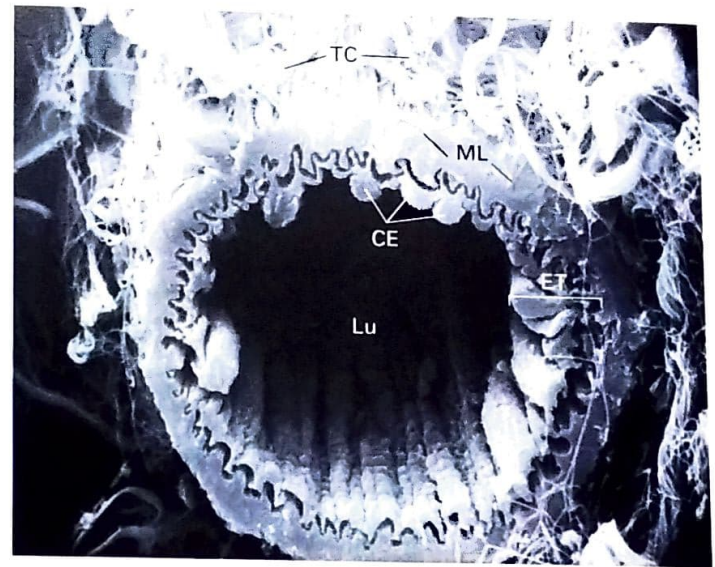
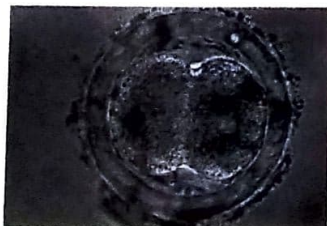


FIGURA 1-18 Todos los órganos son agrupamientos organizados de varios tejidos, como se ilustra en este corte transversal de una arteria pequeña (arteriola). La sangre circula a través del lumen del vaso (Lu), que está recubierto por una lámina delgada de células endoteliales (CE) que forman el endotelio (ET) y por la lámina basal subyacente. Este tejido se adhiere a la capa superpuesta de tejido de músculo liso (ML); la contracción de la capa muscular controla el flujo de sangre a través del vaso. Una capa fibrilar de tejido conectivo (TC) rodea al vaso y lo conecta a otros tejidos. Dr. Richard Kessel y Dr. Randy Kardon/Visual Unlimited, Inc.

El plan corporal y los tejidos rudimentarios se forman temprano en el desarrollo embrionario

El cuerpo humano está formado por unos 100 trillones de células, incluso si se desarrolla a partir de una única célula, el cigoto, resultante de la fusión de un espermatozoide y un óvulo. Las etapas tempranas en el desarrollo de un embrión se caracterizan por la división celular rápida (Fig. 1-19) y por la diferenciación de células en tejidos. El **plan corporal** embrionario –el patrón espacial de los tipos celulares (tejidos) y de las partes del cuerpo– emerge a partir de dos influencias: un programa de

VIDEO: Desarrollo embrionario temprano



(a)



(b)



(c)

FIGURA 1-19 Las primeras pocas divisiones de un óvulo fecundado establecen las bases para todo el desarrollo posterior. Un embrión murino en desarrollo se muestra en las etapas de (a) dos células, (b) cuatro células y (c)

ocho células. El embrión está rodeado por membranas de soporte. Los pasos correspondientes al desarrollo humano se producen durante los primeros días después de la fecundación. (Claude Edelmann/Photo Researchers, Inc.)

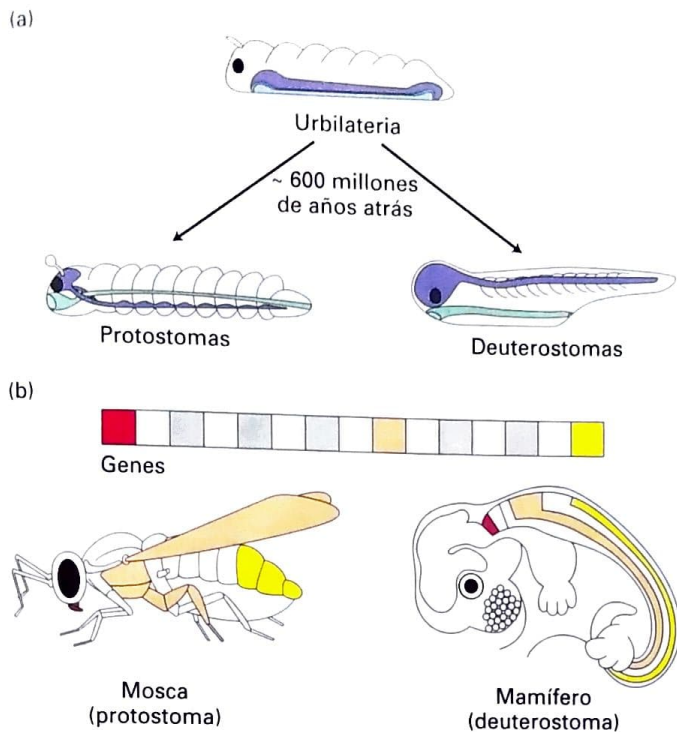


FIGURA 1-20 Genes similares, conservados durante la evolución, regulan los procesos de desarrollo temprano en diversos animales. (a) Urbilateria es el presunto ancestro de todos los protostomas y los deuterostomas que existieron hace alrededor de 600 millones de años. Se muestran las posiciones del cordón nervioso (violeta), superficie del ectodermo (principalmente, la piel, blanco), y endodermo (principalmente, el aparato digestivo y los órganos, verde claro). (b) Las proteínas altamente conservadas, llamadas "Hox", se encuentran tanto en los protostomas como en los deuterostomas, y determinan la identidad de los segmentos del cuerpo durante el desarrollo embrionario. Los genes *Hox* se encuentran en grupos en los cromosomas de la mayoría de todos los animales, y codifican factores de transcripción relacionados que controlan las actividades de otros genes. En muchos animales, los genes *Hox* dirigen el desarrollo de diferentes segmentos a lo largo del eje cabeza-a-cola, como se indica con los correspondientes colores. Cada gen es activado (transcripcionalmente) en una región específica a lo largo del eje cabeza-a-cola y controla el desarrollo de los tejidos allí. Por ejemplo, en el ratón, un deuterostoma, los genes *Hox* son responsables de las formas distintivas de las vértebras. Las mutaciones que afectan los genes *Hox* en la mosca de la fruta, un protostoma, provocan que partes del cuerpo se formen en lugares erróneos, como patas en lugar de antenas en la cabeza. En ambos organismos, estos genes proporcionan la dirección cabeza-a-cola y sirven para dirigir la formación de las estructuras en los lugares apropiados.

genes que especifica el patrón del cuerpo, y las interacciones de células locales que inducen diferentes partes del programa.

Con solo unas pocas excepciones, la mayoría de los animales exhibe simetría axial; es decir, sus lados izquierdo y derecho son especulares entre sí. Este patrón básico está codificado en el genoma. Los biólogos del desarrollo han dividido los filos animales en dos grandes grupos dependiendo en donde se forma la boca y el ano en el embrión temprano. Los **protostomas** desarrollan una boca cerca de una abertura transitoria en el embrión temprano (el blastoporo) y tienen una fibra nerviosa; los protostomas incluyen todos los gusanos, insectos y moluscos. Los **deuterostomas** desarrollan un ano cerca de esta abertura transitoria en el embrión y tienen un sistema nervioso central dorsal; estos incluyen los equinodermos (como las estrellas y los erizos de mar) y los vertebrados. Los cuerpos de ambos, protostomas y deuterostomas, se dividen en segmentos discretos que se forman temprano en el desarrollo embrionario. Los protostomas y los deuterostomas es probable que hayan evolucionado a partir de un ancestro común, llamado **Urbilateria**, que vivió aproximadamente hace 600 millones de años (Fig. 1-20a).

Los **genes patrón** especifican la organización general de un organismo. Esta comienza con los ejes corporales principales, anterior-posterior, dorsal-ventral, izquierda-derecha, y termina con los segmentos corporales de la cabeza, tórax, abdomen, y cola. La conservación de la simetría axial desde el gusano más simple hasta los mamíferos se explica por la presencia de genes patrón conservados en sus genomas. Algunos genes patrón codifican proteínas que controlan la expresión de otros genes; otros genes patrón codifican proteínas que son importantes en la adhesión celular o en la señalización celular. Este amplio repertorio de genes patrón permite la integración y coordinación de acontecimientos en las diferentes partes del embrión en desarrollo y brinda a cada segmento del cuerpo su identidad única.

Notablemente, muchos genes patrón (que, a menudo, suelen llamarse "factores de transcripción maestros") están altamente conser-

vados tanto en protostomas como en deuterostomas (Fig. 1-20b). Esta conservación del plan corporal refleja la presión evolutiva para preservar las similitudes en los mecanismos moleculares y celulares que controlan el desarrollo en los diferentes organismos.

Los ojos de las moscas y los ojos humanos son muy diferentes en estructura, en función y en conexiones nerviosas. No obstante, los también llamados "genes reguladores maestros" que inician el desarrollo de los ojos (*eyeless* en la mosca y *Pax6* en los seres humanos) codifican los factores de transcripción altamente relacionados que regulan las actividades de otros genes y descienden del mismo gen ancestral. Las mutaciones en los genes *eyeless* o en *Pax6* causan defectos importantes en la formación del ojo (Fig. 1-21).

Los invertebrados, los peces y otros organismos sirven como sistemas experimentales para el estudio del desarrollo humano

Para el estudio de las células en tejidos especializados, se utilizan organismos modelo animales y vegetales. Tradicionalmente, las células nerviosas y musculares, por ejemplo, se estudiaban en mamíferos o en criaturas con células especialmente grandes o accesibles, como las células neurales gigantes del calamar o la liebre de mar o los músculos de vuelo de las aves. Más recientemente, se ha estudiado exhaustivamente el desarrollo muscular y nervioso en las moscas de la fruta (*Drosophila melanogaster*), en los gusanos (*Caenorhabditis elegans*) y en el pez cebra (*Danio rerio*), en los cuales los mutantes en la formación o función nerviosa y muscular se pueden aislar rápidamente (Fig. 1-13).

Los organismos con embriones celulares grandes que se desarrollan fuera de la madre (p. ej., ranas, erizos de mar, peces y gallinas) son extremadamente útiles para trazar los destinos de las células a medida que se forman los diferentes tejidos y para hacer extractos para estudios bioquímicos. Por ejemplo, una proteína clave en la regulación

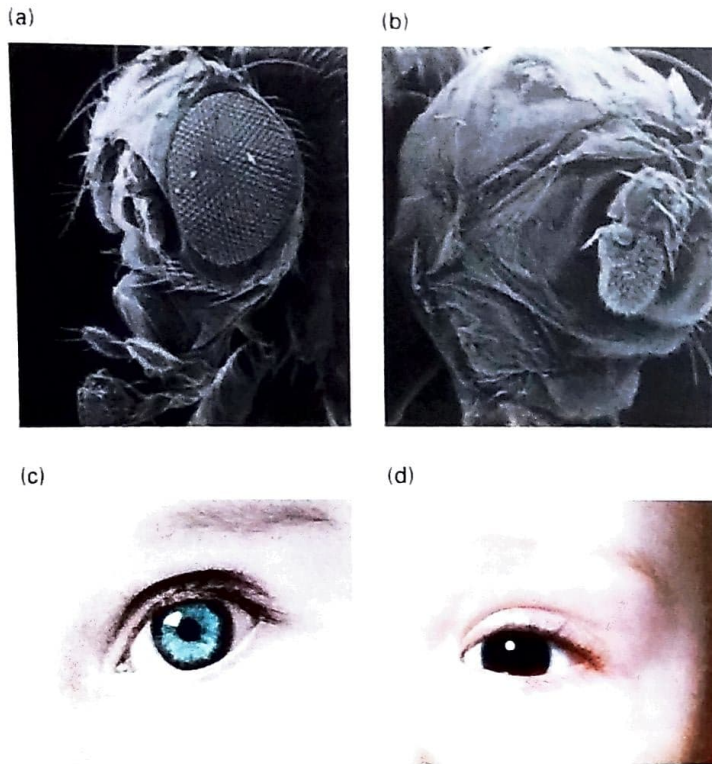


FIGURA 1-21 Genes similares, conservados durante la evolución, regulan el desarrollo de órganos en diversos animales. (a) El desarrollo de los grandes ojos compuestos en la mosca de la fruta requiere un gen llamado *eyeless* (llamado por el fenotipo mutante). (b) Las moscas con el gen *eyeless* inactivado carecen de ojos. (c) Los ojos humanos normales requieren el gen *Pax6*, el homólogo de *eyeless*. (d) Las personas que carecen de la función *Pax6* adecuada tienen la enfermedad genética aniridia: falta de iris en los ojos. Los genes *Pax6* y *eyeless* codifican los factores de transcripción relacionados que regulan las actividades de otros genes y descienden del mismo gen ancestral. Partes (a) y (b) Andreas Heft, Interdepartmental Electron Microscopy, EM-Biocenter of the University of Basel, Parte (c) ©Simon Fraser Photo Researchers, Inc. Parte (d) Visuals Unlimited.

de la mitosis se identificó por primera vez en estudios con embriones de ranas y erizos de mar y, posteriormente, se purificó a partir de sus extractos (Cap. 20).

Mediante el uso de técnicas de DNA recombinante, los investigadores pueden modificar por ingeniería genética genes específicos para que contengan mutaciones que inactivan o incrementan la producción de sus proteínas codificadas. Tales genes se pueden introducir en los embriones de gusanos, moscas, ranas, erizos de mar, gallinas, ratones, una variedad de plantas y de otros organismos; permitiendo la evaluación de los efectos de estas mutaciones. Este enfoque se está utilizando con gran frecuencia para producir versiones de ratones con enfermedades genéticas

humanas. La inactivación de genes específicos mediante la introducción de piezas cortas de RNA de interferencia permite una evaluación rápida de las posibles funciones de genes en muchos organismos.

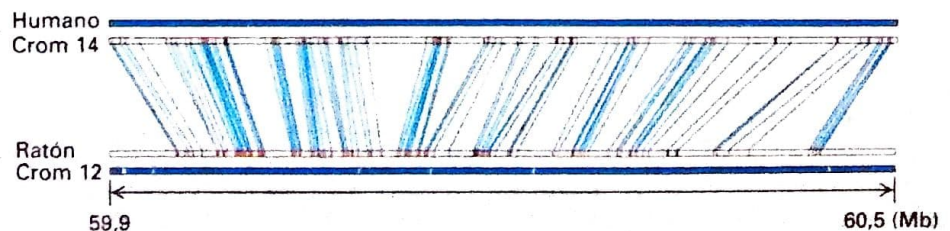
Los ratones se utilizan con frecuencia para generar modelos de enfermedades humanas

Los ratones tienen una enorme ventaja sobre otros organismos experimentales: son los más cercanos a los seres humanos respecto de cualquier animal para los cuales son factibles técnicas genéticas de gran alcance. Los ratones y los seres humanos han compartido estructuras vitales durante milenios, tienen sistemas inmunitarios similares y están sujetos a la infección por muchos de los mismos patógenos. Ambos organismos contienen alrededor del mismo número de genes, y cerca del 99% de los genes murinos que codifican proteínas tienen sus homólogos en los seres humanos, y viceversa. Cerca del 90% de los genomas murino y humano se puede dividir en regiones de sintenia conservada, es decir, en segmentos de DNA que tienen el mismo orden de secuencias únicas de DNA y de genes a lo largo de un segmento de un cromosoma. Esto significa que el orden génico en el ancestro común más reciente de los seres humanos y de los ratones se conservó en ambas especies (Fig. 1-22). Esta sintenia conservada es consistente con evidencias arqueológicas y otras de que los seres humanos y los ratones descienden de un antepasado evolutivo común de mamífero que probablemente vivió hace 75 millones de años. Por supuesto, los ratones no son personas; en relación con los seres humanos, los ratones han expandido sus familias de genes relativos a la inmunidad, la reproducción, el olfato; probablemente, esto reflejaría las diferencias entre los estilos de vida murino y humano.

En el Capítulo 5, se aprenderá acerca de la utilidad experimental de las células madre embrionarias murinas, de las líneas de células derivadas de embriones murinos tempranos que pueden crecer en cultivo en un estado indiferenciado. Mediante el uso de técnicas de DNA recombinante, los científicos pueden introducir mutaciones específicas en el genoma murino que imita las mutaciones correspondientes en la enfermedad humana. Por ejemplo, los pacientes con un cierto tipo de cáncer acumulan mutaciones inactivantes en una proteína reguladora clave del ciclo celular, y la mutación análoga se puede introducir en el gen murino correspondiente. Estas células madre con genes alterados se pueden inyectar en un embrión murino temprano, que luego es implantado en un ratón hembra pseudoprenado (un ratón tratado con hormonas para desencadenar cambios fisiológicos necesarios para el embarazo). Si el ratón se desarrolla a partir de las células madre inyectadas, exhibirá una enfermedad similar a la del cáncer humano; por lo tanto, se avala la conexión entre la enfermedad y las mutaciones en un gen o en genes particulares. Una vez que están disponibles los modelos de ratones de una enfermedad humana, se pueden llevar a cabo estu-

FIGURA 1-22 La conservación de sintenia entre los seres humanos y el ratón.

Se muestra un segmento típico de 510 000 pares de bases (pb) del cromosoma 12 murino que comparte un ancestro común con una sección de 600 000 pb del cromosoma 14 humano. Las líneas azules conectan las secuencias de DNA únicas recíprocas en los dos genomas. Mb, 1 millón de pares de bases. (De Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002, *Nature* 420: 220.)



(a) Bacteriófago T4

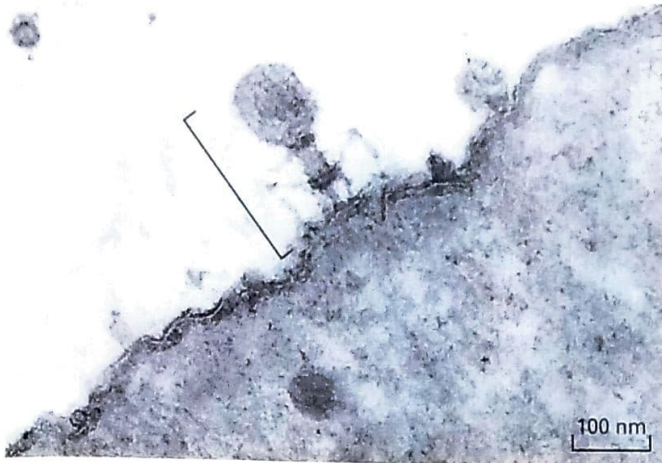
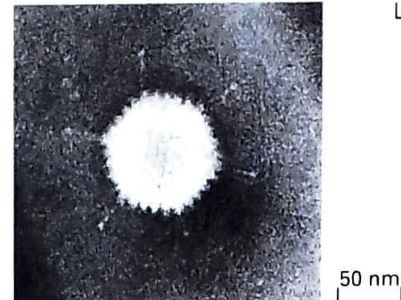


FIGURA 1-23 Los virus deben infectar una célula huésped para desarrollarse y reproducirse. Estas microfotografías electrónicas ilustran algo de la variedad estructural exhibida por los virus. (a) El bacteriófago T4 (corchete) se adhiere a una bacteria *E. coli* mediante la estructura de la cola e inyecta su DNA, localizado en la cabeza, dentro de la célula. Los virus que infectan bacterias se denominan bacteriófagos, o simplemente fagos. (b) El virus del mosaico del

(b) Virus del mosaico del tabaco



(c) Adenovirus



tabaco causa un moteado de las hojas de las plantas de tabaco infectadas y atrofia su crecimiento. (c) El adenovirus causa infecciones respiratorias y oculares en los seres humanos. Este virus tiene una cubierta membranosa externa a partir de la cual sobresalen puntas de glucoproteína con forma de picos largos. (Parte [a] de A. Levine, 1991, *Viruses*, Scientific American Library, p. 20. Parte [b] cortesía de R. C. Valentine. Parte [c] cortesía de Robley C. Williams, University of California)

dios de los defectos moleculares que causan la enfermedad y, posteriormente, se pueden probar nuevos tratamientos, por lo que se minimiza así la exposición humana a tratamientos no evaluados.

Los virus son parásitos celulares que se utilizan extensamente en las investigaciones de biología celular y molecular

Las enfermedades causadas por los virus son numerosas y todas demasiado familiares, incluyendo el virus de la varicela, la gripe y algunos tipos de neumonía, polio, sarampión, rabia, hepatitis, el resfriado común y muchos otros. Las infecciones virales en las plantas (p. ej., el virus del mosaico enano en el maíz) tienen un importante impacto económico en la producción de cultivos. Casi todos los virus tienen un rango de huéspedes más bien limitado e infectan solo ciertas bacterias, plantas o animales (Fig. 1-23). Los virus son mucho más pequeños que las células, del orden de los 100 nanómetros (nm) de diámetro. Un virus suele estar compuesto de una cubierta de proteína que encierra un centro que contiene el material genético, que puede ser DNA o RNA, y contiene la información para producir más virus (Cap. 4). La cubierta protege al virus del ambiente y le permite adherirse o entrar a células huésped específicas. En algunos virus, la cubierta proteica está rodeada por una cubierta similar a una membrana, que se forma a partir de la membrana plasmática de la célula infectada (Fig. 14-34).

Debido a que los virus no pueden crecer o reproducirse por sus propios medios, un virus debe infectar una célula huésped y tomar el control de su maquinaria interna para sintetizar las proteínas virales. Todos los virus usan ribosomas celulares para sintetizar proteínas virales; la mayoría de los virus de DNA usa enzimas celulares para la replicación de su DNA y para la transcripción de su DNA en mRNA. Por lo tanto, los estudios de replicación del DNA del virus y la síntesis del RNA son informativos de los correspondientes procesos celulares. Cuando se liberan los virus recién sintetizados mediante gemación o brotación desde la membrana celular o cuando la célula infectada estalla, el ciclo comienza de nuevo.

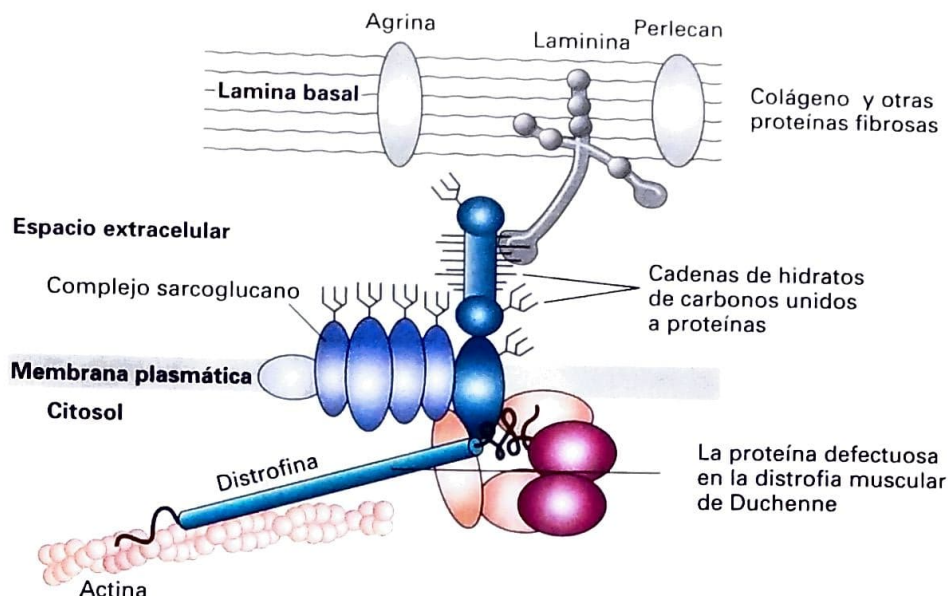
Considere a los adenovirus, que causan infecciones en las vías respiratorias y oculares en los seres humanos. Los adenovirus humanos tienen un genoma de solo aproximadamente 35 000 pares de base —alrededor del 2% del tamaño de un genoma bacteriano— y que codifica cerca de 30 proteínas, casi la mitad de las cuales están conservadas entre los adenovirus que infectan diferentes especies. Estas proteínas conservadas comprenden proteínas estructurales que forman parte de la partícula viral madura (virión) y proteínas que catalizan pasos en la replicación del DNA viral. Luego, en la infección de células humanas con adenovirus, la célula se convierte en una fábrica virtual para la producción de solo unas pocas proteínas virales: cerca de la mitad del RNA no ribosómico sintetizado son mRNA virales, y la mayoría de las proteínas producidas son virales. En la década de 1970 —antes del desarrollo de las técnicas de DNA recombinante— esto permitió experimentos de síntesis de mRNA de adenovirus que demostraron que los mRNA maduros habían sufrido *corte y empalme*, o eliminación de las secuencias no codificantes (véase la Fig. 1-9). Solo más tarde se demostró que el corte y empalme del RNA es una parte fundamental de la biogénesis de casi todos los mRNA eucariontes.

Un tipo diferente de virus, el virus de la estomatitis vesicular, sintetiza una única glucoproteína (una proteína con una cadena de hidrato de carbono adherida) que es transportada hasta la membrana plasmática y luego forma parte de la cubierta de la membrana de este virus. Los estudios de esta proteína (Figs. 14-2 y 14-3) aclararon muchos aspectos de la biogénesis de las glucoproteínas de membrana, que luego mostraron aplicarse a todas las glucoproteínas celulares.

Incluso en la actualidad, los virus son útiles en muchos aspectos de la biología celular y molecular. Muchos métodos para la manipulación genética celular dependen del uso de los virus para transmitir moléculas de DNA en las células. Para realizar esto, se reemplaza la porción del material genético viral que codifica las proteínas que son potencialmente dañinas con otro material genético, incluso con genes humanos; el adenovirus suele usarse para este propósito. Los virus alternativos, o vectores, hasta pueden entrar en la célula portando los

FIGURA 1-24 El complejo de glucoproteína distrofina (DGC) en las células de músculo esquelético.

La distrofina —la proteína defectuosa en la distrofia muscular de Duchenne— conecta el citoesqueleto de actina con el complejo multiproteico sarcoglucano en la membrana plasmática. Otras proteínas en el complejo se unen a componentes de la lámina basal, como la laminina, que, a su vez, se une a las fibras de colágeno, las cuales otorgan a la lámina basal fuerza y rigidez. Por lo tanto, la distrofina es un miembro importante de un grupo de proteínas que conectan la célula muscular y su citoesqueleto de actina interno con la lámina basal que la rodea. (Adaptado de S. J. Winder, 2001, *Trends Biochem. Sci.* 26:118, y D. E. Michele y K. P. Campbell, 2003, *J. Biol. Chem.* 278:15457.)



genes introducidos con ellos (Cap. 5). Algún día, las enfermedades causadas por genes defectuosos podrán ser tratadas usando vectores virales para introducir una copia normal de un gen defectuoso en los pacientes. La investigación actual está dedicada a superar los considerables obstáculos de este enfoque de *terapia génica*, tales como lograr que los genes introducidos funcionen en las células correctas en los momentos apropiados.

Las enfermedades genéticas aclaran aspectos importantes de la función celular

Muchas enfermedades genéticas están causadas por mutaciones en una única proteína; mediante estudios en seres humanos con estas enfermedades, se esclareció la función normal de la proteína. Por ejemplo, considérese la distrofia muscular de Duchenne (DMD), el tipo más común de enfermedades hereditarias de desgaste muscular, colectivamente denominadas “distrofias musculares”. La DMD es un trastorno ligado al cromosoma X, que afecta a 1 cada 33 000 chicos, y produce una falla respiratoria o cardíaca, en general, en la adolescencia tardía o al comienzo de los veinte años de edad. El primer indicio para comprender las bases moleculares de esta enfermedad proviene del descubrimiento de que personas con DMD portan mutaciones en el gen que codifica una proteína llamada “distrofina”. Más tarde, se encontró que esta proteína muy grande es una proteína citosólica adaptadora, que se une a los filamentos de actina, que son parte del citoesqueleto (Fig. 1-24). El ensamblaje multiproteico resultante es grande, se denomina “complejo glucoproteína distrofina” (DGC), y conecta la proteína laminina de la matriz extracelular al citoesqueleto dentro del músculo y de otros tipos de célula. Las mutaciones en la distrofina, otro componente del DGC, o en la laminina pueden interrumpir la conexión mediada por el DGC entre el interior y el exterior de las células musculares, y causar el debilitamiento muscular y, eventualmente, la muerte. El primer paso en la identificación del complejo glucoproteico distrofina involucró la clonación del gen que codifica la distrofina usando el DNA de los individuos normales y DNA de los pacientes con distrofia muscular Duchenne.

Los siguientes capítulos presentan datos experimentales que explican cómo sabemos lo que sabemos sobre la estructura y la función de las células

En los siguientes capítulos de este libro se analizan los procesos celulares con muchos más detalles. El Capítulo 2 comienza con un análisis de la naturaleza química de las unidades monoméricas de las células y de los procesos químicos básicos necesarios para comprender los procesos macromoleculares analizados en los siguientes capítulos. Se continuará con el análisis de la estructura y función de las proteínas (Cap. 3) y cómo la información para su síntesis está codificada en el DNA (Capítulo 4). El Capítulo 5 describe muchas de las técnicas usadas para estudiar los genes, la expresión génica y la función proteica. La estructura de los genes y de los cromosomas y la regulación de la expresión génica se tratan en los Capítulos 6, 7 y 8. El Capítulo 9 describe muchas de las técnicas que los biólogos usan para cultivar y fraccionar células y para visualizar proteínas y estructuras específicas dentro de las células. La estructura de la biomembrana y el transporte de iones y de pequeñas moléculas a través de las membranas son los temas de los Capítulos 10 y 11; y el Capítulo 12 analiza la energética celular y las funciones de las mitocondrias y de los cloroplastos. La biogénesis de la membrana, la secreción de proteínas y el tránsito de las proteínas —la clasificación de proteínas hacia sus destinos subcelulares correctos— son los temas de los Capítulos 13 y 14. Los Capítulos 15 y 16 analizan los muchos tipos de señales y los receptores de señales usados por las células para comunicarse y regular sus actividades. El citoesqueleto y los movimientos celulares se describen en los Capítulos 17 y 18. El Capítulo 19 trata acerca del ciclo celular y cómo se regula la división celular. Las interacciones entre las células y entre las células y la matriz extracelular que permiten la formación de los tejidos y órganos se detallan en el Capítulo 20. Los últimos capítulos de este libro analizan importantes tipos de células especializadas, las células madre (Cap. 21), las células nerviosas (Cap. 22) y las células del sistema inmunitario (Cap. 23). El Capítulo 24 se dedica al cáncer y a las múltiples formas en las cuales las mutaciones pueden alterar el crecimiento celular y la diferenciación.



Imagen microscópica de luz polarizada de cristales de colesterol. El colesterol es una molécula insoluble en agua que cumple un papel estructural crucial en muchas membranas de células animales y es un precursor para la síntesis de hormonas esteroides, de ácidos biliares y de vitamina D. El depósito del exceso de colesterol en las paredes arteriales es un paso clave en la obstrucción de las arterias: una de las principales causas de ataques cardíacos y de accidentes cerebrovasculares. (Cortesía de National High Magnetic Field Laboratory/The Florida State University.)

Fundamentos químicos

La vida de una célula depende de miles de interacciones y de reacciones químicas exquisitamente coordinadas unas con otras en tiempo y espacio, y bajo la influencia de su ambiente y de las instrucciones genéticas de la célula. Al comprender a nivel molecular estas interacciones y reacciones, podemos comenzar a responder preguntas esenciales acerca de la vida celular. ¿Cómo extrae una célula los nutrientes y la información de su entorno? ¿Cómo convierte una célula la energía almacenada en nutrientes en el trabajo de movimiento o metabolismo? ¿Cómo transforma una célula los nutrientes en los componentes celulares necesarios para sobrevivir? ¿Cómo se conecta una célula consigo misma o con otras células para formar un tejido? ¿Cómo se comunican las células entre sí de manera tal que un organismo complejo que funciona eficientemente pueda desarrollarse y prosperar? Uno de los objetivos destacados de *Biología celular y molecular* es la de responder estas y otras preguntas acerca de la estructura y función de las células y de los organismos en términos de las propiedades de las moléculas y de los iones individuales.

Por ejemplo, las propiedades de una de tales moléculas, el agua, han controlado y siguen controlando la evolución, estructura y función de todas las células. La comprensión de la biología no es posible sin apreciar cómo las propiedades del agua controlan la química de la vida. La vida surgió primero en un ambiente acuoso. Constituyendo del 70 al

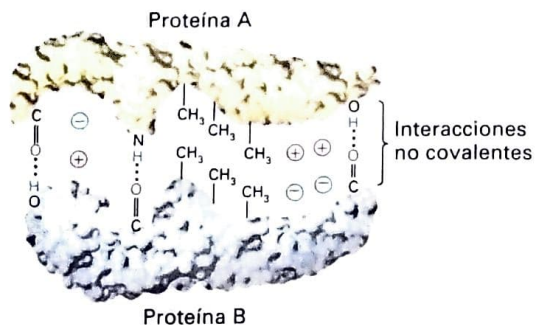
80% del peso de la mayoría de las células, el agua es la molécula más abundante en los sistemas biológicos. Es dentro de este medio acuoso que las moléculas e iones pequeños, que constituyen alrededor del 7% del peso de la materia viva, se combinan con las macromoléculas más grandes y con los ensamblajes macromoleculares que forman la maquinaria y la arquitectura de una célula y, por lo tanto, la masa restante de los organismos. Estas moléculas pequeñas incluyen aminoácidos (las unidades monoméricas de las proteínas), los nucleótidos (las unidades monoméricas del DNA y del RNA), los lípidos (las unidades monoméricas de las biomembranas), los azúcares (las unidades monoméricas de los hidratos de carbono complejos).

Muchas de las biomoléculas de la célula (p. ej., los azúcares) se disuelven rápidamente en agua; estas moléculas se denominan hidrófilas ("afinidad por el agua"). Otras (p. ej., el colesterol) son aceites, sustancias similares a grasas que rechazan el agua; se dice que son hidrófobas ("repelen el agua"). Incluso otras biomoléculas (p. ej., los fosfolípidos) contienen tanto regiones hidrófilas como hidrófobas; estas moléculas se dice que son "anfipáticas" (afinidad por ambas). Los fosfolípidos se usan para formar las membranas flexibles que rodean las células y sus orgánulos internos. El perfecto funcionamiento de las células, de los tejidos y de los organismos depende de estas moléculas, desde la más pequeña hasta la más grande. En efecto, la química del protón simple

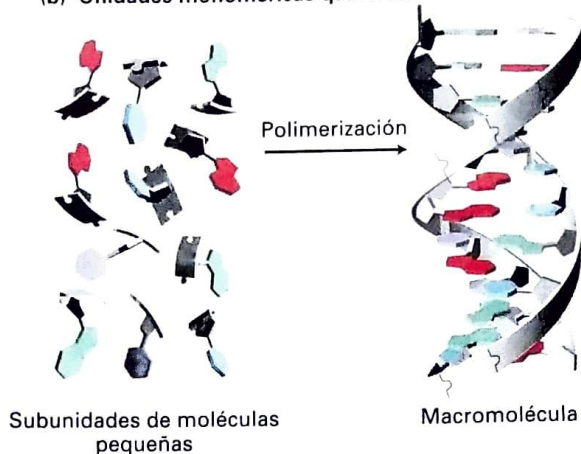
CONTENIDO

2.1	Enlaces covalentes e interacciones no covalentes	24	2.3	Reacciones químicas y equilibrio químico	43
2.2	Unidades monoméricas químicas de las células	33	2.4	Energética bioquímica	48

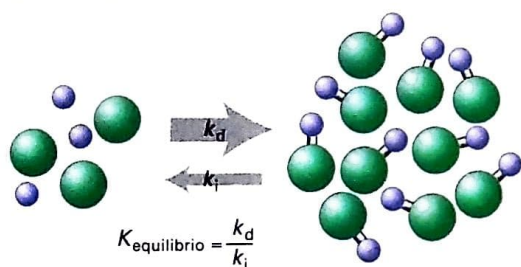
(a) Complementariedad molecular



(b) Unidades monoméricas químicas



(c) Equilibrio químico



(d) Energía de enlace químico

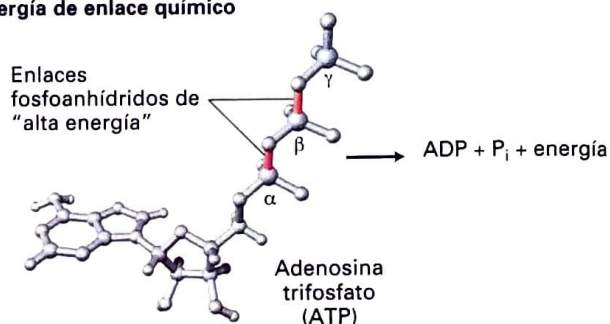


FIGURA 2-1 Química de la vida: cuatro conceptos clave. (a) La complementariedad molecular yace en el corazón de todas las interacciones biomoleculares, como cuando dos proteínas con formas y propiedades químicas complementarias se juntan para formar un complejo estrechamente unido. (b) Las moléculas pequeñas sirven como unidades monoméricas para estructuras más grandes. Por ejemplo, para generar la macromolécula de DNA portadora de información, cuatro unidades monoméricas de nucleótidos se unen covalentemente en cadenas largas (polímeros), que luego se enrollan entre sí para formar la doble hélice. (c) Las reacciones químicas son reversibles, y la distribu-

ción de los compuestos químicos entre los reactivos iniciales (*izquierda*) y los productos de las reacciones (*derecha*) dependen de las constantes de velocidad de las reacciones directa (k_d flecha superior) e inversa (k_i flecha inferior). La relación de estas, la K_{eq} , proporciona una medida informativa de las cantidades relativas de productos y reactivos que estarán presentes en el equilibrio. (d) En muchos casos, la fuente de energía para las reacciones químicas en las células es la hidrólisis de la molécula ATP. Esta energía es liberada cuando se rompe un enlace fosfoanhídrido de alta energía que une los fosforos α , β y γ en la molécula de ATP (rojo) por la adición de una molécula de agua, formando ADP y P_i .

(H^+) puede ser tan importante para la supervivencia de una célula humana como la de cada molécula gigante de DNA (¡la masa de la molécula del DNA en el cromosoma humano 1 es $8,6 \times 10^{-10}$ veces la de un protón!). Las interacciones químicas de todas estas moléculas, grandes y pequeñas, con el agua y entre sí, definen la naturaleza de la vida.

Afortunadamente, aunque muchos tipos de biomoléculas interactúan y reaccionan en numerosas y complejas vías para formar células y organismos funcionales, se necesita una cantidad relativamente pequeña de principios químicos para entender los procesos celulares a nivel molecular (Fig. 2-1). En este capítulo, se revisan estos principios clave, algunos de los cuales usted ya conoce bien. Comenzamos con los enlaces covalentes que conectan los átomos en las moléculas y con las interacciones no covalentes que estabilizan los grupos de átomos dentro de las moléculas y entre estas. A continuación, se considerarán las unidades monoméricas químicas básicas de las macromoléculas y de los ensamblajes macromoleculares. Después de repasar estos aspectos del equilibrio químico que son los más relevantes para los sistemas biológicos, se finalizará el capítulo con los principios básicos de la bioquí-

mica energética, incluyendo el papel central del ATP (adenosin trifosfato) en la captura y transferencia de energía en el metabolismo celular.

2.1 Enlaces covalentes e interacciones no covalentes

Las fuerzas de atracción fuertes y débiles entre los átomos son el “pegamento” que mantiene a las moléculas individuales juntas y permiten las interacciones entre diferentes moléculas. Cuando dos átomos comparten un único par de electrones, el resultado es un **enlace covalente**, un tipo de fuerza fuerte que mantiene juntos a los átomos en las moléculas. Al compartir múltiples pares de electrones, se producen múltiples enlaces covalentes (p. ej., enlaces “dobles” o “triples”). Las fuerzas de atracción débiles de las **interacciones no covalentes** son igualmente importantes para determinar las propiedades y funciones de las biomoléculas tales como proteínas, ácidos nucleicos, hidratos de carbono y lípidos. En esta sección, se consideran los enlaces covalentes y luego

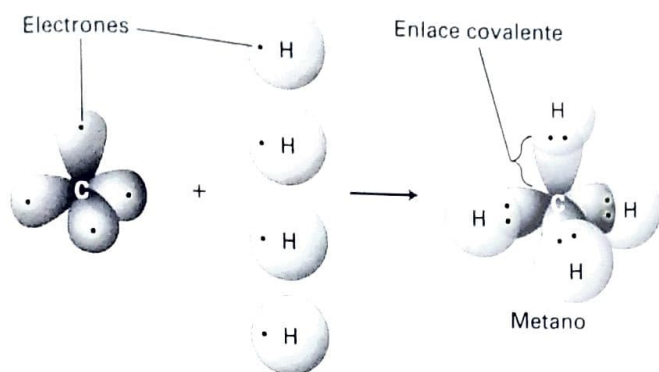


FIGURA 2-2 Los enlaces covalentes se forman al compartir los electrones. Los enlaces covalentes, las fuerzas resistentes que mantienen juntos a los átomos en las moléculas, se forman cuando los átomos comparten los electrones de los orbitales electrónicos más externos. Cada átomo forma un número definido y una geometría de enlaces covalentes.

se analizan los cuatro principales tipos de interacciones no covalentes: los enlaces iónicos, los enlaces de hidrógeno, las interacciones de Van der Waals y el efecto hidrófobo.

La estructura electrónica de un átomo determina el número y la geometría de los enlaces covalentes que puede formar

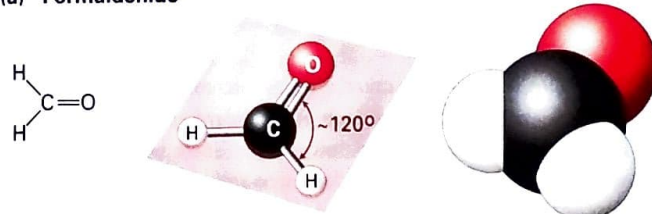
El hidrógeno, el oxígeno, el carbono, el nitrógeno, el fósforo y el azufre son los elementos más abundantes en las moléculas biológicas. Estos átomos, que raramente existen como entidades aisladas, rápidamente forman enlaces covalentes con los electrones en los orbitales electrónicos más externos que rodean al núcleo (Fig. 2-2). Como regla, cada tipo de átomo forma un número característico de enlaces covalentes con otros átomos, con una geometría bien definida que está determinada por el tamaño del átomo y tanto por la distribución de los electrones alrededor del núcleo como por el número de electrones que puede compartir. En algunos casos, el número de enlaces covalentes estables que un átomo puede formar es fijo; el carbono, por ejemplo, siempre forma cuatro enlaces covalentes. En otros casos, son posibles diferentes números de enlaces covalentes estables; por ejemplo, el azufre puede formar dos, cuatro o seis enlaces covalentes estables.

Todos las unidades monoméricas biológicas están organizadas alrededor del átomo de carbono, que forma cuatro enlaces covalentes. En estas biomoléculas orgánicas, cada carbono suele formar enlace con tres o cuatro átomos. (El carbono puede también formar enlace con dos átomos, como en la molécula lineal del dióxido de carbono, CO_2 , que tiene dos enlaces dobles carbono-oxígeno ($\text{O}=\text{C}=\text{O}$); sin embargo, tal reordenamiento de enlaces de carbono no se encuentra en las unidades monoméricas biológicas). Como se ilustra en la Figura 2-3a para el formaldehído, el carbono puede unirse a tres átomos, todos en un mismo plano. El átomo de carbono forma dos enlaces simples con dos átomos y un enlace doble (dos pares de electrones compartidos) con el tercer átomo. En ausencia de otras restricciones, los átomos unidos por un enlace simple en general pueden rotar libremente alrededor del eje de enlace, mientras que aquellos que están conectados por un enlace doble no. El plano rígido impuesto por los enlaces dobles tiene una gran

importancia para las formas y para la flexibilidad de las biomoléculas, como los fosfolípidos, las proteínas y los ácidos nucleicos.

El carbono también puede unirse a cuatro en lugar de a tres átomos. Como se ilustra con el metano (CH_4), cuando el carbono se une a otros cuatro átomos, el ángulo entre cualquiera de los dos enlaces es $109,5^\circ$ y las posiciones de los átomos que forman enlace definen los cuatro puntos de un tetraedro (Fig. 2-3b). Esta geometría define las estructuras de muchas biomoléculas. Un átomo de carbono (o cualquier otro) unido a cuatro átomos o grupos disimiles en una configuración no planar se dice que es "asimétrico". La orientación tetraédrica de los enlaces formados por un **átomo de carbono asimétrico** se puede disponer de dos maneras diferentes en el espacio tridimensional; esto produce moléculas que son imágenes especulares unas con otras, una propiedad que se denominan *quiralidad*—del griego *cheir*, que significa "mano"—(Fig. 2-4). Tales moléculas se denominan **isómeros ópticos**, o **estereoisómeros**. Muchas moléculas en las células contienen, al menos, un átomo de carbono asimétrico, a menudo llamado un átomo de *carbono quiral*. Los diferentes estereoisómeros de una molécula suelen tener actividades biológicas completamente diferentes debido al reordenamiento de átomos dentro de sus estructuras, y, por lo tanto, difieren sus capacidades para interactuar con otras moléculas.

(a) Formaldehído



(b) Metano

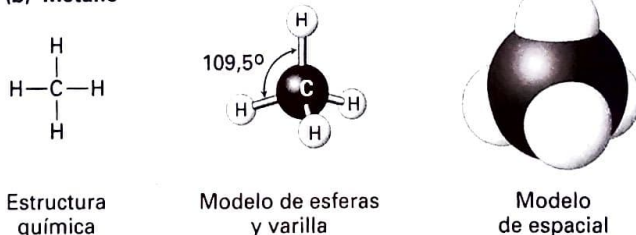


FIGURA 2-3 Geometría de enlaces cuando el carbono está unido covalentemente a otros tres o cuatro átomos. (a) Un átomo de carbono puede estar unido a tres átomos, como en el formaldehído (CH_2O). En este caso, los electrones unidos al carbono participan en dos enlaces simples y un enlace doble que yacen todos en el mismo plano. A diferencia de los átomos conectados por un enlace simple, que por lo general pueden rotar libremente alrededor del eje de enlace, aquellos conectados por un enlace doble no lo pueden hacer. (b) Cuando un átomo de carbono forma cuatro enlaces simples, como en el metano (CH_4), los átomos unidos (todos H en este caso) están orientados en el espacio con la forma de un tetraedro. La representación en letras sobre la izquierda claramente indica la composición atómica de la molécula y el patrón de enlace. El modelo de esferas y varillas en el centro ilustra el reordenamiento geométrico de los átomos y enlaces, pero los diámetros de las esferas que representan los átomos y sus electrones no enlazantes son poco realistas en comparación con las longitudes de enlace. Los tamaños de las nubes electrónicas en el modelo espacial sobre la derecha representan de forma más realista la estructura tridimensional.

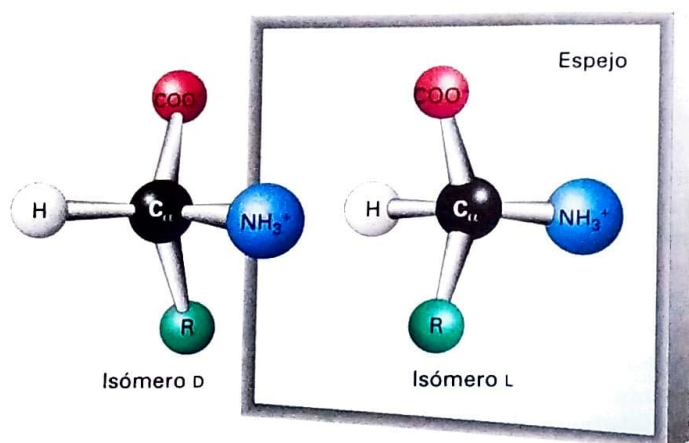


FIGURA 2-4 Estereoisómeros. Muchas moléculas en las células contienen, al menos, un átomo de carbono asimétrico. La orientación tetraédrica de los enlaces formados por un átomo de carbono asimétrico puede disponerse en el espacio tridimensional de dos formas diferentes, y producir moléculas que son imágenes especulares, o estereoisómeros, entre sí. Aquí se muestra la estructura común de un aminoácido, con su carbono asimétrico central y cuatro grupos adheridos, incluyendo el grupo R, analizado en la Sección 2-2. Los aminoácidos pueden existir en dos formas de imágenes especulares, designadas L y D. Aunque las propiedades químicas de tales estereoisómeros son idénticas, sus actividades biológicas son distintas. Solo los aminoácidos L se encuentran en las proteínas.

Algunos fármacos son mezclas de los estereoisómeros de moléculas pequeñas en las cuales un estereoisómero tiene la actividad biológica de interés. El uso de un único estereoisómero puro del químico, en lugar de la mezcla, puede dar como resultado un fármaco más potente con efectos adversos reducidos. Por ejemplo, un estereoisómero del fármaco antidepresivo citalopram (Celexa®) es 170 veces más potente que el otro. Algunos estereoisómeros tienen actividades muy diferentes. Darvon® es un calmante contra el dolor, mientras que su estereoisómero, Novrad® (*Darvon* escrito al revés), es un antitusivo. Un estereoisómero de la ketamina es un anestésico, mientras que el otro provoca alucinaciones. ■

En el Cuadro 2-1, se muestra el número típico de enlaces covalentes formados por otros átomos comunes en las biomoléculas. Un átomo de hidrógeno forma un enlace covalente solamente. Un átomo de oxígeno suele formar solo dos enlaces covalentes, pero tiene pares adicionales de electrones que pueden participar en interacciones no covalentes. El azufre forma dos enlaces covalentes en el sulfuro de hidrógeno (H_2S), pero también puede acomodar seis enlaces covalentes, como en el ácido sulfúrico (H_2SO_4) y sus derivados sulfatos. El nitrógeno y el fósforo cada uno tienen cinco electrones para compartir. En el amoníaco (NH_3), el átomo de nitrógeno forma tres enlaces covalentes; el par de electrones alrededor del átomo no involucrado en un enlace covalente puede tomar parte en interacciones no covalentes. En el ion amonio (NH_4^+), el nitrógeno forma cuatro enlaces covalentes, que tienen una geometría tetraédrica. El fósforo suele formar cinco enlaces covalentes, como en el ácido fosfórico (H_3PO_4) y sus derivados fosfatos, que forman el esqueleto de los ácidos nucleicos. Los grupos fosfatos unidos por enlaces covalentes a las proteínas cumplen una función en la regulación de la actividad de muchas proteínas; y la molécula central en la energética

Cuadro 2-1 Propiedades del enlace de los átomos más abundantes en las biomoléculas

Átomo y electrones externos	Nombre usual de enlaces covalentes	Geometría de enlace típica
H	1	
·Ö·	2	
·S·	2, 4, o 6	
·N·	3 o 4	
·P·	5	
·C·	4	

celular, el ATP, contiene tres grupos fosfatos (véase la Sección 2.4). En el Cuadro 2-2, se presenta un resumen de las uniones covalentes y de los grupos funcionales comunes, que confieren las propiedades químicas distintivas a las moléculas de las cuales son parte.

En los enlaces covalentes, los electrones pueden compartirse por igual o de manera desigual

La medida de la capacidad de un átomo para atraer un electrón se denomina **electronegatividad**. En un enlace entre átomos con electronegatividades idénticas o similares, los electrones de enlace se comparten esencialmente de forma equitativa entre los dos átomos, como es el caso para la mayoría de los enlaces simples carbono-carbono ($C-C$) y los enlaces simples carbono-hidrógeno ($C-H$). Tales enlaces se denominan **no polares**. En muchas moléculas, los átomos enlazados tienen diferentes electronegatividades, que dan como resultado una distribución desigual de electrones. El enlace entre ellos se dice que es **polar**.

Un extremo de un enlace polar tiene una carga parcial negativa (δ^-) y el otro extremo tiene una carga parcial positiva (δ^+). En un enlace $O-H$, por ejemplo, la mayor electronegatividad del átomo de oxígeno en relación con el hidrógeno da como resultado que los electrones pasen más tiempo alrededor del oxígeno que del hidrógeno. Por lo tanto, el enlace $O-H$ posee un **dipolo** eléctrico: una carga positiva separada de una carga negativa igual pero opuesta. La cantidad de carga δ^- sobre el átomo de oxígeno de un dipolo OH es aproximadamente el 25% de ese electrón, con una carga δ^+ opuesta y equivalente sobre el átomo de hidrógeno. Una medida cuantitativa común del grado de separación de la carga, o fuerza, de un dipolo se denomina el **momento dipolar** (μ), que, para un enlace químico, es el producto de la carga parcial sobre cada átomo y la distancia entre dos átomos. Para una molécula con múltiples dipolos, la cantidad de separación de carga para la molécula como un todo depende, en parte, de los momentos dipolares de todos sus enlaces químicos individuales y, en parte, de la geometría de la molécula (en relación con las orientaciones de los momentos dipolares individuales).

Considérese el ejemplo del agua (H_2O), que tiene dos enlaces $O-H$ y, por lo tanto, dos momentos dipolares de enlaces individuales. Si el

Cuadro 2-2 Grupos funcionales comunes y uniones en las biomoléculas

Grupos funcionales

—OH Hidroxilo (alcohol)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{—C—R} \end{array}$ Acilo (triacilglicerol)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{—C—} \end{array}$ Carbonilo (cetona)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{—C—O}^- \end{array}$ Carboxilo (ácido carboxílico)
—SH Sulfhidrilo (Tiol)	$\text{—NH}_2 \text{ o } \text{—NH}_3^+$ Amino (aminas)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{—O—P—O}^- \\ \\ \text{O}^- \end{array}$ Fosfato (molécula fosforilada)	$\begin{array}{c} \text{O} \quad \text{O} \\ \quad \\ \text{—O—P—O—P—} \\ \quad \\ \text{O}^- \quad \text{O}^- \end{array}$ Pirofosfato (difosfato)

Uniones

$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{—C—O—C—} \\ \quad \end{array}$ Éster	$\begin{array}{c} \text{—C—O—C—} \\ \quad \end{array}$ Éter	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{—N—C—} \\ \end{array}$ Amida
---	--	---

agua fuera una molécula lineal con los dos enlaces en lados exactamente opuestos del átomo de O, los dos dipolos en cada extremo de la molécula serían idénticos en fuerza, pero estarían orientados en direcciones opuestas. Los dos momentos dipolares se cancelarían entre sí y el momento dipolar de la molécula entera sería cero. Sin embargo, como el agua es una molécula con forma de V, con los dipolos individuales de sus dos enlaces O—H que apuntan ambos hacia el oxígeno, un extremo de la molécula de agua (el extremo con el átomo de oxígeno) tiene una carga parcial negativa y el otro extremo (el que tiene dos átomos de hidrógeno) tiene una carga parcial positiva. En consecuencia, toda la molécula es un dipolo con un momento dipolar bien definido (Fig. 2-5). Este momento dipolar y las propiedades electrónicas de los áto-

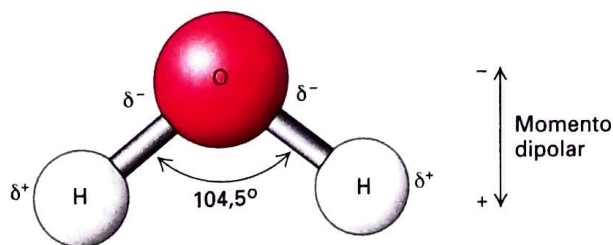
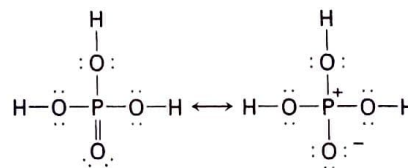


FIGURA 2-5 El dipolo natural de una molécula de agua. El símbolo δ representa una carga parcial (una carga más débil que la de un electrón o protón). Debido a la diferencia en las electronegatividades del H y del O, cada uno de los enlaces polares H—O en el agua es un dipolo. Los tamaños y las direcciones de los dipolos de cada uno de los enlaces determinan la distancia neta y la cantidad de separación de carga, o momento dipolar, de la molécula.

mos de oxígeno e hidrógeno le permiten al agua formar interacciones electrostáticas, no covalentes con otras moléculas de agua y otras moléculas diferentes. Estas interacciones cumplen un papel crucial en casi cada interacción bioquímica en las células y organismos, las cuales se analizarán brevemente.

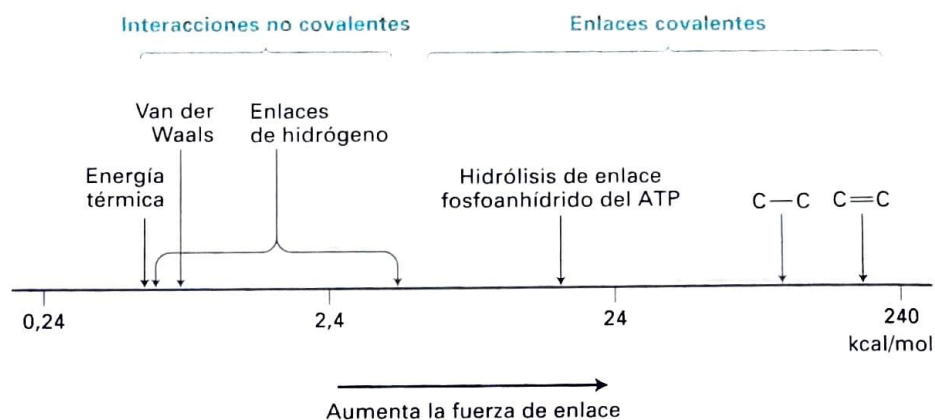
Otro ejemplo importante de polaridad es el doble enlace O=P en el H_3PO_4 (ácido fosfórico). En la estructura del H_3PO_4 , que se muestra a continuación a la izquierda, las líneas representan enlaces simples y dobles, y los electrones no enlazantes se muestran como pares de puntos:



Debido a la polaridad del doble enlace O=P, el H_3PO_4 también puede ser representado por la estructura de la derecha, en la cual uno de los electrones del enlace doble P=O se acumula sobre el átomo de O, y le otorga una carga negativa que deja al átomo de P con una carga positiva. Estas cargas son importantes en las interacciones no covalentes. Ninguno de estos dos modelos describe con precisión el estado electrónico del ácido fosfórico. La estructura verdadera se la puede considerar un intermedio, o híbrido, entre estas dos representaciones, como lo indica la flecha con puntas de doble sentido entre ellas. Estas estructuras intermedias se denominan *híbridos de resonancia*.

FIGURA 2-6 Las energías relativas de los enlaces covalentes y las interacciones no covalentes.

La energía de enlace es la energía necesaria para romper un tipo particular de unión. Aquí se muestran las energías requeridas para romper una variedad de uniones, dispuestas en una escala logarítmica. Los enlaces covalentes, incluyendo aquellos para los enlaces simples carbono-carbono ($C-C$) y los enlaces dobles ($C=C$), son una a dos potencias de 10 más fuertes que las interacciones no covalentes. Las últimas son de alguna forma mayor que la energía térmica del ambiente a temperatura ambiente normal ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$). Muchos procesos biológicos están acoplados a la energía liberada durante la hidrólisis de un enlace fosfoanhídrido en el ATP.



Los enlaces covalentes son mucho más fuertes y más estables que las interacciones no covalentes

Los enlaces covalentes son considerados fuertes debido a que las energías requeridas para romperlos son mucho más grandes que la energía térmica disponible a la temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$) o a la temperatura corporal ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$). En consecuencia, son estables a estas temperaturas. Por ejemplo, la energía térmica a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ es aproximadamente 0,6 kilocalorías por mol (kcal/mol), mientras que la energía requerida para romper el enlace $C-C$ en el etano es alrededor de 140 veces más grande (Fig. 2-6). En consecuencia, a temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$), menos de 1 en 10^{12} moléculas de etano se romperá en un par de moléculas CH_3 , cada una con un electrón no enlazante y desapareado, denominado "radical".

Los enlaces covalentes simples en las moléculas biológicas tienen energías similares a la energía del enlace $C-C$ en el etano. Debido a que en el doble enlace se comparten más electrones entre los átomos, se necesita más energía para romperlos que en un enlace simple. Por ejemplo, se necesitan 84 kcal/mol para romper un enlace simple $C-O$; pero para romper un enlace doble $C=O$, se requieren 170 kcal/mol. Los enlaces dobles más comunes en las moléculas biológicas son $C=O$, $C=N$, $C=C$ y $P=O$.

Por el contrario, la energía necesaria para romper interacciones no covalentes es de solo 1,5 kcal/mol, mucho menos que las energías de enlace de los enlaces covalentes (véase la Fig. 2-6). En efecto, las interacciones no covalentes son lo suficientemente débiles para que se estén formando y rompiendo de modo constante a temperatura ambiente. A pesar de que algunas interacciones son débiles y tienen una existencia transitoria a temperaturas fisiológicas ($25-37\text{ }^{\circ}\text{C}$), múltiples interacciones no covalentes pueden actuar juntas, como se verá más adelante, para producir asociaciones altamente estables y específicas entre las diferentes partes de una molécula grande o entre las diferentes macromoléculas. Las interacciones proteína-proteína y proteína-ácido nucleico son buenos ejemplos de interacciones no covalentes. A continuación, se repasan los cuatro principales tipos de interacciones no covalentes y luego se considerarán sus funciones en la unión de biomoléculas entre sí y a otras moléculas.

Las interacciones iónicas son atracciones entre iones de cargas opuestas

Las **interacciones iónicas** son el resultado de la atracción de un ion cargado de forma positiva, un **catión**, por un ion cargado de forma nega-

tiva, un **anión**. En el cloruro de sodio ($NaCl$), por ejemplo, el electrón de enlace aportado por el átomo de sodio es transferido por completo al átomo de cloro (Fig. 2-7a). A diferencia de los enlaces covalentes, las interacciones iónicas no tienen orientaciones geométricas específicas o fijas debido al campo electrostático que rodea a un ion —su atracción por una carga opuesta— es uniforme en todas las direcciones. En el $NaCl$ sólido, los iones con cargas opuestas se empaquetan fuertemente en un patrón alternativo, que forma la matriz cristalina altamente ordenada típica de los cristales de sal (Fig. 2-7b). La energía necesaria para romper una interacción iónica depende de la distancia entre los iones y de las propiedades eléctricas del ambiente de los iones.

Cuando las sales se disuelven en agua, los iones se separan unos de otros y se estabilizan por sus interacciones con las moléculas de agua. En soluciones acuosas, los iones simples de significancia biológica, como el Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} y Cl^- , están hidratados, rodeados por una cubierta estable de moléculas de agua que se mantienen en su lugar mediante las interacciones entre el ion central y los extremos de carga opuesta del dipolo de agua (Fig. 2-7c). La mayoría de los compuestos iónicos se disuelven rápidamente en agua debido a que la energía de hidratación —la energía liberada cuando los iones fuertemente unidos a las moléculas de agua se diseminan en una solución acuosa— es mayor que la energía reticular que estabiliza la estructura de cristal. Parte o la totalidad de la *cubierta de hidratación* acuosa debe ser eliminada de los iones cuando estos interactúan con las proteínas. Por ejemplo, el agua de la hidratación se pierde cuando los iones pasan a través de los poros formados por proteínas en la membrana celular durante la conducción nerviosa.

La fuerza relativa de la interacción entre dos iones de carga opuesta, A^- y C^+ , depende de la concentración de otros iones en la solución. A mayor concentración de otros iones (p. ej., Na^+ y Cl^-), más oportunidades tienen A^- y C^+ de interactuar de forma iónica con estos otros iones; y, por ende, la energía que se necesita para romper la interacción entre A^- y C^+ es menor. Como resultado, el incremento de la concentración de sales —como $NaCl$ en una solución de moléculas biológicas— puede debilitar, e incluso interrumpir, las interacciones iónicas que mantienen unidas a estas biomoléculas.

Los enlaces de hidrógeno son interacciones no covalentes que determinan la solubilidad en agua de moléculas sin carga

Un **enlace de hidrógeno** es la interacción de un átomo de hidrógeno con una carga parcial positiva en un dipolo molecular, como el agua,

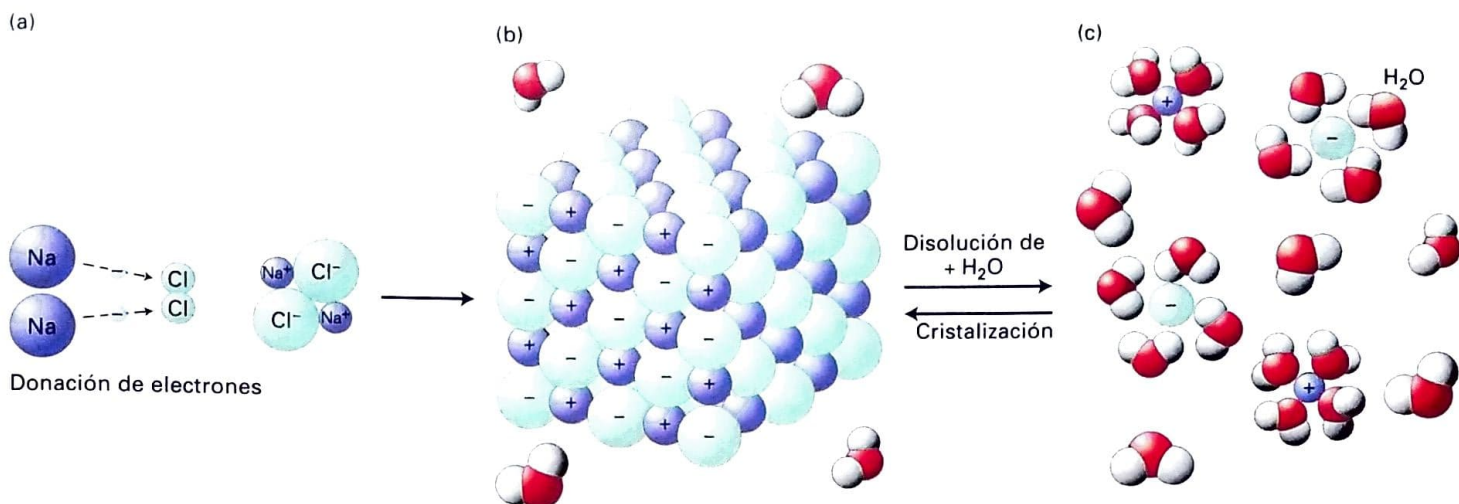
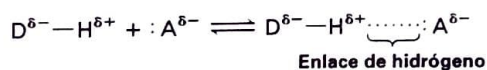


FIGURA 2-7 Interacciones electrostáticas de iones de carga opuesta de sal (NaCl) en cristales y en solución acuosa. (a) En la sal de mesa cristalina, los átomos de sodio son iones cargados positivamente (Na⁺) debido a la pérdida de un electrón en cada uno, mientras que los átomos de cloro están cargados negativamente (Cl⁻) al ganar un electrón cada uno. (b) En la forma sólida, los compuestos iónicos forman una disposición netamente ordenada, o cristales, de iones estrechamente empaquetados, en los cuales los iones cargados positiva

y negativamente se compensan unos con otros. (c) Cuando los cristales se disuelven en agua, los iones se separan y sus cargas, ya no compensadas por los iones de carga opuesta inmediatamente adyacentes, se estabilizan mediante interacciones con el agua polar. Las moléculas de agua y los iones se mantienen juntos por interacciones electrostáticas entre las cargas sobre el ion y las cargas parciales sobre los átomos de oxígeno e hidrógeno del agua. En solución acuosa, todos los iones están rodeados por una capa de hidratación de moléculas de agua.

con electrones desapareados de otro átomo, ya sea en la misma molécula o en una diferente. Normalmente, un átomo de hidrógeno forma un enlace covalente con un solo átomo diferente. Sin embargo, un átomo de hidrógeno unido de forma covalente a un átomo electronegativo donador D puede formar una asociación débil adicional, el enlace de hidrógeno, con un átomo aceptor A, que debe tener un par de electrones no enlazantes disponibles para la interacción.



La longitud del enlace D—H es apenas mayor de lo que sería si no hubiera enlace de hidrógeno, debido a que el aceptor “tira” del hidrógeno

y lo aleja del donador. Una característica importante de todos los enlaces de hidrógeno es la direccionalidad. En los enlaces de hidrógeno más fuertes, el átomo donador, el átomo de hidrógeno y el átomo aceptor se encuentran en la misma línea. Los enlaces de hidrógeno no lineales son más débiles que los lineales; incluso así, los múltiples enlaces de hidrógeno no lineales ayudan a estabilizar las estructuras tridimensionales de muchas proteínas.

Los enlaces de hidrógeno son más largos y más débiles que los enlaces covalentes entre los mismos átomos. En el agua, por ejemplo, la distancia entre los núcleos de los átomos de hidrógeno y de oxígeno adyacentes, en las moléculas con enlaces de hidrógeno, es alrededor de 0,27 nm, casi el doble de longitud que los enlaces covalentes O—H dentro de una única molécula de agua (Fig. 2-8a). La fuerza de un enlace de hidrógeno entre moléculas de agua (aproximadamente, 5 kcal/mol) es

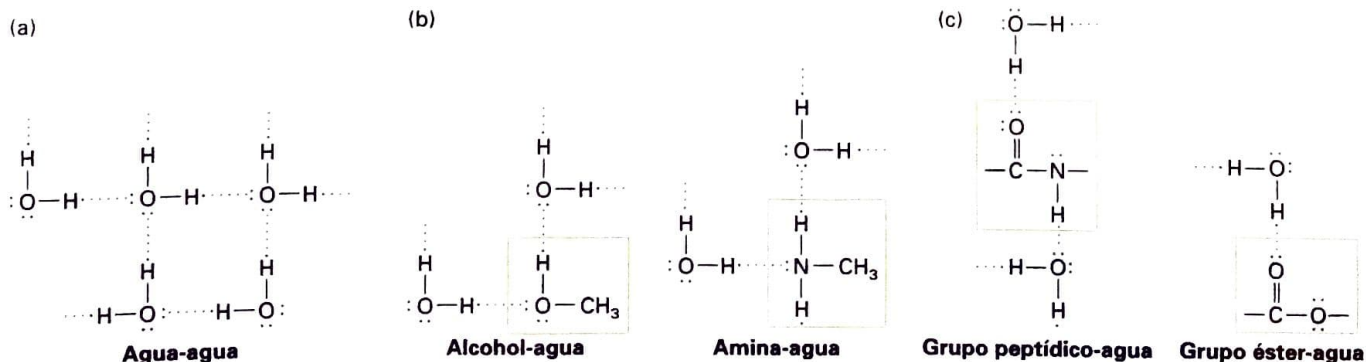
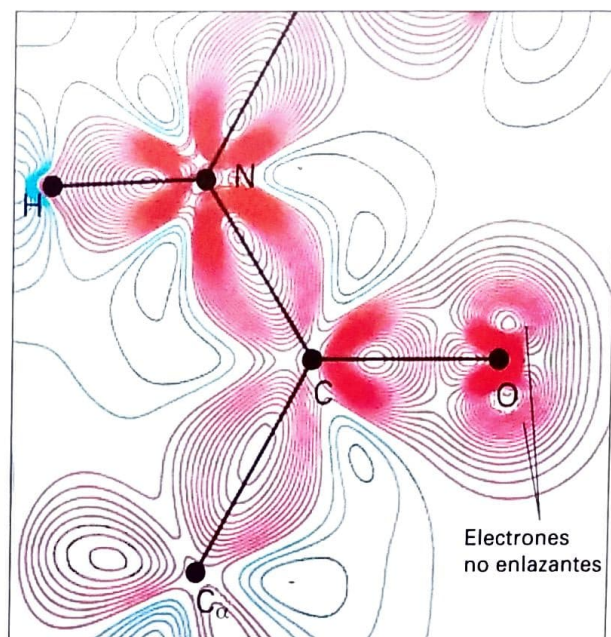


FIGURA 2-8 Enlace de hidrógeno del agua consigo mismo y con otros compuestos. Cada par de electrones externos no enlazantes en un átomo de oxígeno o de nitrógeno puede aceptar un átomo de hidrógeno en un enlace de hidrógeno. Los grupos hidroxilos y amino también pueden formar enlaces de hidrógeno con el agua. (a) En el agua líquida, cada molécula de agua forma enlaces de hidrógeno transitorios con varias otras, y crean así una red dinámica

de moléculas unidas al hidrógeno. (b) El agua también puede formar enlaces de hidrógeno con los alcoholes y las aminas, y dar cuenta de la alta solubilidad de estos compuestos. (c) El grupo peptídico y el grupo éster, que están presentes en muchas biomoléculas, suelen participar en enlaces de hidrógeno con el agua o con grupos polares en otras moléculas.

FIGURA 2-9 Distribución de los electrones enlazantes y no enlazantes en el grupo peptídico. Aquí se muestra un enlace peptídico que une dos aminoácidos dentro de una proteína llamada "crambina". Ninguna proteína ha sido caracterizada estructuralmente a tan alta resolución como la crambina. Las líneas negras representan los enlaces covalentes entre átomos. Las líneas de color rojo (negativas) y azul (positivas) representan los contornos de cargas determinadas mediante cristalografía de rayos X y métodos computacionales. A mayor número de líneas de contorno, mayor es la carga. La alta densidad de las líneas de contorno rojo entre los átomos representa a los enlaces covalentes (pares de electrones compartidos). Los dos grupos de líneas de contorno rojo que emanan desde el oxígeno (O) y no caen sobre un enlace covalente (línea negra) representan los dos pares de electrones no enlazantes sobre el oxígeno que están disponibles para participar en enlaces de hidrógeno. La alta densidad de las líneas de contorno azul cerca del hidrógeno (H) unido al nitrógeno (N) representa una carga parcial positiva, e indica que este H puede actuar como donante del enlace de hidrógeno. [De C. Kescky y cols., 2000, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 97:3171. Cortesía de M. M. Teeter.]



mucho más débil que un enlace covalente O—H (alrededor de 110 kcal/mol), aunque es mayor que para muchos otros enlaces de hidrógeno en las moléculas biológicas (1-2 kcal/mol). El extenso enlace de hidrógeno intermolecular entre moléculas de agua es responsable de muchas de sus propiedades clave, que incluyen sus inusualmente elevados puntos de fusión y ebullición, y su capacidad para disolver muchas otras moléculas.

La solubilidad de sustancias sin cargas en un entorno acuoso depende en gran medida de su capacidad para formar enlaces de hidrógeno con el agua. Por ejemplo, el grupo hidroxilo (—OH) en un alcohol (XCH_2OH) y el grupo amino (— NH_2) en las aminas (XCH_2NH_2) pueden formar varios enlaces de hidrógeno con el agua, los cuales permiten que estas moléculas se disuelvan en agua a altas concentraciones (Fig. 2-8b). En general, las moléculas con enlaces polares que fácilmente forman enlaces de hidrógeno con agua, y también con moléculas e iones cargados que interactúan con el dipolo del agua, pueden disolverse rápidamente en agua; es decir, son hidrófilas. Muchas moléculas biológicas contienen, además de los grupos hidroxilo y amino, péptidos y grupos ésteres que forman enlaces de hidrógeno con el agua mediante otro tipo de electrones no enlazantes sobre los oxígeno de sus carbonilos (Fig. 2-8c). La cristalografía de rayos X combinada con el análisis computacional permite una representación precisa de la distribución de los electrones no enlazantes más externos de átomos y también de los electrones en los enlaces covalentes, como se ilustra en la Figura 2-9.

Las interacciones de van der Waals son de atracción débil y causadas por dipolos transitorios

Cuando dos átomos cualesquiera se acercan mucho, crean una fuerza de atracción débil no específica que se denomina **interacción de van der Waals**. Estas interacciones no específicas son el resultado de fluctuaciones aleatorias momentáneas en la distribución de los electrones de cualquier átomo, lo cual da origen a una distribución transitoria desigual de electrones. Si dos átomos unidos por un enlace no covalente están lo suficientemente cerca, los electrones de un átomo pertur-

barán los electrones del otro. Estas perturbaciones generan un dipolo transitorio en el segundo átomo, y los dos dipolos se atraerán entre sí débilmente (Fig. 2-10). Similarmente, un enlace covalente polar en una molécula atraerá un dipolo con orientación opuesta en otro.

Las interacciones de van der Waals involucran dipolos eléctricos, inducidos ya sea de forma transitoria o permanente, se producen en todos los tipos de moléculas, tanto polares como no polares. En particular, las interacciones de van der Waals son responsables de la cohesión entre moléculas no polares como el heptano, $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_5-\text{CH}_3$, que

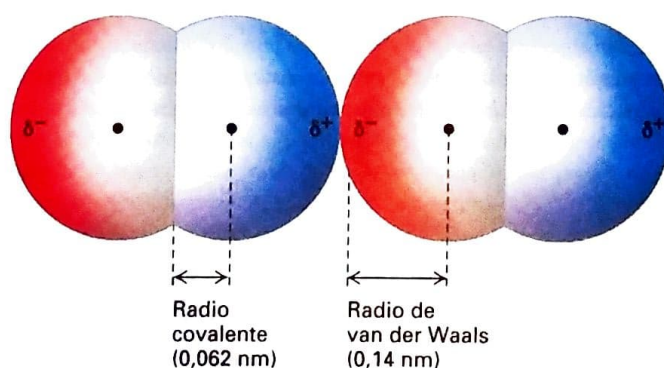


FIGURA 2-10 Dos moléculas de oxígeno en el contacto de van der Waals. En este modelo, el color rojo indica carga negativa y el azul indica carga positiva. Los dipolos transitorios en las nubes electrónicas de todos los átomos dan origen a las fuerzas de atracción débiles, llamadas "interacciones de van der Waals". Cada tipo de átomo tiene un radio de van der Waals característico al cual las interacciones de van der Waals con otros átomos son óptimas. Debido a que los átomos se repelen unos con otros si están lo suficientemente cerca para que sus electrones más externos se superpongan sin ser compartidos en un enlace covalente, el radio de van der Waals es una medida del tamaño de la nube electrónica que rodea al átomo. El radio covalente indicado aquí es para el enlace doble $\text{O}=\text{O}$; el radio del enlace covalente simple del oxígeno es ligeramente más largo.

no pueden formar enlaces de hidrógeno o interacciones iónicas entre sí. La fuerza de las interacciones de van der Waals disminuyen rápidamente con el aumento de la distancia; por lo tanto, estas interacciones no covalentes se pueden formar solo cuando los átomos están lo bastante cerca unos de otros. Sin embargo, si los átomos se acercan demasiado, las cargas negativas de sus electrones crean una fuerza repulsiva. Cuando la atracción de van der Waals entre dos átomos equilibra exactamente la repulsión entre sus dos nubes de electrones, se dice que los átomos están “en contacto van der Waals”. La fuerza de la interacción de van der Waals es de alrededor de 1 kcal/mol, más débil que los enlaces de hidrógeno típicos y solo levemente mayor que la energía térmica promedio de las moléculas a 25 °C. Por lo tanto, múltiples interacciones de van der Waals, una interacción de van der Waals junto con otras interacciones no covalentes, o ambas, son necesarias para formar atracciones estables dentro y entre las moléculas.

El efecto hidrófobo hace que las moléculas no polares se adhieran entre sí

Debido a que las moléculas no polares no contienen grupos cargados, no poseen un momento dipolar, ni se hidratan, son insolubles o casi insolubles en agua; es decir, son hidrófobas. Los enlaces covalentes entre dos átomos de carbono y entre los átomos de hidrógeno y carbono son los enlaces no polares más comunes en los sistemas biológicos. Los **hidrocarburos** —moléculas formadas solo de carbono e hidrógeno— son virtualmente insolubles en agua. Los triacilglicerolos grandes (también conocidos como “triglicéridos”), que forman parte de las grasas animales y de los aceites vegetales, también son insolubles en agua. Como se verá más adelante, la parte principal de estas moléculas consiste en cadenas hidrocarbonadas largas. Después de agitarlos en agua, los triacilglicerolos forman una fase separada. Un ejemplo familiar es la separación del aceite y el vinagre con base acuosa en un aderezo para ensalada.

Las moléculas no polares y las partes no polares de las moléculas tienden a agregarse en agua porque obedecen al fenómeno llamado **efecto hidrófobo**. Debido a que las moléculas de agua no pueden formar enlaces de hidrógeno con sustancias no polares, tienden a formar “jaulas” relativamente rígidas de pentágonos y hexágonos unidos por enlaces de hidrógeno alrededor de las moléculas no polares (Fig. 2-11, izquierda). El estado es energéticamente desfavorable debido a que disminuye la entropía, o aleatoriedad, de la población de moléculas de agua. (El papel de la entropía en los sistemas químicos se analiza en la Sección 2.4). Si las moléculas no polares en un ambiente acuoso se agregan con sus superficies hidrófobas enfrentadas unas con otras, se reduce la superficie hidrófoba expuesta al agua (Fig. 2-11, derecha). En consecuencia, se necesita menos agua para formar las jaulas alrededor de las moléculas no polares, aumenta la entropía en relación con el estado sin agregación, y se alcanza un estado menos favorable de energía. En cierto sentido, entonces, el agua aprieta las moléculas no polares hacia la formación espontánea de agregados. En lugar de constituir una fuerza de atracción, como en los enlaces de hidrógeno, el efecto hidrófobo es la consecuencia de evitar un estado inestable, es decir, de evitar las amplias jaulas de agua alrededor de las moléculas no polares individuales.

Las moléculas no polares también se pueden asociar, aunque débilmente, a través de las interacciones de van der Waals. El resultado neto del efecto hidrófobo y de las interacciones de van der Waals es una tendencia muy poderosa a que las moléculas hidrófobas interactúen entre

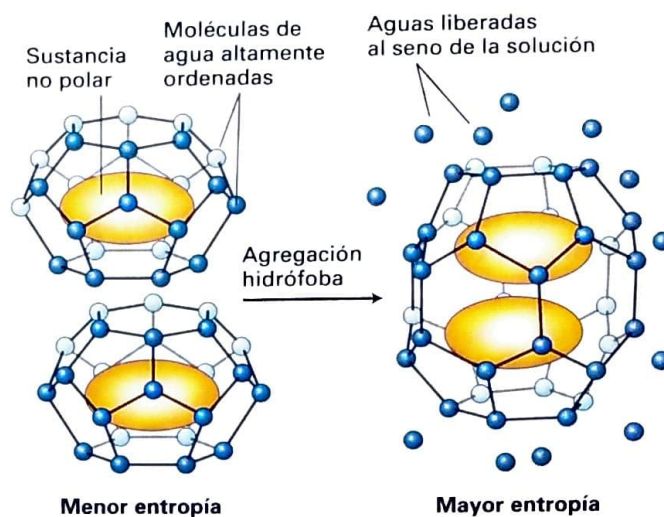


FIGURA 2-11 Descripción esquemática del efecto hidrófobo. Las jaulas de moléculas de agua que se forman alrededor de las moléculas no polares en solución son más ordenadas que las moléculas de agua formadas en el líquido de los alrededores. La agregación de las moléculas no polares reduce la cantidad de moléculas de agua involucradas en las jaulas altamente ordenadas, y da como resultado una mayor entropía, un estado más favorable desde el punto de vista energético (*derecha*), en comparación con el estado sin agregación (*izquierda*).

sí, no con el agua. En pocas palabras, *lo igual disuelve lo igual*. Las moléculas polares se disuelven en solventes polares, como el agua; las moléculas no polares se disuelven en solventes no polares, como el hexano.



Una molécula hidrófoba bien conocida es el colesterol (véase la estructura en la Sección 2.2). El colesterol, y también los triglicéridos y otras moléculas pobremente solubles en agua, se denominan “lípidos”. A diferencia de las moléculas hidrófilas, como la glucosa o los aminoácidos, los lípidos no pueden disolverse rápidamente en la sangre, que es un sistema circulatorio acuoso para el transporte de las moléculas y de las células a través del cuerpo. En su lugar, los lípidos como el colesterol deben ser empaquetados en transportadores hidrófilos que se pueden disolver en la sangre y ser transportados a través de todo el cuerpo. Puede haber cientos de miles de lípidos empaquetados en el centro de cada transportador. El centro hidrófobo está rodeado por moléculas anfipáticas que tienen partes hidrófilas que interactúan con el agua y partes hidrófobas que interactúan entre sí y con el centro. El empaquetamiento de estos lípidos en transportadores especiales, denominados “lipoproteínas” (se analizan en el Cap. 14), permite su transporte eficiente en la sangre y evoca a los contenedores de carga para el transporte eficiente de larga distancia en barcos de carga, trenes y camiones. La lipoproteína de alta densidad (HDL) y la lipoproteína de baja densidad (LDL) son dos transportadores de lipoproteínas que están asociados con una disminución o un incremento de enfermedad cardíaca, respectivamente, y, por lo tanto, suelen llamárselos colesterol “bueno” y “malo”. En la actualidad, las moléculas de colesterol y sus derivados que son transportados tanto por la HDL como por la LDL son esencialmente idénticas y, en sí mismas, ni “buenas” ni “malas”. Sin embargo, la HDL y la LDL tienen diferentes efectos en la célula: la LDL contribuye al taponamiento de las arterias (conocido como *aterosclerosis*).

sis), a las correspondientes enfermedades cardíacas y al accidente cerebrovascular, mientras que la HDL protege contra esta enfermedad. Por lo tanto, se conoce la LDL como el “colesterol malo”.■

La complementariedad molecular, debido a las interacciones no covalentes, conduce a un ajuste del tipo llave y cerradura entre las biomoléculas

Tanto dentro como fuera de las células, los iones y moléculas constantemente colisionan. Cuanto mayor es la concentración de cualquiera de dos tipos de moléculas, mayor es la probabilidad de que se encuentren entre sí. Cuando dos moléculas se encuentran una con otra, lo más probable es que reboten una contra la otra debido a que las interacciones no covalentes que las mantienen unidas son débiles y tienen existencia transitoria a temperaturas fisiológicas. Sin embargo, las moléculas que exhiben **complementariedad molecular** —una clase de ajuste del tipo llave y cerradura— entre sus formas, cargas u otras propiedades físicas pueden formar múltiples interacciones no covalentes a corta distancia. Cuando dos tales moléculas con complementariedad estructural chocan entre sí, estas múltiples interacciones provocan que se mantengan juntas, o unidas.

En la Figura 2-12, se ilustra cómo múltiples interacciones débiles diferentes pueden producir que dos moléculas se unan fuertemente. Casi cualquier otro reordenamiento de los mismos grupos en dos superficies no permitirá que las moléculas se unan así tan fuertemente. Tal complementariedad molecular entre regiones dentro de una molécula de proteína le permite plegarse en una forma tridimensional única (véase el Cap. 3); también es lo que mantiene juntas a las dos cadenas de DNA en la doble hélice (véase el Cap. 4). Otras interac-

ciones similares subyacen en la asociación de grupos de moléculas en ensamblados multimoleculares, o complejos, que llevan, por ejemplo, a la formación de las fibras moleculares, a las asociaciones del tipo pegamento entre las células en los tejidos sólidos, así como para otras numerosas estructuras celulares.

Sobre la base del número y de la fuerza de las interacciones no covalentes entre las dos moléculas y de su entorno, sus uniones pueden ser ajustadas o laxas, y, en consecuencia, de larga duración o transitorias. Cuanto mayor es la *afinidad* de dos moléculas para cada una, mejor será el “ajuste” entre ellas; cuantas más interacciones no covalentes puedan formar, más apretadas se podrán unir entre sí. Una medida cuantitativa importante de la afinidad es la constante de disociación de unión K_d , que se describe más adelante.

Como se analiza en el Capítulo 3, casi todas las reacciones químicas que se producen en las células dependen de las propiedades de unión de las enzimas. Estas proteínas no solo aceleran, o catalizan, las reacciones, sino que también lo hacen a un elevado grado de *especificidad*: un reflejo de su capacidad de unión fuertemente a solo una o a unas pocas moléculas relacionadas. La especificidad de interacciones y reacciones, las cuales dependen de la complementariedad molecular, es esencial para muchos procesos cruciales de la vida.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 2.1

Enlaces covalentes e interacciones no covalentes

- Los enlaces covalentes consisten en pares de electrones compartidos por dos átomos. Los enlaces covalentes reordenan los átomos de una molécula en una geometría específica.
- Los enlaces covalentes son estables en los sistemas biológicos debido a que las energías relativamente elevadas necesarias para romperlos (50-200 kcal/mol) son mucho más grandes que la energía cinética térmica disponible a temperatura ambiente (25 °C) o a temperatura corporal (37 °C).
- Muchas moléculas en las células contienen al menos un átomo de carbono asimétrico, que está unido a cuatro átomos disímiles. Tales moléculas pueden existir como isómeros ópticos (imágenes especulares), designadas como D y L (véase la Fig. 2-4), que tienen actividades biológicas diferentes. En sistemas biológicos, casi todos los azúcares son isómeros D, mientras casi todos los aminoácidos son isómeros L.
- Los electrones pueden compartirse por igual o de manera desigual en los enlaces covalentes. Los átomos que difieren en electronegatividad forman enlaces covalentes polares, en los cuales los electrones se distribuyen de manera desigual. Un extremo del enlace polar tiene una carga parcial positiva y el otro extremo tiene una carga parcial negativa (Fig. 2-5).
- Las interacciones no covalentes entre los átomos son considerablemente más débiles que los enlaces covalentes, con energías que varían entre 1-5 kcal/mol (véase la Fig. 2-6).
- En los sistemas biológicos, existen cuatro tipos principales de interacciones no covalentes: enlaces iónicos, enlaces de hidrógeno, interacciones de van der Waals e interacciones debido al efecto hidrófobo.
- Los enlaces iónicos se producen a partir de la atracción electrostática entre las cargas positivas y negativas de los iones. En soluciones

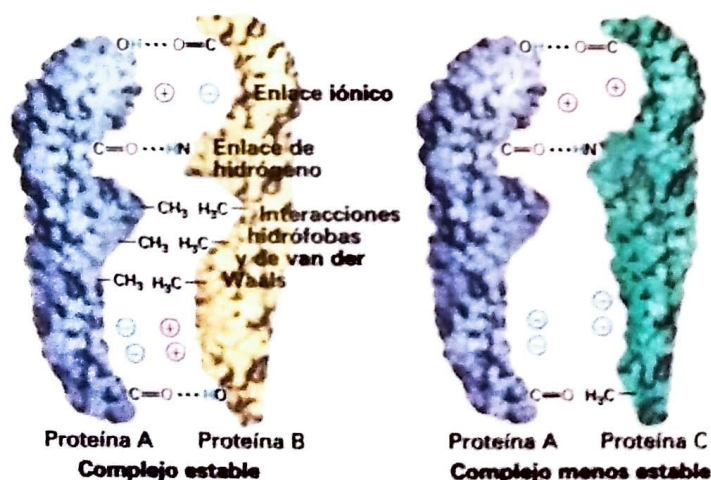


FIGURA 2-12 La complementariedad molecular permite un enlace fuerte de proteínas a través de múltiples interacciones no covalentes. La complementariedad de las formas, las cargas, la polaridad y la hidrofobicidad de dos superficies proteicas permiten múltiples interacciones débiles, las cuales, en combinación, producen una interacción fuerte y una unión estrecha. Debido a las derivaciones de la complementariedad molecular que debilitan sustancialmente la unión, una región de superficie particular de cualquier biomolécula dada por lo general puede unirse fuertemente a solo una o una cantidad muy limitada de otras moléculas. La complementariedad de dos moléculas de proteínas a la izquierda les permite unirse mucho más estrechamente que las dos proteínas no complementarias de la derecha.

acuosa, todos los cationes y los aniones están rodeados por una capa de moléculas de agua unidas (véase la Fig. 2-7c). El aumento de la concentración salina (p. ej., NaCl) de una solución puede debilitar la fuerza relativa e incluso romper los enlaces iónicos entre biomoléculas.

- En un enlace de hidrógeno, un átomo de hidrógeno que está unido de forma covalente a un átomo electronegativo asociado con un átomo aceptor cuyos electrones no enlazantes atraen el hidrógeno (véase la Fig. 2-8).
- Las interacciones de van der Waals débiles y relativamente inespecíficas se producen a partir de la atracción entre dipolos transitorios asociados con todas las moléculas. Estas interacciones se forman cuando dos átomos se aproximan mucho mutuamente (véase la Fig. 2-10).
- En un entorno acuoso, las moléculas no polares o las partes no polares de moléculas grandes son conducidas por el efecto hidrófobo, y reducen así la extensión de su contacto directo con las moléculas de agua (véase la Fig. 2-11).
- La complementariedad molecular es un ajuste del tipo llave y cerradura entre las moléculas cuyas formas, cargas y otras propiedades físicas son complementarias. Las múltiples interacciones no covalentes se pueden formar entre las moléculas complementarias, en las cuales se produce una unión muy estrecha (véase la Fig. 2-12), pero no entre moléculas que no son complementarias.
- El alto grado de especificidad de unión que resulta de la complementariedad molecular es una de las características que subyace en las interacciones intermoleculares en biología y, por lo tanto, es esencial para muchos procesos cruciales de la vida.

2.2 Unidades monoméricas químicas de las células

Un tema común en biología es la construcción de **macromoléculas** grandes y de estructuras macromoleculares a partir de subunidades moleculares más pequeñas. Con frecuencia, estas subunidades son similares o idénticas. Las tres principales clases de macromoléculas biológicas —**proteínas**, **ácidos nucleicos** y **polisacáridos**— son polímeros que están compuestos por múltiples unidades monoméricas, o **monómeros**, conectadas por uniones covalentes (Fig. 2-13). Las proteínas son polímeros lineales que contienen alrededor de 10 a varios miles de aminoácidos unidos por **enlaces peptídicos**. Los ácidos nucleicos son polímeros lineales que contienen cientos de millones de nucleótidos conectados por **enlaces fosfodiéster**. Los polisacáridos son polímeros lineales o ramificados de monosacáridos (azúcares) que se unen mediante **enlaces glucosídicos**, como la glucosa. Aunque los mecanismos reales de formación de enlaces covalentes entre monómeros son complejos (se analizarán más adelante), la formación de un enlace covalente entre dos moléculas de monómero suele involucrar las pérdidas netas de un hidrógeno (H) desde un monómero, y de un hidroxilo (OH) desde el otro monómero —o las pérdidas netas de una molécula de agua— y puede, por lo tanto, pensarse como una **reacción de deshidratación**. La ruptura, o escisión, de este enlace en el polímero que libera una subunidad monomérica involucra la reacción inversa o la adición del agua, llamada **hidrólisis**. Estos enlaces que

conectan los monómeros son normalmente estables en condiciones biológicas normales (p. ej., 37 °C, pH neutro), y, por lo tanto, estos biopolímeros son estables y pueden llevar a cabo una amplia variedad de tareas en las células, como almacenar información, catalizar reacciones químicas, servir como elementos estructurales en la definición de la forma y movimiento celular y muchas otras.

Las estructuras macromoleculares también pueden ensamblarse y usar interacciones no covalentes. La estructura de “bicapa” de las membranas celulares se construye mediante el ensamblado de muchos miles de pequeñas moléculas denominadas “fosfolípidos” (véase la Fig. 2-13). En este capítulo, nos centramos en las unidades monoméricas químicas que constituyen las células —aminoácidos, nucleótidos, azúcares y fosfolípidos—. La estructura, la función y el ensamblado de proteínas, ácidos nucleicos, polisacáridos y biomembranas se analizan en los siguientes capítulos.

Los aminoácidos que componen las proteínas solo difieren en sus cadenas laterales

Las unidades monoméricas de las proteínas son los 20 **aminoácidos**, que, cuando se incorporan en un polímero de proteína, se los denomina **residuos**. Todos los aminoácidos tienen una estructura característica que consiste en un **átomo de carbono alfa** central (C_α) unido a cuatro grupos químicos diferentes: un grupo amino (NH_2), un carboxilo o ácido carboxílico ($COOH$) (por ende, el nombre de *amino ácido*), un átomo de hidrógeno (H) y un grupo variable, llamado **cadena lateral** o **grupo R**. Debido a que el carbono α en todos los aminoácidos, excepto en la glicina, es asimétrico, estas moléculas pueden existir en dos formas, que son imágenes especulares que por convención, se denominan isómeros D (dextro) y L (levo) (véase la Fig. 2-4). Los dos isómeros no pueden convertirse o sustituirse uno en el otro sin romper y volver a formar un enlace químico en uno de ellos. Con excepciones raras, solo los aminoácidos con la forma L se encuentran en las proteínas. Sin embargo, los aminoácidos D prevalecen en las paredes bacterianas y en otros productos microbianos.

Para comprender las estructuras tridimensionales y las funciones de las proteínas, analizadas en detalle en el Capítulo 3, hay que estar familiarizado con algunas de las propiedades distintivas de los aminoácidos, que están determinadas, en parte, por sus cadenas laterales. No es necesario memorizar en detalle la estructura de cada tipo de cadena lateral para comprender cómo las proteínas funcionan, debido a que los aminoácidos se pueden clasificar en diversas categorías sobre la base de su tamaño, forma, carga, hidrofobicidad (una medida de la solubilidad en agua) y reactividad química de las cadenas laterales (Fig. 2-14). Sin embargo, se debe estar familiarizado con las propiedades generales de cada categoría.

Los aminoácidos con cadenas laterales no polares se denominan “hidrófobos” y son poco solubles en agua. A mayor tamaño de la cadena lateral no polar, más hidrófobo es el aminoácido. Las cadenas laterales de la *alanina*, *valina*, *leucina* e *isoleucina* son hidrocarburos lineales o ramificados que no forman un anillo y, por lo tanto, se denominan “aminoácidos alifáticos”. Estos aminoácidos son todos no polares, como lo es la *metionina*, que es similar, excepto que contiene un átomo de azufre. La *fenilalanina*, la *tirosina* y el *triptófano* tienen anillos aromáticos grandes e hidrófobos en sus cadenas laterales. En los últimos capítulos, se analizará en detalle cómo las cadenas laterales hidrófobas bajo la influencia del efecto hidrófobo suelen

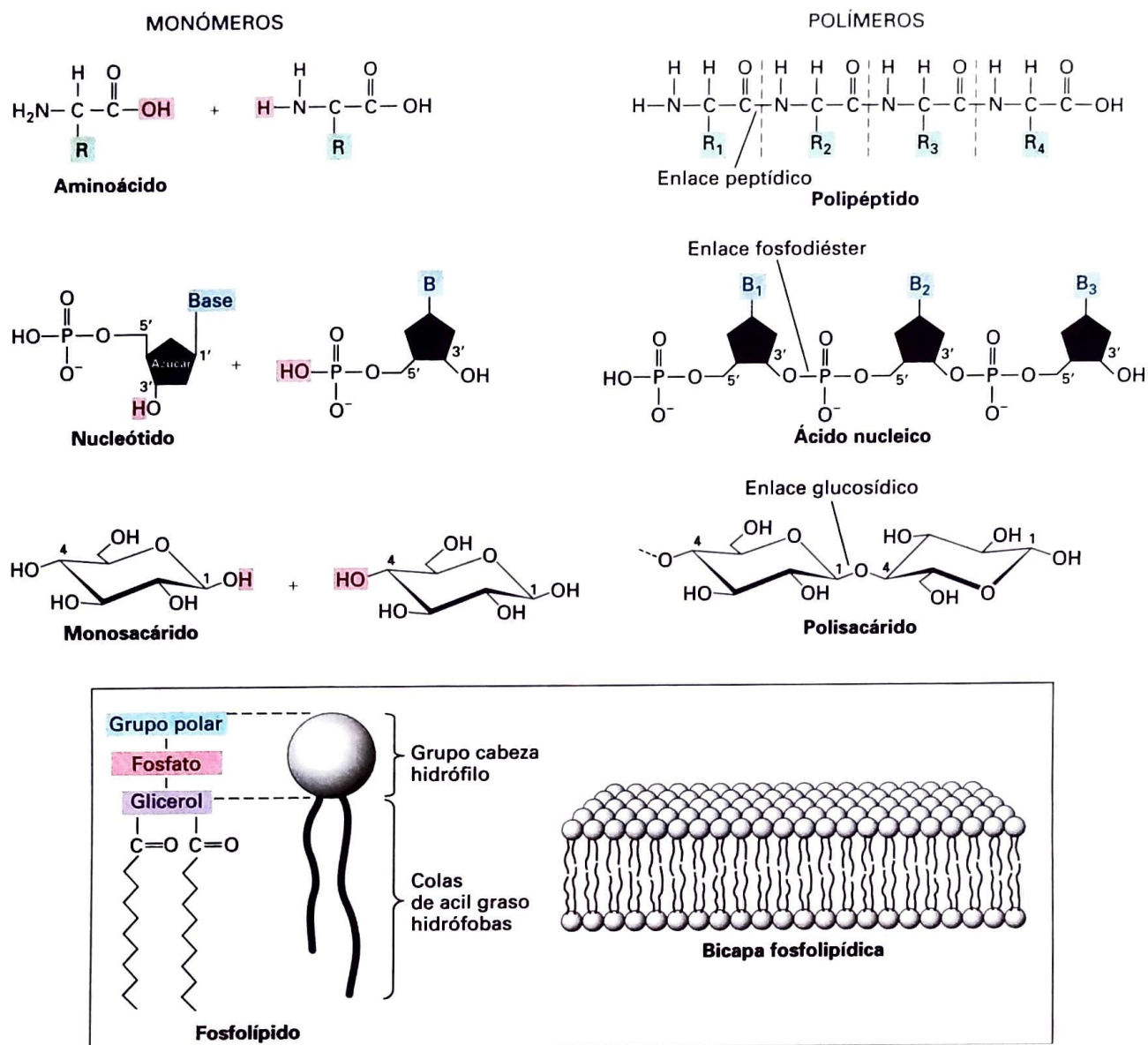


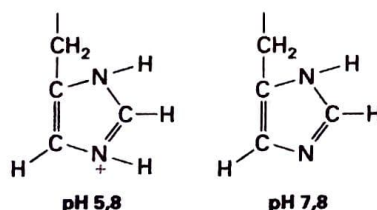
FIGURA 2-13 Panorama general de las principales unidades monoméricas químicas de la célula. (Arriba) Los tres principales tipos de macromoléculas biológicas se ensamblan por polimerización de múltiples moléculas pequeñas (monómeros) de un tipo particular: proteínas de los aminoácidos (véase el Cap. 3), ácidos nucleicos a partir de nucleótidos (véase el Cap. 4), y polisacáridos a

partir de monosacáridos (azúcares). Cada monómero se une de forma covalente al polímero mediante una reacción cuyo resultado neto es la pérdida de una molécula de agua (deshidratación). (Abajo) Por el contrario, los monómeros de fosfolípidos se ensamblan de forma no covalente a la estructura de bicapa, que forma las bases de todas las membranas celulares (véase el Cap. 10).

empaquetarse en el interior de las proteínas o revestir la superficie de proteínas que están embebidas dentro de regiones hidrófobas de las biomembranas.

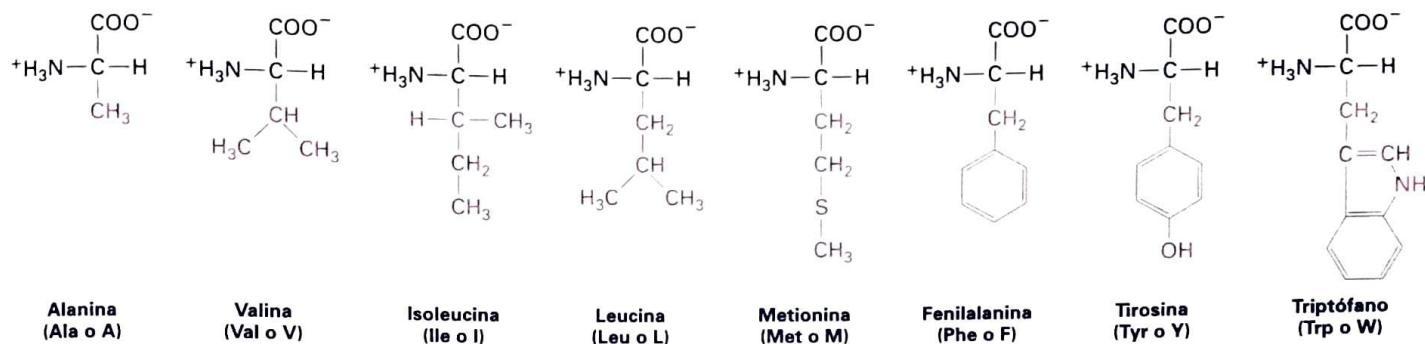
Los aminoácidos con cadenas laterales polares se denominan “hidrófilos”; el más hidrófilo de estos aminoácidos es el subgrupo de los aminoácidos con cadenas laterales que están cargadas (ionizadas) al pH típico de los líquidos biológicos (~7), tanto dentro como fuera de la célula (véase la Sección 2.3). La *arginina* y la *lisina* tienen cadenas laterales cargadas positivamente, y se dice que son “aminoácidos básicos”; el *ácido aspártico* y el *ácido glutámico* tienen cadenas laterales cargadas negativamente (sus formas cargadas se denominan *aspartato* y *glutamato*) y se denominan “ácidos”. Un quinto aminoácido, la *histidina*, tiene una cadena lateral que contiene un anillo

con dos nitrógenos, llamado “imidazol”, que puede cambiar de estar cargado positivamente a no estar cargado según los pequeños cambios en la acidez de su ambiente:



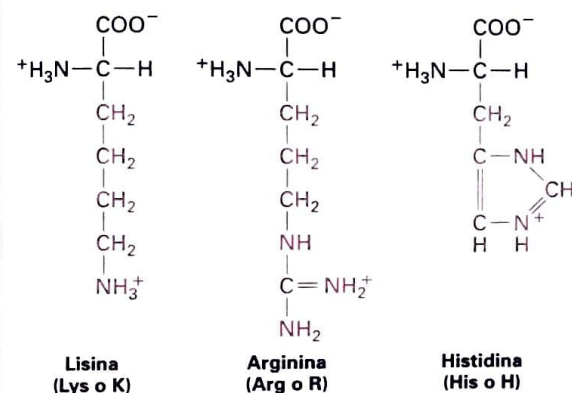
Las actividades de muchas proteínas están moduladas por cambios en la acidez ambiental (pH) a través de la protonación o desprotonación de las cade-

AMINOÁCIDOS HIDRÓFOBOS

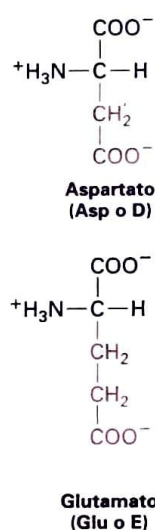


AMINOÁCIDOS HIDRÓFILOS

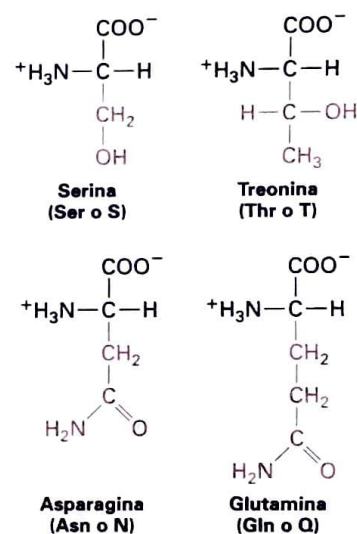
Aminoácidos básicos



Aminoácidos ácidos



Aminoácidos polares con grupos R sin carga



AMINOÁCIDOS ESPECIALES

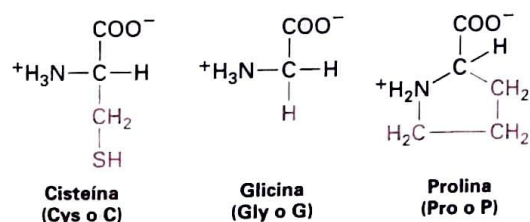
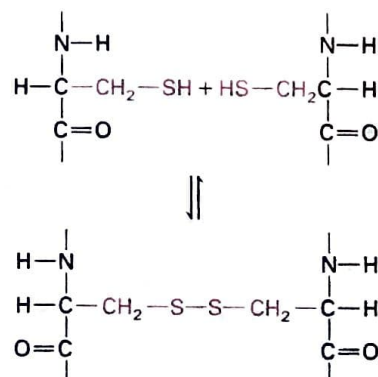


FIGURA 2-14 Los 20 aminoácidos comunes que constituyen las proteínas.

La cadena lateral (grupo R; rojo) determina las propiedades características de cada aminoácido y son la base para el agrupamiento de los aminoácidos en tres categorías: hidrófobos, hidrófilos y especiales. Se muestran las formas ionizadas que existen a pH (≈ 7) en el citosol. Las abreviaturas de tres letras y de una letra para cada aminoácido se presentan entre paréntesis.

nas laterales de la histidina. La *asparagina* y la *glutamina* no están cargadas, pero tienen cadenas laterales polares que contienen grupos amida con gran capacidad de formar enlaces de hidrógeno. De manera similar, la *serina* y la *treonina* están descargadas, pero tienen grupos hidroxilos polares, que también participan en enlaces de hidrógeno con otras moléculas polares.

Por último, la *cisteína*, la *glicina* y la *prolina* exhiben funciones especiales en las proteínas debido a las propiedades únicas de sus cadenas laterales. La cadena lateral de la *cisteína* contiene un *grupo sulfhidrilo* reactivo ($-\text{SH}$). Con la liberación de un protón (H^+), un sulfhidrilo es convertido o transformado en un anión tiolato (S^-). Los aniones tiolatos pueden cumplir funciones importantes en la catálisis, notablemente en ciertas enzimas que destruyen proteínas (proteasas). En las proteínas, cada uno de los dos grupos sulfhidrilos adyacentes puede ser oxidado, y cada uno libera un protón y un electrón para formar un *enlace disulfuro* covalente ($-\text{S}-\text{S}-$):



Los enlaces disulfuro sirven para “entrecruzar” regiones dentro de una única cadena polipeptídica (intramolecular) o entre dos cadenas separadas (intermolecular). Los enlaces disulfuro estabilizan la estructura plegada de algunas proteínas.

El aminoácido más pequeño, la *glicina*, tiene un único átomo de hidrógeno, como su grupo R. Es el de menor tamaño, por lo que permite adaptarse a espacios estrechos.

A diferencia de otros aminoácidos comunes, la cadena lateral de la *prolina* se dobla y forma un anillo unido por enlace covalente a un átomo de nitrógeno en el grupo amino adherido al C_{α} . Como resultado, la *prolina* es muy rígida y el grupo amino no está disponible para enlaces de hidrógeno típicos. La presencia de prolina en una proteína crea una angulación fija en la cadena del polímero, que limita el modo en que se puede plegar en la región del residuo de prolina.

Algunos aminoácidos son más abundantes en proteínas que otros. La cisteína, el triptófano y la metionina no son aminoácidos comunes: juntos constituyen aproximadamente el 5% de los aminoácidos en una proteína típica. Cuatro aminoácidos –leucina, serina, lisina y ácido glutámico– son los más abundantes y totalizan el 32% de todos los residuos de aminoácido en una proteína típica. Sin embargo, la composición aminoácida de las proteínas puede variar ampliamente respecto de estos valores.

 Los seres humanos y otros mamíferos pueden sintetizar 11 de los 20 aminoácidos. Los otros nueve se denominan *aminoácidos esenciales* y deben incluirse en la dieta para permitir la producción normal de proteínas. Estos son fenilalanina, valina, treonina, triptófano, isoleucina, metionina, leucina, lisina e histidina. La provisión adecuada de estos aminoácidos esenciales en la alimentación es clave para la industria ganadera. En efecto, en la actualidad se utiliza un maíz modificado genéticamente con un alto contenido de lisina como un alimento “mejorado” para promover el crecimiento de los animales. ■

Aunque las células utilizan los 20 aminoácidos mostrados en la Figura 2-14 en la síntesis *inicial* de proteínas, el análisis de las proteínas celulares revela que contienen más de 100 aminoácidos diferentes. La diferencia se debe a las modificaciones químicas de algunos aminoácidos después de que son incorporados a la proteína mediante la adición de grupos acetilos (CH_3CO) y de una variedad de otros grupos químicos (Fig. 2-15). Una modificación importante es la adición de un fosfato (PO_4) a los grupos hidroxilos en los residuos de serina, treonina y tirosina, un proceso conocido como “fosforilación”. En las proteínas, se encontrarán numerosos ejemplos cuya actividad está regulada por la fosforilación y desfosforilación reversible. La fosforilación del nitrógeno en la cadena lateral de la histidina es bien conocida en las bacterias, hongos y plantas, pero menos estudiada –tal vez debido a la relativa inestabilidad de la histidina fosforilada– y aparentemente infrecuente en los mamíferos.

Las cadenas laterales de la asparagina, serina y treonina son sitios para la glucosilación: la adhesión de cadenas de hidratos de carbono lineales y ramificados. Muchas proteínas secretadas y de membrana contienen residuos glucosilados, y la modificación reversible de los grupos hidroxilos en serinas y treoninas específicas por parte de un azúcar llamado N-acetilglucosamina también regula las actividades proteicas. Otras modificaciones de aminoácido encontradas en proteínas seleccionadas incluyen la hidroxilación de residuos de prolina y lisina en el colágeno (véase el Cap. 19), la metilación de los residuos de histidina en los receptores de membrana, y la γ carboxilación del glutamato en

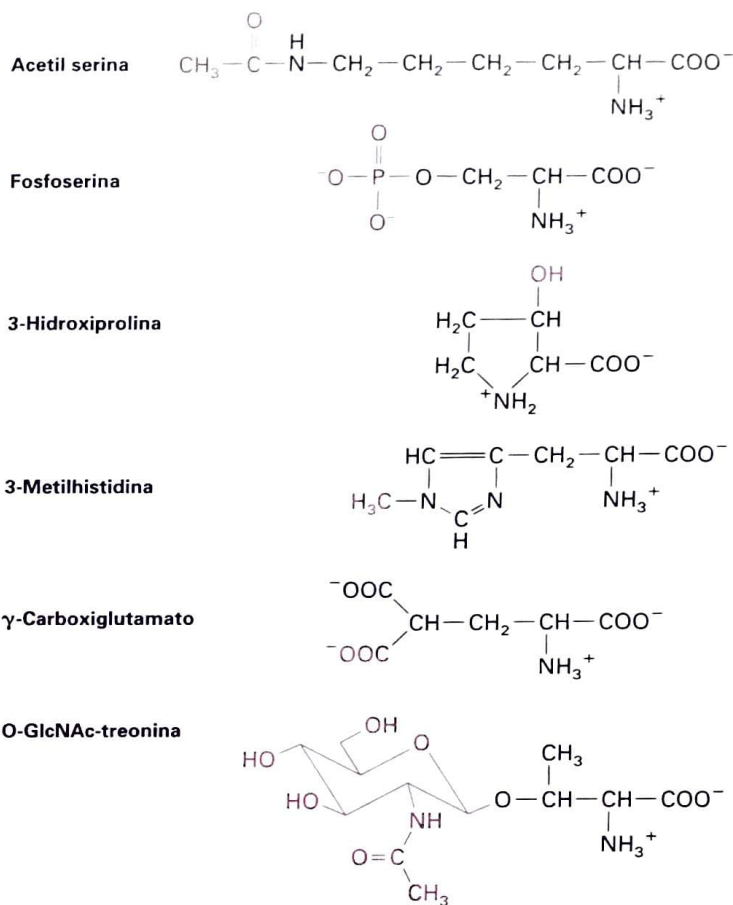
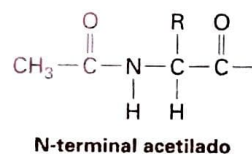


FIGURA 2-15 Las modificaciones comunes de las cadenas laterales de aminoácidos en las proteínas. Estos residuos modificados, y muchos otros, se forman por la adición de varios grupos químicos (rojo) a las cadenas laterales de aminoácidos durante la síntesis de una cadena polipeptídica o después de ella.

los factores de coagulación como la protrombina. La desamidación de la Asn y de la Gln para dar los ácidos correspondientes, Asp y Glu, también es un acontecimiento común.

La acetilación –la adición de un grupo acetilo, al grupo amino del residuo N-terminal– es la forma más común de modificación química de los aminoácidos, y afecta, aproximadamente, un 80% de todas las proteínas:



Esta modificación puede cumplir un papel importante en el control de la vida útil de las proteínas dentro de las células, debido a que muchas proteínas no acetiladas son rápidamente degradadas.

Cinco nucleótidos diferentes construyen ácidos nucleicos

Dos tipos de ácidos nucleicos similares químicamente, el **DNA (ácido desoxirribonucleico)** y el **RNA (ácido ribonucleico)**, son las princi-

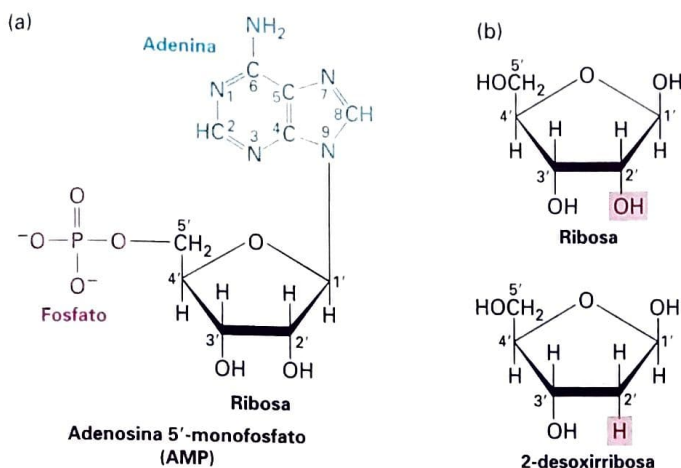


FIGURA 2-16 Estructura común de los nucleótidos. (a) Adenosina 5'-monofosfato (AMP), un nucleótido presente en el RNA. Por convención, los átomos de carbono del azúcar pentosa en los nucleótidos están numerados con primas. En los nucleótidos naturales, el carbono 1' está unido por una unión a la base (en este caso, adenina); tanto la base (azul) como el fosfato en el 5' hidroxilo (rojo) se extienden por encima del plano del anillo de azúcar. (b) La ribosa y la desoxirribosa, las pentosas en el RNA y DNA, respectivamente.

pales moléculas que portan la información genética de la célula. Los monómeros a partir de los cuales se construyen los polímeros del DNA y del RNA se denominan **nucleótidos**. Todos tienen una estructura común —un grupo fosfato unido por un enlace fosfoéster a un azúcar pentosa (cinco carbonos)— que, a su vez, está unida a una estructura tipo anillo, conocida como “base”, que contiene un nitrógeno y carbono (Fig. 2-16a). En el RNA, la pentosa es ribosa; en el DNA, es una desoxirribosa que, en la posición 2', tiene un protón en lugar de un grupo hidroxilo (Fig. 2-16b). (A continuación, se describen las estructuras de los azúcares en más detalle). Las bases *adenina*, *guanina* y *citosa* (Fig. 2-17) se encuentran tanto en el DNA como en el RNA; la *timina* solo se encuentra en el DNA; y el *uracilo*, solo en el RNA.

La adenina y la guanina son **purinas**, que contienen un par de anillos fusionados; la citosina, la timina y el uracilo son **pirimidinas**, que contienen un único anillo (véase la Fig. 2-17). Las bases suelen abreviarse A, G, C, T y U, respectivamente; estas abreviaturas de una sola letra también son comúnmente usadas para denotar los nucleótidos enteros en los polímeros de los ácidos nucleicos. En los nucleótidos, el átomo de carbono 1' del azúcar (ribosa o desoxirribosa) está adherido al nitrógeno en la posición 9 de una purina (N_9) o en la posición 1 de una pirimidina (N_1). El carácter ácido de los nucleótidos se debe al grupo fosfato, debido a que, en condiciones intracelulares normales, los nucleótidos liberan iones hidrógeno (H^+), y dejan al fosfato cargado negativamente (véase la Fig. 2-16a). La mayoría de los ácidos nucleicos en las células está asociada con proteínas, con las que forman interacciones iónicas con los fosfatos cargados negativamente.

Las células y los líquidos extracelulares en los organismos contienen pequeñas concentraciones de **nucleósidos**: combinaciones de una base y un azúcar sin un fosfato. Los nucleótidos son nucleósidos que tienen uno, dos o tres grupos fosfato esterificados en el hidroxilo 5'. Los nucleósidos monofosfatos tienen un único fosfato esterificado

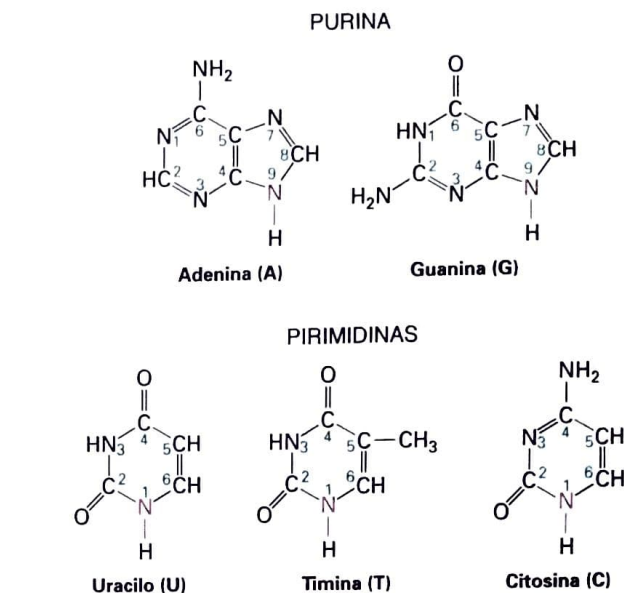
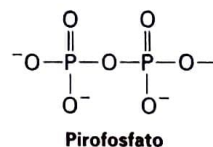


FIGURA 2-17 Estructuras químicas de las bases principales en los ácidos nucleicos. En los ácidos nucleicos y en los nucleótidos, el nitrógeno 9 de las purinas y el nitrógeno 1 de las pirimidinas (rojo) están unidos al carbono 1' de la ribosa o de la desoxirribosa. U solo se encuentra en el RNA, y T, solo en el DNA. Tanto el RNA como el DNA contienen A, G y C.

(véase la Fig. 2-16a); los nucleósidos difosfatos contienen un grupo pirofosfato:



y los nucleósidos trifosfatos tienen un tercer fosfato. En el Cuadro 2-3, se muestran los nombres de los nucleósidos y nucleótidos en los ácidos nucleicos y las diversas formas de los nucleósido fosfato.

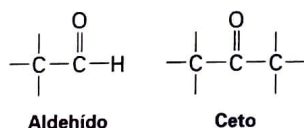
Los nucleósidos trifosfatos se usan en la síntesis de los ácidos nucleicos, que se tratan en el Capítulo 4. Entre sus otras funciones, el GTP participa en la señalización intracelular, actúa como un reservorio de energía —en particular, en la síntesis de proteína y el ATP, analizado más adelante en este capítulo— y constituye el portador de energía biológica más ampliamente usado en la célula.

Los monosacáridos se ensamblan mediante enlaces covalentes para formar polisacáridos lineales y ramificados

Las unidades monoméricas de los polisacáridos son los azúcares simples, o **monosacáridos**. Los monosacáridos son **hidratos de carbono**, que literalmente son combinaciones de carbono y agua unidas de forma covalente en una relación uno a uno (CH_2O)_n, donde n es igual a 3, 4, 5, 6 o 7. Las **hexosas** ($n = 6$) y **pentosas** ($n = 5$) son los mono-

Bases		Purinas		Pirimidinas	
		Adenina (A)	Guanina (G)	Citosina (C)	Uracilo (U) Timina (T)
Nucleósidos	en el RNA	Adenosina	Guanosina	Citidina	Uridina
	en el DNA	Desoxiadenosina	Desoxiguanosina	Desoxicitidina	Desoxitimidina
Nucleótidos	en el RNA	Adenilato	Guanilato	Citidilato	Uridilato
	en elDNA	Desoxiadenilato	Desoxiguanilato	Desoxicitidilato	Desoxitimidilato
Nucleósido monofosfatos		AMP	GMP	CMP	UMP
Nucleósidos difosfato		ADP	GDP	CDP	UDP
Nucleósidos trifosfato		ATP	GTP	CTP	UTP
Desoxinucleótido mono-, di- y trifosfato		dAMP, etc.	dGMP, etc.	dCMP, etc.	dTMP, etc.

sacáridos más comunes. Todos los monosacáridos contienen grupos hidroxilos ($-\text{OH}$) y un grupo aldehído o ceto:



Muchos azúcares biológicamente importantes son hexosas, incluyendo la glucosa, la manosa y la galactosa (Fig. 2-18). La manosa es idéntica a la glucosa, excepto que la orientación de los grupos unidos al carbono 2 está invertida. De modo similar, la galactosa, otra hexosa, difiere de la glucosa solo en la orientación de los grupos adheridos al carbono 4. La conversión o transformación entre la glucosa y la manosa o la galactosa requiere la ruptura y la formación de enlaces covalentes; tales reacciones las realizan enzimas que se denominan *epimerasas*.

La D-glucosa ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) es la principal fuente externa de energía para la mayoría de las células en los organismos multicelulares complejos y puede existir en tres formas diferentes: una estructura lineal y dos estructuras de anillos hemiacetales diferentes (Fig. 2-18a). Si el grupo aldehído del carbono 1 se combina con el grupo hidroxilo del carbono 5, el hemiacetal resultante, la D-glucopiranosas, un anillo de seis miembros. En el anómero α de la D-glucopiranosas el grupo hidroxilo adherido al carbono 1 apunta “hacia abajo” desde el anillo, como se muestra en la Figura 2-18a; en el anómero β , este hidroxilo apunta “hacia arriba”. En solución acuosa, los anómeros α y β se convierten rápidamente de manera espontánea; en el equilibrio, existe alrededor de un tercio del anómero α y dos tercios del anómero β , con muy poco de la forma de cadena abierta. Debido a que las enzimas pueden distinguir entre los anómeros α y β de la D-glucosa, estas formas tienen funciones biológicas distintas.

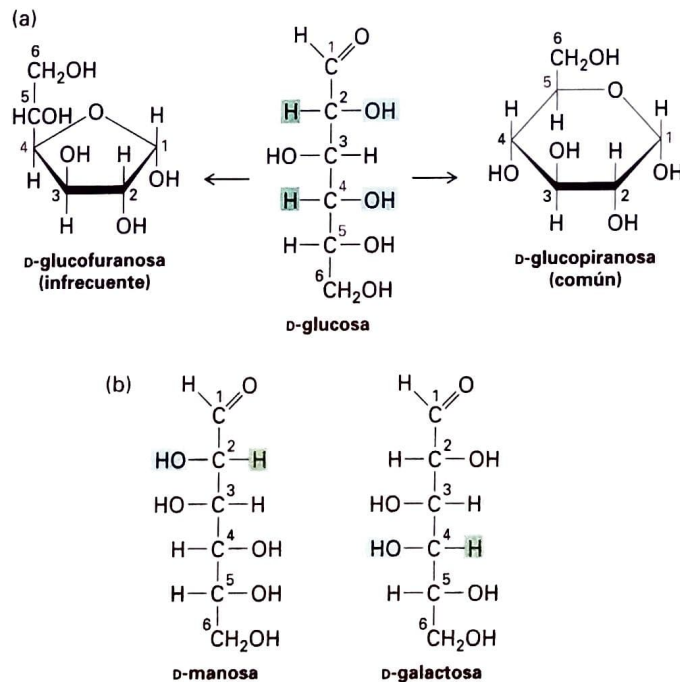
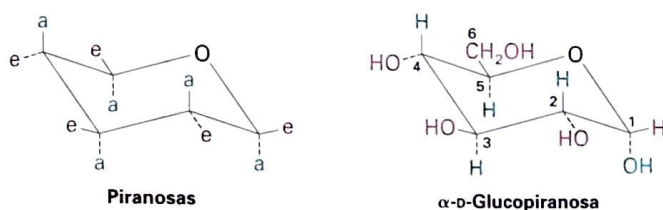


FIGURA 2-18 Estructuras químicas de las hexosas. Todas las hexosas tienen la misma fórmula química ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) y contienen un grupo aldehído o un ceto. (a) Las formas de anillos de la D-glucosa se generan a partir de la molécula lineal por reacción del aldehído del carbono 1 con el hidroxilo sobre el carbono 5 o el 4. Las tres formas se convierten entre sí rápidamente, aunque la forma piranosas (derecha) predomina en los sistemas biológicos. (b) En la D-manosa y la D-galactosa, la configuración del H (verde) y del OH (azul) unidos a un átomo de carbono difiere de la glucosa. Estos azúcares, al igual que la glucosa, existen principalmente como piranosas (anillos de seis miembros).

La condensación del grupo hidroxilo en el carbono 4 de la glucosa lineal con su grupo aldehído produce la formación de la D-glucopiranos, un hemiacetal que contiene un anillo de cinco miembros. Si bien en los sistemas biológicos existen las tres formas de D-glucosa, la forma piranos (anillo de seis miembros) es, por mucho, la más abundante.

En la Figura 2-18a, se describe el anillo de piranos como planar. En efecto, debido a la geometría tetraédrica alrededor de los átomos de carbono, la conformación más estable de un anillo de piranos tiene una forma no plana, similar a una silla. En esta conformación, cada enlace que va desde un anillo de carbono a un átomo que no forma parte del anillo (p. ej., H u O) puede adoptar dos conformaciones, casi perpendicular al anillo, referida como axial (a), o casi en el plano del anillo, referida como ecuatorial (e):



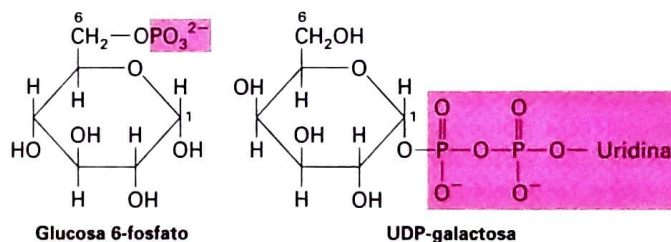
Los **disacáridos**, formados a partir de dos monosacáridos, son los polisacáridos más simples. El disacárido lactosa, compuesto de galactosa y glucosa, es el principal azúcar en la leche; el disacárido sacarosa, compuesto de glucosa y fructosa, es un producto principal en la fotosíntesis vegetal y está refinado en el azúcar de mesa (Fig. 2-19).

Los polisacáridos más grandes contienen de docenas a cientos de unidades de monosacáridos y pueden servir como reservorios de glucosa, como componentes estructurales o como adhesivos que contribuyen a mantener las células juntas en los tejidos. El hidrato de carbono de almacenamiento más común en las células animales es el **glucógeno**, un polímero de glucosa muy largo y altamente ramificado. Tanto como el 10% del peso del hígado puede ser glucógeno. El hidrato de carbono de almacenamiento primario en las células vegetales, el **almidón**, también es un polímero de glucosa. Se presenta en la forma no ramificada (amilosa) y en la forma levemente ramificada (amilopectina).

Tanto el glucógeno como el almidón están compuestos del anómero α de la glucosa. Por el contrario, la **celulosa** –el principal compo-

nente de las paredes celulares vegetales que confiere rigidez a muchas estructuras de las plantas (véase el Cap. 19)– es un polímero no ramificado del anómero β de la glucosa. Las enzimas digestivas humanas pueden hidrolizar los enlaces glucosídicos α en el almidón, pero no en los enlaces glucosídicos β en la celulosa. Muchas especies de plantas, bacterias y hongos producen enzimas que degradan celulosa. Las vacas y las termitas pueden descomponer celulosa debido a que, en sus intestinos, albergan bacterias capaces de degradarla. Las paredes celulares bacterianas consisten en **peptidoglucano**, una cadena de polisacárido entrecruzada por puentes cruzados de péptidos, que confieren rigidez y forma a la célula. Las lágrimas humanas y los líquidos gastrointestinales contienen lisozima, una enzima capaz de hidrolizar el peptidoglucano en la pared celular bacteriana.

Las enzimas que sintetizan los enlaces glucosídicos al unir los monosacáridos para formar polisacáridos son específicas para los anómeros α y β de un azúcar y de un grupo hidroxilo particular en el otro. En principio, dos moléculas de azúcar cualesquiera pueden ser unidas en una variedad de formas debido a que cada monosacárido tiene múltiples grupos hidroxilos que pueden participar en la formación de enlaces glucosídicos. Por otra parte, cualquiera de los monosacáridos tiene el potencial de unirse a más de dos monosacáridos, y generar así un punto de ramificación y de polímeros no lineales. Los enlaces glucosídicos suelen formarse entre la cadena de polisacárido en crecimiento y una forma covalente modificada de un monosacárido. Tales modificaciones incluyen un fosfato (p. ej., glucosa 6-fosfato) o un nucleótido (p. ej., UDP-galactosa):



Las enzimas epimerasas que interconvierten diferentes monosacáridos a menudo lo hacen usando azúcares de nucleótidos, en lugar de azúcares no sustituidos.

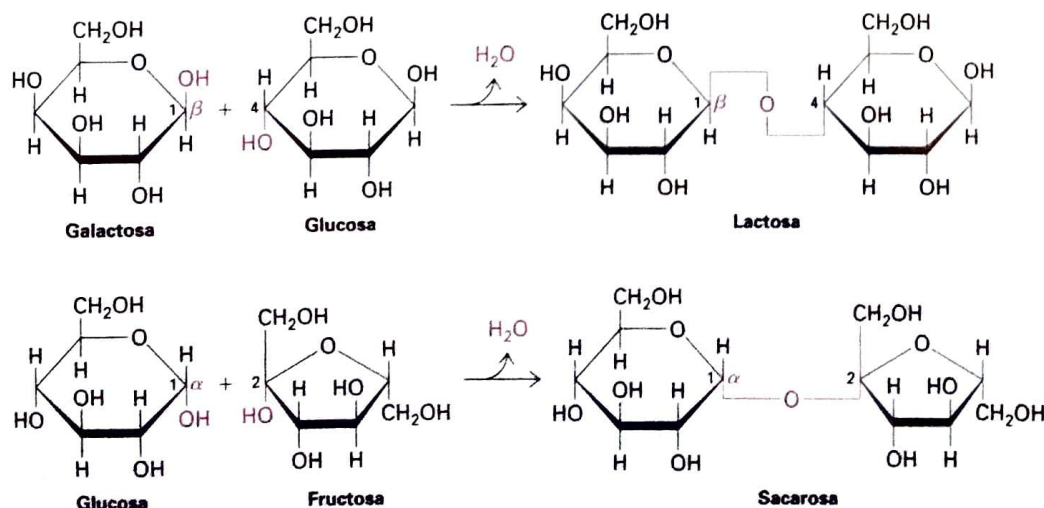


FIGURA 2-19 Formación de los disacáridos lactosa y sacarosa. En cualquier unión glucosídica, el carbono anomérico de una molécula de azúcar (en cualquiera de las conformaciones α o β) está unido a un oxígeno hidroxilo sobre otra molécula de azúcar. Las uniones se nombran en consecuencia; así, la lactosa contiene un enlace β (1→4), y la sacarosa uno α (1→2).

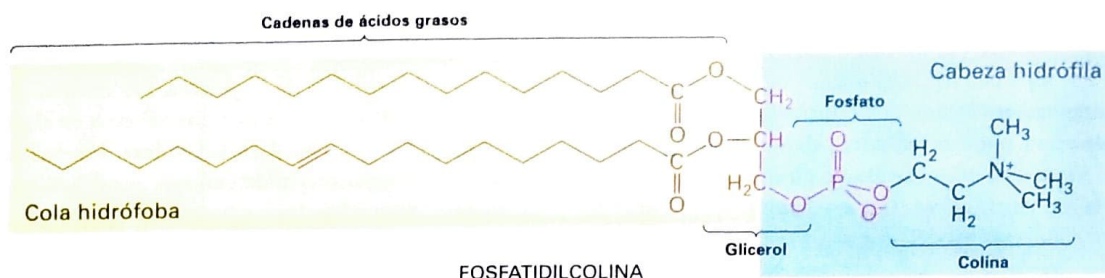


FIGURA 2-20 Fosfatidilcolina, un fosfoglicérido típico. Todos los fosfoglicéridos son fosfolípidos anfipáticos: tienen una cola hidrófoba (amarilla) y una cola hidrófila (azul) en la cual el glicerol está unido a ella mediante un grupo

fosfato a un alcohol. Cualquiera o ambas cadenas laterales de ácidos grasos en un fosfoglicérido pueden estar saturadas o insaturadas. En el ácido fosfatídico (rojo), que es el fosfolípido más simple, el fosfato no está unido a un alcohol.

Muchos polisacáridos complejos contienen azúcares modificados que están unidos de modo covalente a varios grupos pequeños, en particular, a los grupos amino, sulfato y acetilo. Tales modificaciones son abundantes en los **glucosaminoglucanos**: principales componentes de los polisacáridos en la matriz, que se describen en el Capítulo 19.

Los fosfolípidos se asocian de forma no covalente para formar la estructura básica de bicapa de las biomoléculas

Las biomembranas son láminas largas y flexibles con una estructura de doble capa, o bicapa, que constituyen los límites de las células y de sus orgánulos intracelulares y forman las superficies externas de algunos virus. Las membranas literalmente definen lo que es una célula (la membrana externa y el contenido dentro de la membrana) y lo que no es (el espacio extracelular fuera de la membrana). A diferencia de las proteínas, de los ácidos nucleicos y de los polisacáridos, las membranas se ensamblan mediante la asociación *no covalente* de las unidades monoméricas que la componen. Las principales unidades monoméricas de todas las biomembranas son los **fosfolípidos**, cuyas propiedades físicas son responsables de la formación de la estructura de bicapa de las membranas. Además de los fosfolípidos, las biomembranas contienen una variedad de otras moléculas, incluyendo colesterol, glucolípidos y proteínas. La estructura y la función de las biomembranas se describirán en detalle en el Capítulo 10. Aquí nos centraremos en los fosfolípidos en las biomembranas.

Para entender la estructura de los fosfolípidos, debemos comprender cada una de sus partes componentes y cómo se ensamblan. Los fosfolípidos consisten en cadenas largas de ácidos grasos no polares unidas (en general, por un enlace éster) a pequeños grupos altamente polares, que incluyen un fosfato y una molécula orgánica corta, como el glicerol (trihidroxi propanol) (Fig. 2-20).

Los **ácidos grasos** consisten en una cadena hidrocarbonada (ácido) unida a un grupo carboxilo (—COOH). Como la glucosa, los ácidos grasos son una fuente importante de energía para muchas células (véase el Cap. 12). Difieren en longitud, aunque los ácidos grasos que predominan en las células tienen un número par de átomos de carbono, por lo general, 14, 16, 18 o 20. En el Cuadro 2-4, se muestran los principales ácidos grasos. Estos suelen designarse mediante la abrevia-

tura Cx:y, donde “x” es el número de carbonos en la cadena e “y” es el número de enlaces dobles. Los ácidos grasos que contienen 12 o más átomos de carbonos son casi insolubles en solución acuosa debido a sus largas cadenas hidrocarbonadas hidrófobas.

Los ácidos grasos en los cuales todos los enlaces carbono-carbono son enlaces simples, es decir, los ácidos grasos que no tienen enlaces dobles carbono-carbono, se dicen que son **saturados**; aquellos con, al menos, un enlace doble carbono-carbono se denominan **insaturados**. Los ácidos grasos insaturados con más de un doble enlace se denominan como **poliinsaturados**. Dos ácidos grasos poliinsaturados “esenciales”, el ácido linoleico (C18:2) y el ácido linolénico (C18:3), no pueden ser sintetizados por los mamíferos y deben ser suplementados en su dieta. Los mamíferos pueden sintetizar otros ácidos grasos comunes.

En los fosfolípidos, los ácidos grasos se unen de forma covalente a otra molécula mediante un tipo de reacción de deshidratación denominada *esterificación*, en la cual se pierde el OH del grupo carboxilo del ácido graso y un H de un grupo hidroxilo de la otra molécula. En la molécula combinada formada por esta reacción, la parte derivada del ácido graso se denomina un **grupo acilo**, o **grupo acilo graso**. Esto se ilustra mediante las formas más comunes de los fosfolípidos: los **fosfoglicéridos**, que contienen dos grupos acilos unidos a dos de los grupos hidroxilos del glicerol (véase la Fig. 2-20).

En los fosfoglicéridos, un grupo hidroxilo del glicerol está esterificado a un fosfato, mientras que los otros dos normalmente están esterificados a los ácidos grasos. El fosfolípido más simple, el ácido fosfatídico, solo contiene estos componentes. Los fosfolípidos como los ácidos fosfatídicos no solo son las unidades monoméricas de la membrana, sino que también son importantes moléculas de señalización. El ácido lisofosfatídico, en donde se ha eliminado la cadena acilo en la posición 2, es relativamente soluble en agua y puede ser un inductor potente de la división celular (se denomina “mitógeno”). En la mayoría de los fosfolípidos que se encuentran en las membranas, el grupo fosfato también está esterificado a un grupo hidroxilo en otro compuesto hidrófilo. En la fosfatidilcolina, por ejemplo, la colina está unida al fosfato (véase la Fig. 2-20). La carga negativa en el fosfato, y también los grupos cargados o polares esterificados a él, puede interactuar fuertemente con el agua. El fosfato y su grupo esterificado asociado, el grupo “cabeza” de un fosfolípido, es hidrófilo; mientras que las cadenas de ácidos grasos, las “colas”, son hidrófobas. En el Cuadro 2-5, se muestran otros fosfoglicéridos y los grupos cabeza asociados.

Cuadro 2-4 Ácidos grasos que predominan en los fosfolípidos

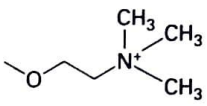
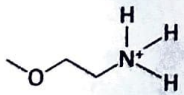
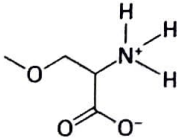
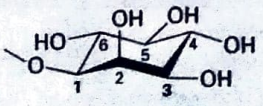
Nombre común de los ácidos (la forma ionizada, entre paréntesis)	Abreviaturas	Fórmulas químicas
Ácidos grasos saturados		
Mirístico (miristato)	C14:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
Palmitico (palmitato)	C16:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
Estearico (estearato)	C18:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
Ácidos grasos insaturados		
Oleico (oleato)	C18:1	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Linoleico (linoleato)	C18:2	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
Araquidónico (araquidonato)	C20:4	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$

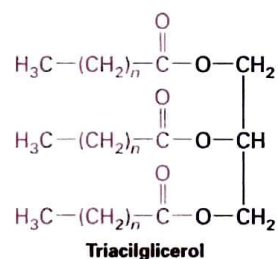
Las moléculas que, como los fosfolípidos, tienen tanto regiones hidrófobas como hidrófilas, se denominan “anfipáticas”. En el Capítulo 10, se verá cómo las propiedades anfipáticas de los fosfolípidos son responsables del ensamblaje de los fosfolípidos en la bicapa de las bio-

membranas, en las cuales las colas de ácidos grasos apuntan hacia el centro de la hoja y los grupos cabeza apuntan hacia fuera en dirección al entorno acuoso (véase la Fig. 2-13).

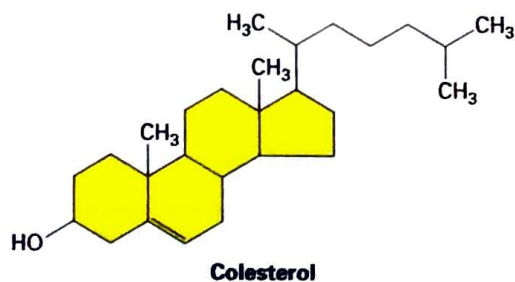
Los grupos ácidos grasos también pueden estar unidos de forma covalente a otras moléculas grasas, que incluyen **triacilglicérol**, o **triglicéridos**, que contienen tres grupos ácidos esterificados al glicerol:

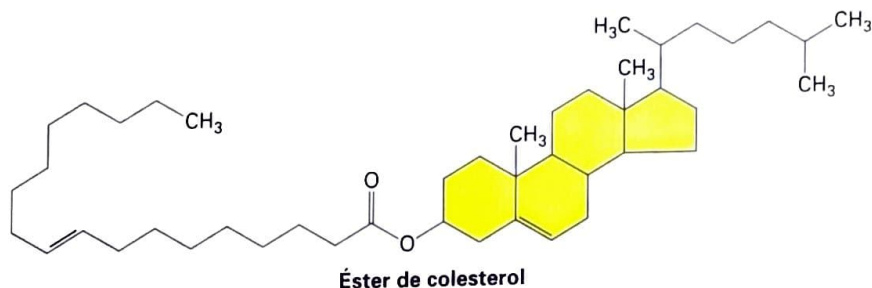
Cuadro 2-5 Fosfoglicéridos y grupos cabeza

Fosfoglicéridos comunes	Grupos cabeza
Fosfatidilcolina	 Colina
Fosfatidiletanolamina	 Etanolamina
Fosfatidilserina	 Serina
Fosfatidilinositol	 Inositol



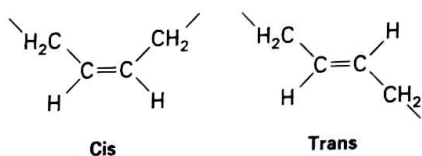
y unidos de forma covalente a la molécula de colesterol muy hidrófoba, un alcohol, para formar ésteres de colesterol:





Los triacilglicéridos y los ésteres de colesterol son moléculas extremadamente insolubles en agua en las cuales se almacenan o se transportan los ácidos grasos y el colesterol. Los triglicéridos son la forma de almacenamiento de los ácidos grasos en las células grasas del tejido adiposo y son los componentes principales de las grasas dietarias. Los ésteres de colesterol y los triacilglicéridos se transportan entre los tejidos a través de la circulación sanguínea en los transportadores especializados denominados “lipoproteínas” (véase el Cap. 14).

Anteriormente, vimos que los ácidos grasos que constituyen los fosfolípidos (fosfoglicéridos y triglicéridos) pueden ser saturados o insaturados. Una consecuencia importante del enlace doble carbono-carbono (C=C) en un ácido graso insaturado es que las dos configuraciones estereoisoméricas, *cis* y *trans*, son posibles alrededor de cada uno de estos enlaces:



un enlace doble *cis* introduce una angulación rígida en la cadena de acilo recta que, de otra manera, sería flexible, de un ácido graso saturado (Fig. 2-21). En general, los ácidos grasos saturados sin la angulación pueden empaquetarse de forma compacta y, por lo tanto, tienen puntos de fusión más altos que los ácidos grasos insaturados. Las principales moléculas grasas en la mantequilla son triglicéridos con cadenas de aci-

los grasos saturados, razón por la cual es sólida a temperatura ambiente. Los ácidos grasos insaturados o las cadenas de acilo graso con la angulación del doble enlace *cis* no pueden empaquetarse tan juntas como las cadenas de acilos grasos saturadas. Por ende, los aceites vegetales, que están compuestos de triglicéridos con grupos acilos grasos insaturados, suelen ser líquidos a temperatura ambiente. Los aceites vegetales y similares son parcialmente hidrogenados para convertir algo de sus cadenas de acilos grasos insaturados en cadenas de acilos grasos saturados. En consecuencia, el aceite vegetal hidrogenado puede moldearse en barras sólidas de margarina. Un subproducto de la reacción de hidrogenación es la conversión de algo de las cadenas de acilo graso en ácidos grasos *trans*, conocidos popularmente como “grasas *trans*”. Las “grasas *trans*”, que se encuentran en la margarina parcialmente hidrogenada y en otros productos alimenticios, no son naturales. Los ácidos grasos *trans* y saturados tienen propiedades físicas similares; por ejemplo, tienden a ser sólidos a temperatura ambiente. Sus consumos, en relación con el consumo de grasas insaturadas, se asocian con un incremento en las concentraciones de colesterol plasmático y es desaconsejado por algunos nutricionistas. ■

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 2.2

Unidades monoméricas químicas de las células

- Las macromoléculas son polímeros de subunidades monoméricas unidas por enlaces covalentes a través de reacciones de deshidratación.

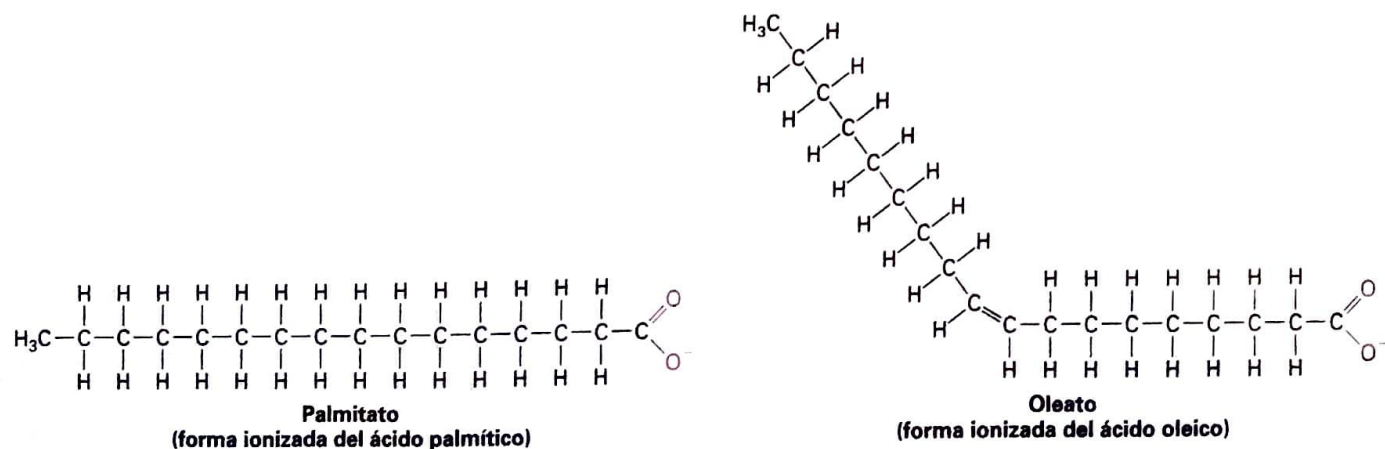


FIGURA 2-21 El efecto de un enlace doble en la forma de los ácidos grasos. Se muestran las estructuras químicas de la forma ionizada del ácido palmítico —un ácido graso saturado con 16 átomos de C— y del ácido oleico —un insaturado con

18 átomos de C—. En los ácidos grasos saturados, la cadena hidrocarbonada suele ser lineal; el doble enlace *cis* en el oleato crea un pliegue en la cadena hidrocarbonada. [De L. Stryer, 1994, *Biochemistry*, 4th ed. W. H. Freeman and Company, p. 265.]

En las células, se encuentran tres tipos principales de macromoléculas: las proteínas, compuestas de aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos; los ácidos nucleicos, compuestos de nucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster; y los polisacáridos, compuestos de monosacáridos (azúcares) unidos por enlaces glucosídicos (véase la Fig. 2-13). Los fosfolípidos, la cuarta clase de unidades monoméricas químicas, se ensamblan de manera no covalente para formar biomembranas.

- Las diferencias en tamaño, forma, carga, hidrofobicidad y reactividad de las cadenas laterales de los 20 aminoácidos comunes determinan las propiedades químicas y estructurales de las proteínas (véase la Fig. 2-14).

- Las bases en los nucleótidos que componen el DNA y el RNA son anillos que contienen nitrógeno y carbono unidos a un azúcar pentosa. Ellos forman dos grupos: las purinas—adenina (A) y guanina (G); y las pirimidinas—citosina (C), timina (T) y uracilo (U) (véase la Fig. 2-17). A, G, T y C se encuentran en el DNA; y A, G, U y C se encuentran en el RNA.

- La glucosa y otras hexosas pueden existir en tres formas: una estructura lineal en cadena abierta, un anillo de seis miembros (piranosa), y un anillo de cinco miembros (furanosa) (véase la Fig. 2-18). En los sistemas biológicos, predomina la forma piranosa de la D-glucosa.

- Los enlaces glucosídicos se forman ya sea entre el anómero α o el β de un azúcar y un grupo hidroxilo sobre otro azúcar, que conduce a la formación de disacáridos y de otros polisacáridos (véase la Fig. 2-19).

- Los fosfolípidos son moléculas anfipáticas con una cola hidrófoba (a menudo, dos cadenas de ácidos grasos) conectadas por una molécula orgánica (a menudo, glicerol) a una cabeza hidrófila (véase la Fig. 2-20).

- La cadena hidrocarbonada larga de un ácido graso puede ser saturada (no contiene un enlace doble carbono-carbono) o insaturada (contiene uno o más enlaces dobles). Las sustancias grasas como la manteca, que tienen principalmente cadenas de ácidos grasos saturados, tienden a ser sólidas a temperatura ambiente, mientras que las grasas insaturadas con enlaces dobles *cis* tienen cadenas con angulaciones que no pueden empaquetarse de manera compacta y, por lo tanto, tienden a ser líquidas a temperatura ambiente.

2.3 Reacciones químicas y equilibrio químico

A continuación, nos centraremos en las reacciones químicas en las cuales los enlaces, principalmente los enlaces covalentes entre los *reactivos* químicos, se rompen y se forman nuevos enlaces para generar los *productos* de reacción. En cualquier momento dado, varios cientos de diferentes clases de reacciones químicas se están produciendo de manera simultánea en cada célula, y muchos compuestos químicos pueden, en principio, sufrir múltiples reacciones químicas. Tanto la *extensión* a la cual pueden proceder las reacciones como la *velocidad* a la cual ocurren determinan la composición química de las células. En esta sección, se analizan los conceptos de equilibrio y estado estacionario y también las constantes de disociación y el pH. En la Sección 2.4, se analiza cómo la energía influye en la extensión y en las velocidades de las reacciones químicas.

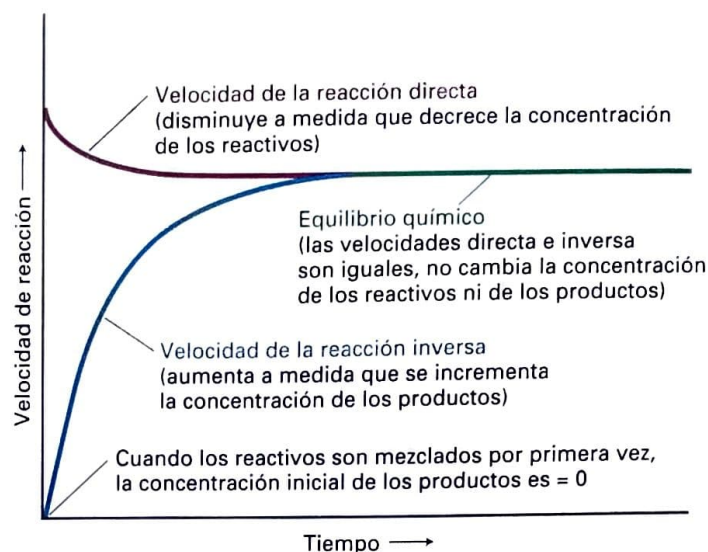


FIGURA 2-22 Dependencia del tiempo de la velocidad de una reacción química. Las velocidades directa e inversa de una reacción dependen, en parte, de las concentraciones iniciales de los reactivos y de los productos. La velocidad neta de la reacción directa disminuye a medida que la concentración de los reactivos disminuye, mientras que la velocidad neta de la reacción inversa aumenta a medida que la concentración de los productos se incrementa. En el equilibrio, las velocidades de las reacciones directa e inversa se igualan y la concentración de los reactivos y de los productos permanece constante.

Una reacción química está en equilibrio cuando las velocidades directa e inversa de las reacciones se igualan

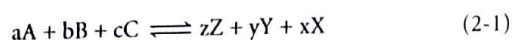
Cuando se mezclan los reactivos por primera vez —antes de que se hayan formado los productos—, la velocidad de la reacción directa para formar productos está determinada, en parte, por sus concentraciones iniciales, que determinan la probabilidad de los reactivos de colisionar unos con otros y reaccionar (Fig. 2-22). A medida que se acumulan los productos de reacción, la concentración de cada reactivo disminuye y, por ende, también lo hace la velocidad de la reacción directa. Mientras tanto, algunas de las moléculas de productos comienzan a participar en la reacción inversa, que vuelve a formar los reactivos. La capacidad de una reacción de ir “en reversa” se denomina *reversibilidad microscópica*. La reacción inversa es lenta al comienzo, pero se acelera a medida que aumentan las concentraciones de los productos. Eventualmente, las velocidades de las reacciones directa e inversa se igualan, por lo tanto, las concentraciones de los reactivos y de los productos dejan de cambiar. Se dice entonces que el sistema está en **equilibrio químico**.

La relación de las concentraciones de los productos respecto de los reactivos cuando alcanzan el equilibrio, denominada la **constante de equilibrio**, K_{eq} , es un valor fijo. Por lo tanto, la K_{eq} proporciona una medida de la extensión a la cual se produce una reacción a través del tiempo en el que alcanza el equilibrio. La velocidad de una reacción química se puede aumentar mediante un **catalizador**, sin cambiar la constante de equilibrio (véase la Sección 2.4). Un catalizador acelera la formación y la ruptura de enlaces covalentes, pero, en sí mismo, no cambia de forma permanente durante una reacción.

La constante de equilibrio refleja la extensión de una reacción química

Para cualquier reacción química, la constante de equilibrio K_{eq} depende de la naturaleza de los reactivos y los productos, de la temperatura y la presión (en particular, en reacciones que involucran gases). En condiciones físicas estándares (25 °C y 1 atm de presión para sistemas biológicos), la K_{eq} es siempre la misma para una reacción dada, esté presente o no un catalizador.

Para la reacción general con tres reactivos y tres productos



donde las letras mayúsculas representan moléculas particulares o átomos y las minúsculas representan el número de cada uno en la fórmula de reacción; la constante de equilibrio está dada por

$$K_{eq} = \frac{[X]^x[Y]^y[Z]^z}{[A]^a[B]^b[C]^c} \quad (2-2)$$

donde los corchetes denotan las concentraciones de las moléculas en el equilibrio. La tasa de la reacción directa (izquierda a derecha en la Ecuación 2-1) es

$$\text{Velocidad}_{\text{directa}} = k_d[A]^a[B]^b[C]^c$$

donde k_d es la **constante de velocidad** para la reacción directa. De modo similar, la velocidad para la reacción inversa (de derecha a izquierda en la Ecuación 2-1) es

$$\text{Velocidad}_{\text{inversa}} = k_i[X]^x[Y]^y[Z]^z$$

donde k_i es la constante de velocidad para la reacción inversa.

Es importante recordar que las velocidades directas e inversas de una reacción pueden cambiar debido a los cambios en las concentraciones de los reactivos o en los productos, pero al mismo tiempo las constantes de velocidad directa e inversa no cambian; de ahí, el nombre “constante”. Es un error común confundir “velocidad” con “constante de velocidad”. En el equilibrio, las velocidades directa e inversa son iguales, por lo tanto, $\text{Velocidad}_{\text{directa}}/\text{Velocidad}_{\text{inversa}} = 1$. Al reordenar estas ecuaciones, se puede expresar la constante de equilibrio como la relación de sus constantes de velocidades:

$$K_{eq} = \frac{k_d}{k_i} \quad (2-3)$$

El concepto “constante de equilibrio” es en particular útil cuando se desea pensar acerca de la energía que se libera o absorbe cuando se produce la reacción química. En la Sección 2.4, se analiza esto en detalle.

Las reacciones químicas en las células están en estado estacionario

En condiciones adecuadas y con el tiempo suficiente, una reacción bioquímica individual llevada a cabo en un tubo de ensayo eventualmente alcanzará el equilibrio, y las concentraciones de los reactivos y los productos no cambian con el tiempo debido a que las velocidades de las reacciones directa e inversa son iguales. Dentro de las células, sin embargo, muchas reacciones están conectadas en vías en las cuales un producto de una reacción tiene destinos alternativos a la simple reconversión mediante una reacción inversa hasta los reactivos y así llegar, en

(a) Concentraciones equilibradas en el tubo de ensayo



(b) Concentraciones en estado estable dentro de la célula



FIGURA 2-23 Comparación de las reacciones en el equilibrio y en el estado estacionario. (a) En el tubo de ensayo, una reacción bioquímica ($A \rightarrow B$) eventualmente alcanzará el equilibrio, en el cual las velocidades de las reacciones directa e inversa son iguales (como lo indican las flechas de igual longitud) (b) En las vías metabólicas dentro de las células, el producto B comúnmente se consumirá, en este ejemplo, por conversión a C. Una vía de reacciones conectadas está en estado estacionario cuando las velocidad de formación de los intermediarios (p. ej., B) iguala sus velocidades de consumo. Como lo indica la longitud desigual de las flechas, las reacciones reversibles individuales que constituyen una vía metabólica no alcanzan el equilibrio. Por otra parte, las concentraciones de los intermediarios en el estado estacionario pueden diferir de lo que serían en el estado de equilibrio.

última instancia, al equilibrio. Por ejemplo, el producto de una reacción podría servir como un reactivo en otra, o podría ser bombeado fuera de la célula. En esta situación más compleja, la reacción original nunca puede alcanzar el equilibrio debido a que parte de los productos no tienen posibilidad de volver a ser convertidos en reactivos. No obstante, en tales condiciones de no equilibrio, la velocidad de formación de una sustancia puede ser igual a la velocidad de su consumo y, como consecuencia, la concentración de la sustancia permanece constante a lo largo del tiempo. En tales circunstancias, el sistema de reacciones conectadas para la producción y el consumo de esa sustancia se dice que está en un **estado estacionario** (Fig. 2-23). Una consecuencia de tales reacciones conectadas es que estas evitan la acumulación de exceso de intermediarios, y protegen las células de los efectos dañinos de los intermediarios que son tóxicos a concentraciones elevadas. Cuando la concentración de un producto de una reacción en curso no cambia con el tiempo, podría ser una consecuencia de un estado de equilibrio o de un estado estacionario. En los sistemas biológicos, cuando las concentraciones de metabolitos, como las concentraciones de glucosa en sangre, no cambian con el tiempo —una condición que se denomina *homeostasis*—, es una consecuencia de un estado estacionario más que del equilibrio.

Las constantes de disociación de las reacciones de unión reflejan la afinidad de las moléculas que interactúan

El concepto de “equilibrio” también se aplica a la unión de una molécula a otra. Muchos procesos celulares importantes dependen de tales reacciones de “unión”, que involucran la formación y la ruptura de diversas interacciones no covalentes, en lugar de enlaces covalentes, como se analiza a continuación. Un ejemplo común es la unión de un **ligando** (p. ej., la hormona insulina o adrenalina) a su **receptor** sobre la superficie de una célula, lo cual desencadena una vía de señalización intracelular (véase el Cap. 15). Otro ejemplo es la unión de una proteína a una secuencia específica de pares de bases en una molécula de DNA, que suele causar que la expresión de un gen próximo aumente o dismi-



FIGURA 2-24 Las macromoléculas pueden tener distintos sitios de unión para múltiples ligandos. En la figura, se muestra una macromolécula (p. ej., una proteína, azul) con tres sitios de unión distintos (A–C), cada sitio de unión exhibe complementariedad molecular para tres patrones de unión diferentes (ligandos A–C) con constantes de disociación (K_{dA-C}) distintas.

nuya (véase el Capítulo 7). Si se conoce la constante de equilibrio para una reacción, se puede predecir la estabilidad del complejo resultante. Para ilustrar el enfoque general y poder determinar la concentración de complejos de asociación no covalentes, calcularemos el grado en el que una proteína (P) se une al DNA (D) y forma un complejo proteína-DNA (PD):

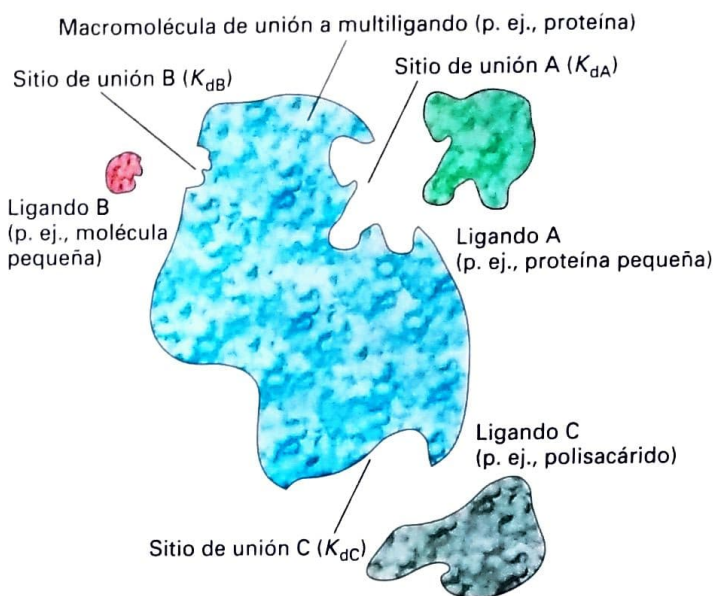


Más comúnmente, las reacciones de unión se describen en términos de **constante de disociación** K_d , que es la recíproca de la constante de equilibrio. Para esta reacción de unión, la constante de disociación está dada por

$$K_d = \frac{[P][D]}{[PD]} \quad (2-4)$$

Vale la pena destacar que en tal reacción de unión, cuando la mitad del DNA está unida a la proteína ($[PD] = [D]$), la concentración de P es igual a la K_d . Cuanto menor es la K_d , menor es la concentración de P necesaria para unirse a la mitad de D. En otras palabras, cuanto menor es la K_d , más fuerte es la unión (mayor es la afinidad) de P por D. Las reacciones típicas en las cuales una proteína se une a una secuencia específica de DNA tiene una K_d de 10^{-10} M, donde M simboliza molaridad, o moles por litro (mol/L). Para relacionar la magnitud de esta constante de disociación con la relación intracelular del DNA unido respecto del DNA no unido, consideremos el ejemplo simple de una célula bacteriana que tiene un volumen de $1,5 \times 10^{-15}$ L y contiene 1 molécula de DNA y 10 moléculas de la proteína P unida al DNA. En este caso, dada una K_d de 10^{-10} M y la concentración total de P en la célula ($\sim 111 \times 10^{-10}$ M, 100 veces más alta que la K_d), el 99% de las veces esta secuencia específica de DNA tendrá una molécula de proteína unida a él y el 1% de las veces no lo tendrá, incluso a pesar de que ¡la célula contiene solo 10 moléculas de la proteína! Claramente, P y D tienen una alta afinidad entre sí y se unen muy fuerte, como lo refleja el valor bajo de la constante de disociación para su reacción de unión. Para la unión proteína-proteína y proteína-DNA, los valores de K_d de $\leq 10^{-9}$ M (nanomolar) son consideradas muy fuertes, $\sim 10^{-6}$ M (micromolar) moderadamente fuertes, y $\sim 10^{-3}$ M (milimolar) relativamente débiles.

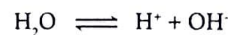
Una macromolécula biológica grande, como una proteína, puede tener múltiples superficies de unión para la unión de varias moléculas simultáneamente (Fig. 2-24). En algunos casos, estas reacciones de unión son independientes, con sus propios valores de K_d distintivos que son constantes. En otros casos, la unión de una molécula a un sitio sobre una macromolécula puede cambiar la forma tridimensional en un sitio distante, y alterar así las interacciones de unión de ese sitio distante con alguna otra molécula. Este es un mecanismo importante mediante el cual una molécula puede alterar y, por lo tanto, regular la actividad de unión de otra. En el Capítulo 3, se analizará en más detalle este mecanismo regulador.



Los líquidos biológicos tienen valores de pH característicos

El solvente dentro de las células y en todos los líquidos extracelulares es agua. Una característica importante de cualquier solución acuosa es la concentración de los iones hidrógenos cargados positivamente (H^+) y los iones hidroxilos cargados negativamente (OH^-). Debido a que estos iones son los productos de la disociación del H_2O , son constituyentes de todos los sistemas vivos, y son liberados por muchas reacciones que ocurren entre moléculas orgánicas dentro de las células. Estos iones también se transportan dentro y fuera de las células, como el jugo gástrico altamente ácido secretado por las células que revisten las paredes del estómago.

Cuando una molécula de agua se disocia, uno de sus enlaces polares $H-O$ se rompe. El ion hidrógeno resultante, que se denomina **protón**, tiene un tiempo de vida corto como ion libre y rápidamente se combina con una molécula de agua para formar un ion hidronio (H_3O^+). Por conveniencia, nos referimos a la concentración de iones hidrógeno en una solución, $[H^+]$, a pesar de que esto representa la concentración de iones hidronios, $[H_3O^+]$. La disociación del H_2O genera un ion OH^- junto con cada H^+ . La disociación de agua es una reacción reversible:



A 25 °C, $[H^+][OH^-] = 10^{-14} M^2$, por lo tanto, en agua pura, $[H^+] = [OH^-] = 10^{-7} M$.

Por convención, la concentración de iones hidrógeno en una solución se expresa como su **pH**, definido como el logaritmo negativo de la concentración de ion hidrógeno. El pH del agua pura a 25 °C es 7:

$$pH = -\log[H^+] = \log \frac{1}{[H^+]} = \log \frac{1}{[H^{-7}]} = 7$$

Es importante tener en cuenta que 1 unidad de diferencia en el pH representa una diferencia de 10 veces en la concentración de protones.

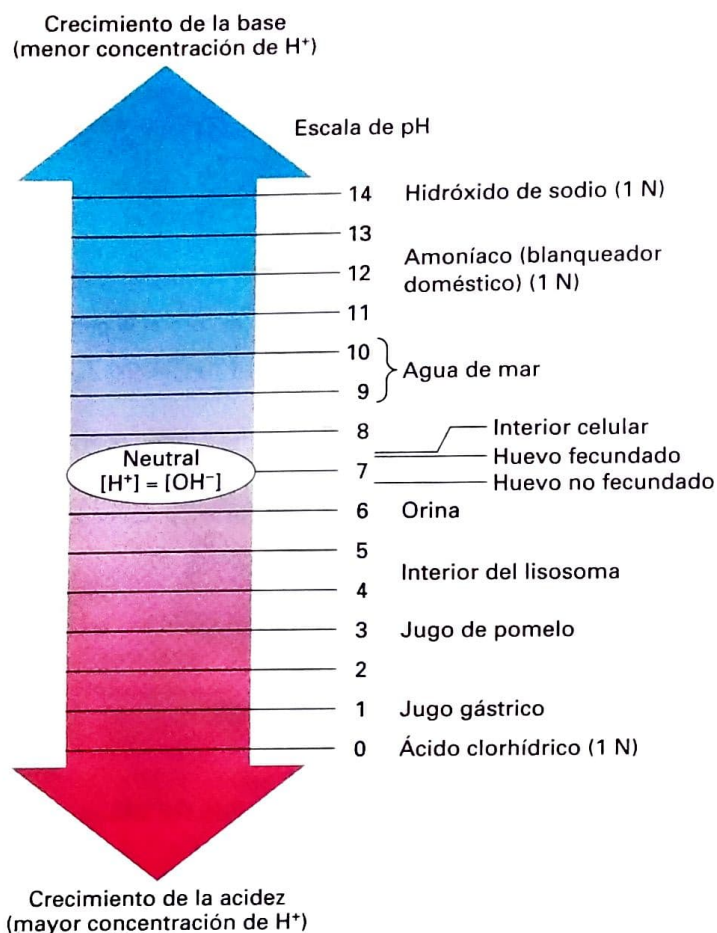


FIGURA 2-25 Valores de pH de soluciones comunes. El pH de una solución acuosa es el logaritmo negativo de la concentración del ion hidrógeno. Los valores de pH para la mayoría de los líquidos intracelulares y extracelulares son casi 7 y son cuidadosamente regulados para permitir el funcionamiento adecuado de las células y de las secreciones celulares.

En la escala de pH, 7,0 se considera neutro; valores por debajo de 7,0 indican soluciones ácidas (mayor [H^+]), y valores por encima de 7,0 indican soluciones básicas o alcalinas (Fig. 2-25). Por ejemplo, el jugo gástrico, que es rico en ácido clorhídrico (HCl), tiene un pH cercano a 1. La concentración de iones hidrógeno [H^+] es alrededor de un millón de veces mayor que la [H^+] en el citoplasma, con un pH cercano a 7,2.

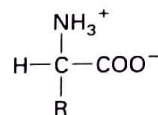
Aunque el citosol de las células normalmente tiene un pH de alrededor de 7,2, el interior de ciertos orgánulos en las células eucariotes (véase el Cap. 9) puede tener un pH mucho menor. Los lisosomas, por ejemplo, tienen un pH de alrededor de 4,5. En el interior de los lisosomas, existen muchas enzimas degradativas que funcionan de manera óptima en un medio ácido, mientras que sus acciones se inhiben en el ambiente casi neutro del citoplasma. Como lo ilustra este ejemplo, el mantenimiento de un pH específico es esencial para el funcionamiento adecuado de algunas estructuras celulares. Por el otro lado, los cambios drásticos en el pH celular pueden cumplir una función importante en el control de la actividad celular. Por ejemplo, el pH del citoplasma de un huevo no fecundado del erizo de mar, un animal acuático, es de 6,6. Sin embargo, dentro del minuto posterior a la fecundación, el pH se eleva a 7,2; es decir, la [H^+] disminuye alrededor de un cuarto de su valor original, un cambio necesario para el posterior desarrollo y división del huevo.

Los ácidos liberan iones hidrógeno y las bases los incorporan

En general, un **ácido** es cualquier molécula, ion o grupo químico que tiende a liberar un ion hidrógeno (H^+), como el ácido clorhídrico (HCl), y el grupo carboxilo ($-COOH$), que tiende a disociarse y formar el ion carboxilato cargado negativamente ($-COO^-$). De la misma forma, una **base** es cualquier molécula, ion o grupo químico que rápidamente se combina con un H^+ , como el ion hidroxilo (OH^-); el amoníaco (NH_3), que forma un ion amonio (NH_4^+); o el grupo amino ($-NH_2$).

Cuando se añade un ácido a una solución acuosa, la [H^+] aumenta y el pH desciende. Por el contrario, cuando se añade una base a una solución, la [H^+] disminuye y el pH aumenta. Debido a que [H^+][OH^-] es $10^{-14} M^2$, cualquier aumento en la [H^+] está acoplado con una disminución concomitante en la concentración de [OH^-], y viceversa.

Muchas moléculas biológicas contienen tanto grupos ácidos como básicos. Por ejemplo, en soluciones neutras (pH = 7,0), muchos aminoácidos existen predominantemente en la forma doblemente ionizada, en la cual el grupo carboxilo ha perdido un protón y el grupo amino ha aceptado uno:



donde R representa la cadena lateral sin carga. Tal molécula, que contiene igual número de iones positivos y negativos, se denomina un **zwitterión**. Los zwitteriones, no tienen carga neta, son neutros. A valores de pH extremos, solo uno de estos dos grupos ionizables de un aminoácido estará cargado.

La reacción de disociación para un ácido (o grupo ácido en una molécula grande) HA se puede escribir como $HA \rightleftharpoons H^+ + A^-$. La constante de equilibrio para esta reacción, denotada K_a (el subíndice "a" significa 'ácido'), se define como $K_a = [H^+][A^-]/[HA]$. Aplicando logaritmo a ambos lados y reordenando el resultado, es una relación muy útil entre la constante de equilibrio y el pH:

$$pH = pK_a + \log \frac{[A^-]}{[HA]} \quad (2-5)$$

donde el pK_a iguala al $\log -K_a$.

De esta expresión, comúnmente conocida como la *ecuación de Henderson-Hasselbalch*, se puede ver que el pK_a de cualquier ácido es igual al pH al cual la mitad de las moléculas está disociada y la otra mitad es neutra (no disociada). Esto es porque cuando $[A^-] = [HA]$, entonces el $\log ([A^-]/[HA]) = 0$, y, por lo tanto, $pK_a = pH$. La ecuación de Henderson-Hasselbalch nos permite calcular el grado de disociación de un ácido si se conocen tanto el pH de la solución como el pK_a de un ácido. Experimentalmente, al medir la [A^-] y [HA] como una función del pH de la solución, se puede calcular el pK_a del ácido, y así la constante de equilibrio K_a para la reacción de disociación (Fig. 2-26). Conociendo el pK_a de una molécula, no solo proporciona una descripción importante de sus propiedades, sino también nos permite

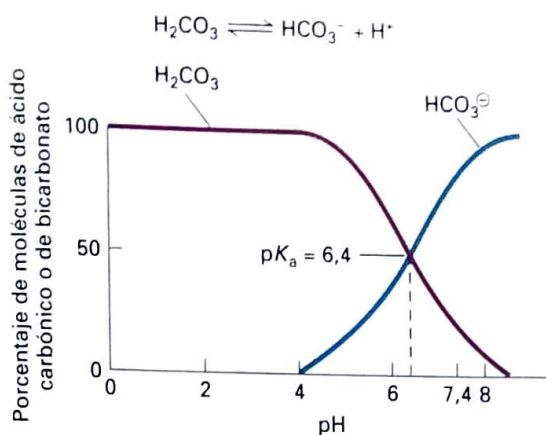


FIGURA 2-26 La relación entre pH, pK_a , y la disociación de un ácido.

A medida que el pH de una solución de ácido carbónico se eleva de 0 a 8,5, el porcentaje del compuesto en la forma no disociada o no ionizada (H_2CO_3) disminuye desde 100% y la forma ionizada aumenta desde el 0%. Cuando el pH (6,4) es igual al pK_a del ácido, la mitad de los ácidos carbónicos se ioniza. Cuando el pH sube por encima de 8, virtualmente todos los ácidos se ionizan a la forma de bicarbonato (HCO_3^-).

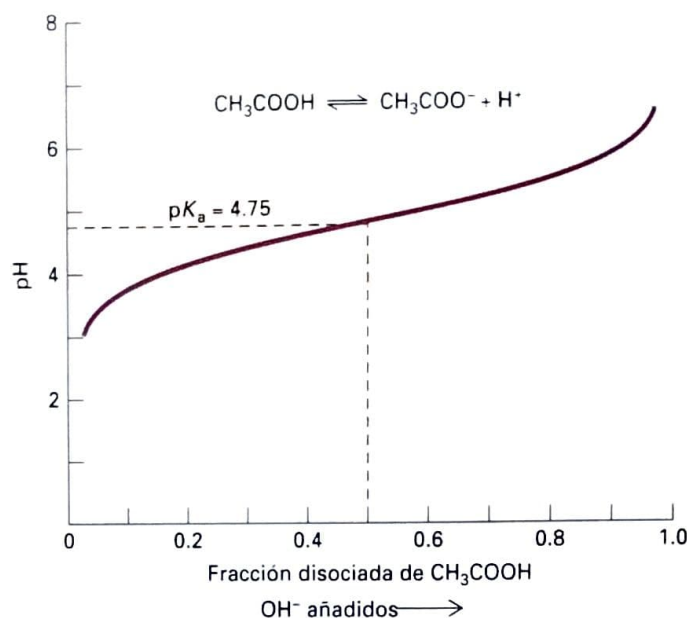


FIGURA 2-27 La curva de titulación del tampón o solución amortiguadora del ácido acético (CH_3COOH).

El pK_a para la disociación de ácido acético a iones hidrógeno y acetato es de 4,75. A este pH, la mitad de las moléculas de ácido está disociada. Debido a que el pH se mide en una escala logarítmica, la solución cambia del 91% de CH_3COOH a pH 3,75 hasta el 9% de CH_3COOH a pH 5,75. El ácido tiene su máxima capacidad amortiguadora en este rango de pH.

explotar estas propiedades para manipular la acidez de una solución acuosa y entender cómo los sistemas biológicos controlan las características importantes de sus líquidos acuosos.

Las soluciones amortiguadoras mantienen el pH de los líquidos intracelulares y extracelulares

Una célula viva con metabolismo activo debe mantener un pH constante en el citoplasma cercano a 7,2-7,4, a pesar de la producción metabólica de muchos ácidos, como el ácido láctico y el dióxido de carbono; este último reacciona con agua para formar ácido carbónico (H_2CO_3). Las células tienen una reserva de bases débiles y ácidos débiles, denominadas **soluciones amortiguadoras (búfer o tampones)**, que aseguran que el pH citoplasmático de una célula permanezca relativamente constante, a pesar de las pequeñas fluctuaciones en las cantidades de H^+ o de OH^- que se generan por el metabolismo o por la incorporación o secreción de moléculas e iones por parte de la célula. Los tampones realizan esto “absorbiendo” el exceso de H^+ o de OH^- , o cuando estos iones se añaden a la célula o son producidos por el metabolismo.

Si se añade ácido (o base) adicional a una solución amortiguadora cuyo pH es igual al pK_a del tampón ($[HA] = [A^-]$), el pH de la solución cambia, pero en menor grado que si no hubiera estado presente el tampón. Esto se debe a que los protones liberados por el ácido son incorporados por la forma ionizada de la solución amortiguadora (A^-); del mismo modo, los iones hidroxilos generados por la adición de base son neutralizados por protones liberados por el tampón no disociado (HA). La capacidad de una sustancia para liberar los iones hidrógenos o de incorporarlos depende, en parte, de la extensión a la cual la sustancia incorporó o liberó protones que, a su vez, dependen del pH de la solución relativa al pK_a de la sustancia. La capacidad de un tampón para minimizar los cambios en el pH, o la **capacidad amortiguadora**, depende de la concentración del tampón y de la relación entre los valores de pK_a y del pH, lo cual se expresa por la ecuación de Henderson-Hasselbalch.

La curva de titulación para el ácido acético que se muestra en la Figura 2-27 ilustra el efecto del pH en la fracción de moléculas en las formas no ionizadas (A^-) y en las ionizadas (HA). A una unidad de pH por debajo del pK_a de un ácido, el 91% de las moléculas se encuentra en la forma HA; a una unidad por encima del pK_a , el 91% se encuentra en la forma A^- . A valores de más de una unidad por encima o por debajo del pK_a , la capacidad amortiguadora de los ácidos y de bases débiles disminuye rápidamente. En otras palabras, el agregado de la misma cantidad de moles del ácido a una solución que contiene una mezcla de HA y A^- que está a un pH cercano al pK_a causará una variación del pH menor que si no estuvieran presentes HA y A^- o si el pH estuviera más alejado del valor de pK_a .

Todos los sistemas biológicos contienen uno o más tampones. Los iones fosfato—las formas ionizadas del ácido fosfórico—están presentes en cantidades considerables en las células y son un factor importante en el mantenimiento, o en la amortiguación, del pH del citoplasma. El ácido fosfórico (H_3PO_4) tiene tres protones que son capaces de disociarse, pero que no se disocian simultáneamente. La pérdida de cada protón se puede describir como una reacción de disociación diferenciada y un pK_a , como se muestra en la Figura 2-28. La curva de titulación para el ácido fosfórico muestra que el pK_a para la disociación del segundo protón es 7,2. Así, a un pH 7,2, alrededor del 50% del fosfato celular es $H_2PO_4^-$ y alrededor del 50% es HPO_4^{2-} , de acuerdo con la ecuación de Henderson-Hasselbalch.

Por esta razón, el fosfato es un excelente tampón para valores de pH alrededor del 7,2, el pH aproximado al del citoplasma de las células, y al pH 7,4, el pH de la sangre humana.

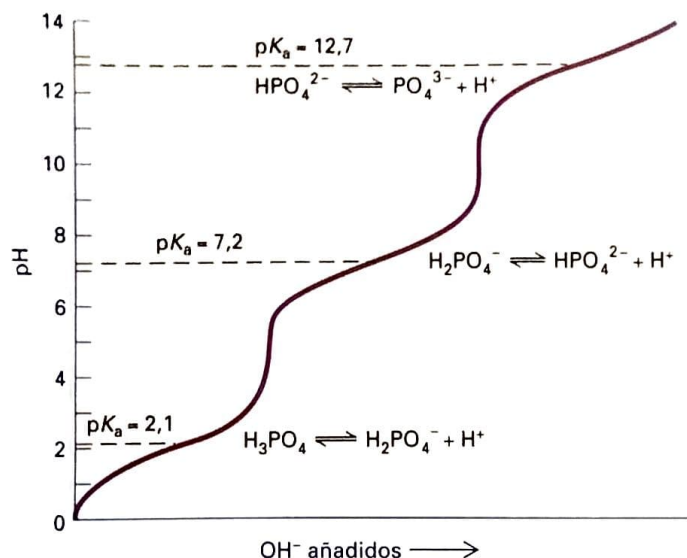


FIGURA 2-28 La curva de titulación del ácido fosfórico (H_3PO_4), un tampón o solución amortiguadora común en los sistemas biológicos. Esta molécula biológicamente ubicua tiene tres átomos de hidrógeno que se disocian a valores de pH diferentes; por lo tanto, el ácido fosfórico tiene tres valores de pK_a , como se observa en el gráfico. Las zonas sombreadas indican los rangos de pH—dentro de una unidad de pH de los tres valores de pK_a , donde la capacidad amortiguadora del ácido fosfórico es alta. En estas regiones, la adición de ácido (o base) causará cambios relativamente pequeños en el pH.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 2.3

Reacciones químicas y equilibrio químico

- Una reacción química está en equilibrio cuando la velocidad de la reacción directa es igual a la velocidad de la reacción inversa y, por lo tanto, no hay carga neta en la concentración de los reactivos o de los productos.
- La constante de equilibrio K_{eq} de una reacción refleja la relación entre productos y reactivos en el equilibrio y, por lo tanto, es una medida del grado de reacción y de las estabilidades relativas de los reactivos y de los productos.
- La K_{eq} depende de la temperatura, de la presión y de las propiedades químicas de los reactivos y de los productos, pero es independiente de la velocidad de reacción y de las concentraciones iniciales de los reactivos y de los productos.
- Para cualquier reacción, la constante de equilibrio es igual a la relación entre la constante de velocidad directa y la constante de velocidad inversa (K_{eq} es igual a k_d/k_i). Las velocidades de conversión o transformación de los reactivos y de los productos, y viceversa, dependen de las constantes de velocidad y de las concentraciones de los reactivos o de los productos.
- Dentro de las células, las reacciones conectadas en las vías metabólicas suelen estar en estado estacionario, no en equilibrio; durante las reacciones, la velocidad de formación de los intermediarios es igual a sus velocidades de consumo (véase la Fig. 2-23) y, por lo tanto, las concentraciones de los intermediarios no cambian.

• La constante de disociación K_d para la unión no covalente de dos moléculas es una medida de la estabilidad del complejo formado entre las moléculas (p. ej., complejos ligando-receptor o proteína-DNA).

• El pH es el logaritmo negativo de la concentración de los iones hidrógeno ($-\log[\text{H}^+]$). Normalmente, el pH del citoplasma se encuentra entre 7,2 y 7,4, mientras que el interior de los lisosomas tiene un pH de alrededor de 4,5.

• Los ácidos liberan protones (H^+), y las bases se unen a ellos. En las moléculas biológicas, los grupos carboxilos ($-\text{COOH}$) y fosforilos ($-\text{H}_2\text{PO}_4$) son los grupos más ácidos; el grupo amino ($-\text{NH}_2$) es el grupo más básico.

• Las soluciones amortiguadoras (tampones) son mezclas de ácidos débiles (HA) y su correspondiente forma de base (A^-) que minimizan el cambio en el pH de una solución cuando se agrega ácido o base. Los sistemas biológicos usan varias soluciones amortiguadoras para mantener sus pH dentro de un rango muy estrecho.

2.4 Energética bioquímica

La transformación de la energía, su almacenamiento y su uso son esenciales para la economía de la célula. La energía se puede definir como la capacidad para realizar trabajo, un concepto que se aplica a los motores de automóviles y a las plantas de energía eléctrica. La energía almacenada dentro de los enlaces químicos puede ser utilizada para sustentar el trabajo químico y los movimientos físicos de las células.

En esta sección, se revisarán el grado de influencia de la energía en las reacciones químicas—una disciplina que se denomina “termodinámica”—y las velocidades de las reacciones químicas—una disciplina que se denomina “cinética química”;

Varias formas de energía son importantes para los sistemas biológicos

Existen dos formas principales de energía: cinética y potencial. La **energía cinética** es la energía del movimiento—el movimiento de las moléculas, por ejemplo—. La **energía potencial** es energía almacenada—la energía almacenada en enlaces covalentes, por ejemplo—. La energía potencial cumple una función particularmente importante en la economía energética de las células.

La **energía térmica**, o calor, es una forma de energía cinética—la energía del movimiento de las moléculas—. Para que el calor realice “trabajo”, debe fluir desde una región de mayor temperatura—donde la velocidad promedio del movimiento molecular es mayor—hacia una de menor temperatura. Aunque pueden existir diferencias en las temperaturas entre ambientes internos y externos de las células, estos gradientes térmicos no suelen servir como fuente de energía para actividades celulares. La energía térmica en los animales de sangre caliente, que han desarrollado un mecanismo para la termorregulación, es utilizada principalmente para mantener la temperatura del organismo de modo constante. Esta es una función homeostática importante debido a que las velocidades de muchas actividades celulares dependen de la temperatura. Por ejemplo, el enfriamiento de las células de ma-

mífero desde su temperatura corporal normal de 37 °C a 4 °C puede virtualmente “congelar” o detener muchos procesos celulares (p. ej., los movimientos de las membranas intracelulares).

La *energía radiante* es la energía cinética de los fotones, u ondas de luz, y es crítica para la biología. La energía radiante puede convertirse en energía térmica, por ejemplo cuando la luz es absorbida por moléculas y la energía es convertida en movimiento molecular. La energía radiante absorbida por las moléculas también puede cambiar la estructura electrónica de estas, el movimiento de los electrones hacia orbitales de mayor energía, la cual puede recuperarse para realizar “trabajo”. Por ejemplo, durante la fotosíntesis, la energía lumínica absorbida por moléculas de pigmento como la clorofila es posteriormente convertida en la energía de los enlaces químicos (véase el Cap. 12).

La *energía mecánica*, una forma importante de energía cinética en la biología, suele ser el resultado de la conversión de energía química almacenada. Por ejemplo, los cambios en la longitud de los filamentos generan fuerzas que tiran o empujan de los orgánulos y de las membranas (véanse los Caps. 17 y 18).

La *energía eléctrica* —la energía del movimiento de los electrones o de otras partículas cargadas— es otra forma principal de energía cinética, con una importancia particular para la función de la membrana, como en las neuronas activadas eléctricamente (véase el Cap. 22).

Varias formas de energía potencial son biológicamente importantes. Para la biología, es fundamental la **energía química potencial**, la energía almacenada en los enlaces que conectan los átomos en las moléculas. En efecto, la mayoría de las reacciones bioquímicas que se describen en este libro involucra la formación o la ruptura de, al menos, un enlace químico covalente. Esta energía se reconoce cuando los compuestos químicos forman parte de reacciones liberadoras de energía. Por ejemplo, la energía potencial elevada en los enlaces covalentes de la glucosa puede ser liberada por combustión enzimática controlada en las células (véase el Cap. 12). Esta energía es aprovechada por la célula para realizar muchas clases de trabajos.

Una segunda forma biológicamente importante de energía potencial es la energía en un **gradiente de concentración**. Cuando la concentración de una sustancia a un lado de una barrera, como una membrana, es diferente de la del otro lado, se forma un gradiente de concentración. Todas las células forman gradientes de concentración entre sus líquidos internos y externos mediante el intercambio selectivo de nutrientes, de productos de desecho y de iones con el medio circundante. También, los orgánulos dentro de las células (p. ej., mitocondrias y lisosomas) frecuentemente contienen diferentes concentraciones de iones y de otras moléculas; la concentración de protones dentro de un lisosoma, como vimos en la última sección, es cerca de 500 veces la del citoplasma.

Una tercera forma de energía potencial en las células es el **potencial eléctrico**: la energía de separación de carga. Por ejemplo, existe un gradiente de carga eléctrica de ~200 000 volts por centímetro a través de la membrana plasmática de, virtualmente, todas las células. En el Capítulo 11, se analizará cómo se generan los gradientes de concentración y la diferencia de potencial a través de las membranas celulares; y en el Capítulo 12, cómo son convertidas en energía potencial química.

Las células pueden transformar un tipo de energía en otro

De acuerdo con la primera ley de la termodinámica, la energía no se crea ni se destruye, sino que se convierte de una forma en otra. (En las reacciones nucleares, la masa se convierte en energía, pero esto es irre-

levante para los sistemas biológicos.) Las conversiones de energía son muy importantes en biología. En la fotosíntesis, por ejemplo, la energía radiante de la luz se transforma en energía química potencial de los enlaces covalentes entre los átomos en una molécula de sacarosa o de almidón. En los músculos y nervios, la energía química potencial almacenada en los enlaces covalentes se transforma en la energía cinética de la contracción muscular y en la energía eléctrica de la transmisión nerviosa, respectivamente. En todas las células, la energía potencial —liberada por la ruptura de ciertos enlaces químicos— es usada para generar energía potencial en la forma de gradientes de concentración y de potencial eléctrico. Similarmente, la energía almacenada en los gradientes de concentración químicos o de potencial eléctrico se utiliza para sintetizar enlaces químicos o para transportar moléculas de un lado de la membrana a otro para generar un gradiente de concentración. El último proceso se produce durante el transporte de nutrientes, como la glucosa, dentro de ciertas células y durante el transporte de muchos productos de desecho fuera de estas.

Debido a que todas las formas de energía son convertibles entre ellas por otras de igual significación, pueden expresarse en las mismas unidades de medición. Aunque la unidad estándar de energía es el joule, los bioquímicos tradicionalmente utilizan una unidad alternativa, la **caloría** (1 joule = 0,239 calorías). Una caloría es la cantidad de energía necesaria para elevar la temperatura de un gramo en el agua en 1 °C. A través de todo este libro, se utilizará la “kilocaloría” para medir las variaciones de energía (1 kcal = 1 000 calorías).

Cuando usted lea o escuche acerca de las “Calorías” en los alimentos (nótese la letra mayúscula C), la referencia es casi siempre a kilocalorías (kcal), como se define aquí.

El cambio en la energía libre determina si una reacción química ocurrirá espontáneamente

Las reacciones químicas se pueden dividir en dos tipos dependiendo de si la energía es absorbida o liberada durante el proceso. En una reacción **exergónica** (“libera energía”), los productos contienen menos energía que los reactivos. Las reacciones exergónicas se producen espontáneamente. La energía liberada suele liberarse como calor (la energía del movimiento molecular), y, en general, produce una elevación de la temperatura, como en la oxidación (la quema) de la madera. En una reacción **endergónica** (“absorbe energía”), los productos contienen más energía que los reactivos y se absorbe energía durante la reacción. Si no existe una fuente externa de energía para conducir una reacción endergónica, esta no ocurre. Las reacciones endergónicas son responsables de la capacidad de enfriamiento instantáneo que se utilizan para tratar una lesión mediante bolsas y que se enfríe rápidamente por debajo de la temperatura ambiente. Comprimiendo la bolsa, se mezclan los reactivos y se inicia la reacción.

Un concepto fundamental para comprender si una reacción es “exergónica” o “endergónica” y, por lo tanto, si se produce de manera espontánea o no es la **energía libre**, G , denominada así en honor a J. W. Gibbs. Él recibió el primer doctorado en ingeniería en los Estados Unidos de América en 1863, al demostrar que “todos los sistemas cambian de modo tal que la energía libre [G] sea minimizada”. En otras palabras, una reacción química se produce de manera espontánea cuando la energía libre de los productos es menor que la energía libre de los reactivos. En el caso de una reacción química, reactivos $\leftrightarrow$ productos, la variación de energía libre, la ΔG , está dada por

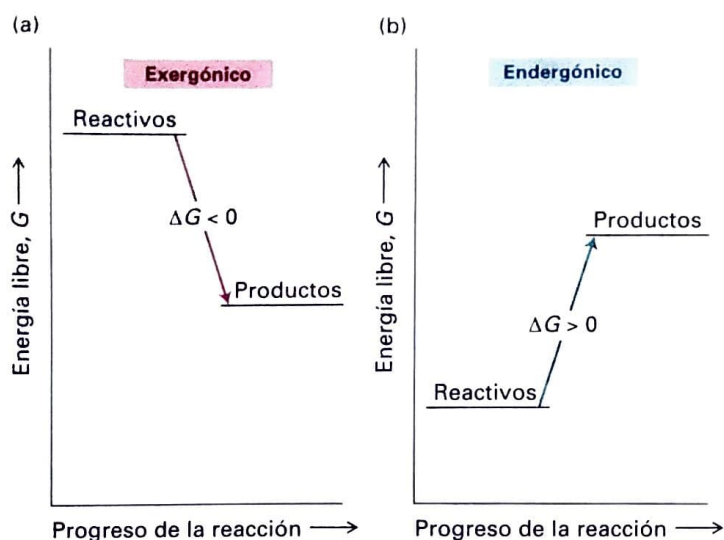


FIGURA 2-29 Cambios en la energía libre (ΔG) de las reacciones exergónicas y endergónicas. (a) En las reacciones exergónicas, la energía libre de los productos es menor que la de los reactivos. Por tanto, estas reacciones se producen de forma espontánea y la energía liberada a medida que la reacción progresa. (b) En las reacciones endergónicas, la energía libre de los productos es mayor que la de los reactivos y estas reacciones no ocurren espontáneamente. Se debe suministrar una fuente externa de energía si los reactivos han de ser convertidos en productos.

$$\Delta G = G_{\text{productos}} - G_{\text{reactivos}}$$

La relación de la ΔG respecto de la dirección de cualquier reacción química se puede resumir en tres enunciados:

- Si la ΔG es negativa, la reacción directa tenderá a ocurrir espontáneamente y la energía, por lo general, será liberada a medida que se produzca la reacción (reacción exergónica) (Fig. 2-29). Una reacción con una ΔG negativa se denomina “termodinámicamente favorable”.
- Si la ΔG es positiva, la reacción directa no ocurrirá de forma espontánea; la energía será añadida al sistema a fin de forzar a los reactivos a transformarse en productos (reacción endergónica).
- Si la ΔG es cero, tanto la reacción directa como la inversa se producirán a iguales velocidades y no será espontánea la conversión neta de reactivos a productos, o viceversa; el sistema estará en equilibrio.

Por convención, la *variación de energía libre estándar* de una reacción ΔG° es el valor de la variación de energía libre en condiciones de 298 grados Kelvin (25 °C), 1 atm de presión, pH 7,0 (como en el agua pura), y concentraciones iniciales de 1 M de todos los reactivos y productos; excepto los protones, que se mantienen a 10^{-7} M (pH 7,0). La mayoría de las reacciones biológicas difiere de las condiciones estándar, en particular, en las concentraciones de reactivos que, normalmente, son menores a 1 M.

La energía libre de un sistema químico se puede definir como $G = H - TS$, donde H es la energía de enlace, o **entalpía**, del sistema; T es su temperatura en grados Kelvin (K); y S es la **entropía**, una medida de su aleatoriedad o desorden. De acuerdo con la segunda ley de la termodinámica, la tendencia natural de cualquier sistema es la de tornarse más desordenado, es decir, para que se incremente la entropía. Una reacción puede ocurrir de manera espontánea solo si los efectos

combinados de variación en entalpía y entropía llevan a disminuir la ΔG . Es decir, si la temperatura permanece constante, una reacción procede espontáneamente solo si la variación de energía libre, ΔG , en la siguiente ecuación resulta negativa:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (2-6)$$

En una reacción química **exotérmica** (“libera calor”), la ΔH es negativa. En una reacción **endotérmica** (“absorbe calor”), la ΔH es positiva. Los efectos combinados de los cambios en la entalpía y la entropía determinan si la ΔG para una reacción es positiva o negativa y, por lo tanto, si la reacción ocurre de manera espontánea. Una reacción exotérmica ($\Delta H < 0$), en la cual la entropía aumenta ($\Delta S > 0$), se produce espontáneamente ($\Delta G < 0$). Una reacción endotérmica ($\Delta H > 0$) ocurrirá espontáneamente si la ΔS se incrementa lo suficiente de manera tal que el término $T\Delta S$ pueda superar el valor positivo de la variación de la energía de enlace.

Muchas reacciones biológicas tienden a incrementar el orden, y, en consecuencia, a disminuir la entropía ($\Delta S < 0$). Un ejemplo obvio es la reacción que liga los aminoácidos unos con otros para formar una proteína. Una solución de moléculas de proteínas tiene una menor entropía que una solución de los mismos aminoácidos no unidos, debido a que el movimiento libre de cualquier aminoácido en una proteína está más restringido (mayor orden) cuando está unido y forma parte de una cadena larga respecto de cuando no lo está. Así, cuando las células sintetizan polímeros, como las proteínas a partir de sus monómeros constituyentes, la reacción de polimerización solo será espontánea si las células pueden transferir eficientemente la energía tanto para generar los enlaces que mantienen a los monómeros juntos como para superar la pérdida de entropía que acompaña la polimerización. A menudo, las células realizan esta tarea al “acoplar” tales reacciones sintéticas que disminuyen la entropía con reacciones independientes que tienen una ΔG negativa muy alta (véase a continuación). En este sentido, las células pueden convertir fuentes de energía de sus entornos en la síntesis de estructuras altamente organizadas y en vías metabólicas que son esenciales para la vida.

La variación real en energía libre ΔG durante una reacción está influenciada por la temperatura, por la presión, y por las concentraciones iniciales de reactivos y de productos; y, por lo general, difieren de sus variaciones de energía libre estándares ΔG° . Muchas reacciones biológicas —así como otras que tienen lugar en soluciones acuosas— también se ven afectadas por el pH de la solución. Se pueden estimar las variaciones en energía libre para la temperatura y las concentraciones iniciales que difieran de las condiciones estándar utilizando la siguiente ecuación

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln Q = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{[\text{productos}]}{[\text{reactivos}]} \quad (2-7)$$

donde R es la constante gaseosa de 1 987 cal/(grado-mol), T es la temperatura (en grados Kelvin), y Q es la relación *inicial* entre productos y reactivos. Para una reacción $A + B \leftrightarrow C$, en la cual dos moléculas se combinan para formar una tercera, Q en la Ecuación 2-7 es igual $[C]/[A][B]$. En este caso, un aumento en la concentración inicial, tanto de $[A]$ como de $[B]$, resultará en un valor negativo más grande para la ΔG y, por lo tanto, la reacción tenderá espontáneamente a ocurrir hacia la formación de C .

Independientemente de la ΔG° para una reacción bioquímica particular, esta procederá de manera espontánea dentro de las células solo

si la ΔG es negativa, dada las concentraciones intracelulares de los reactivos y de los productos. Por ejemplo, la conversión de gliceraldehído 3-fosfato (G3P) en dihidroxiacetona fosfato (DHAP), dos intermediarios en la degradación de la glucosa,



tiene una ΔG° de $-1\,840$ cal/mol. Si las concentraciones iniciales de G3P y DHAP son iguales, entonces $\Delta G = \Delta G^\circ$ debido a que $RT \ln 1 = 0$; en esta situación, la reacción reversible $\text{G3P} \rightleftharpoons \text{DHAP}$ procederá espontáneamente en la dirección de formación de DHAP hasta alcanzar el equilibrio. Sin embargo, si la $[\text{DHAP}]$ es $0,1$ M y la $[\text{G3P}]$ es $0,0001$ M, con otras condiciones estándares, entonces Q en la Ecuación 2-7 es igual a $0,1/0,001 = 100$, dado una ΔG de $+887$ cal/mol. En estas condiciones, la reacción procederá en la dirección de formación de G3P.

La ΔG para una reacción es independiente de la velocidad de reacción. En efecto, en condiciones fisiológicas normales, muy pocas, si alguna, de las reacciones bioquímicas necesarias para sustentar la vida podrían ocurrir sin algunos mecanismos para incrementar las velocidades de reacción. Como se describe a continuación y en más detalle en el Capítulo 3, las velocidades de reacción en los sistemas biológicos suelen estar determinadas por la actividad de las **enzimas**: las proteínas catalizadoras que aceleran la formación de productos a partir de reactivos sin alterar el valor de la variación de la energía libre.

La ΔG° de una reacción se puede calcular a partir de su K_{eq}

Una mezcla química en el equilibrio está en estado estable de energía libre mínima. Para un sistema en el equilibrio ($\Delta G = 0$, $Q = K_{eq}$), se puede escribir

$$\Delta G^\circ = -2.3RT \log K_{eq} = -1362 \log K_{eq} \quad (2-8)$$

en condiciones estándar (nótese el cambio a logaritmo en base 10). Por lo tanto, si se determinan las concentraciones de los reactivos y de los productos en el equilibrio (es decir, la K_{eq}), se puede calcular el calor de la ΔG° . Por ejemplo, la K_{eq} para la conversión entre el gliceraldehído 3 fosfato en dihidroxiacetona fosfato ($\text{G3P} \rightleftharpoons \text{DHAP}$) es 22,2 en condiciones estándar. Al sustituir este valor en la Ecuación 2-8, se puede calcular fácilmente la ΔG° para esta reacción en $-1\,840$ cal/mol.

Si se reordena la Ecuación 2-8 y se aplica el antilogaritmo, se obtiene

$$K_{eq} = 10^{-(\Delta G^\circ / 2.3RT)} \quad (2-9)$$

A partir de esta expresión, queda claro que si la ΔG° es negativa, el exponente será positivo y, en consecuencia, la K_{eq} será mayor que 1. Por lo tanto, en el equilibrio, existirán más productos que reactivos; en otras palabras, se favorece la formación de productos a partir de reactivos.

A la inversa, si la ΔG° es positiva, el exponente será negativo y la K_{eq}

será menor que 1. La relación entre la K_{eq} y la ΔG° enfatiza, además, la influencia de las energías libres relativas de los reactivos y de los productos en el grado en el que se producirá una reacción de manera espontánea.

La velocidad de una reacción depende de la energía de activación necesaria para energizar los reactivos durante un estado de transición

A medida que una reacción química avanza, los reactivos se aproximan unos a otros; algunos enlaces comienzan a formarse y otros a romperse. Una manera de pensar el estado de las moléculas durante esta transición es que existen tensiones en las configuraciones electrónicas de los átomos y de sus enlaces. El conjunto de los átomos se mueve desde un estado relativamente estable de los reactivos hasta este estado transitorio, intermedio, de alta energía, durante el curso de la reacción (Fig. 2-30). El estado durante una reacción a la cual el sistema está en su nivel más alto de energía se denomina **estado de transición**, y el conjunto de los reactivos en ese estado se denominan **intermediarios del estado de transición**. La energía necesaria para excitar a los reactivos hasta su estado de mayor energía se denomina energía de activación de la reacción. La **energía de activación** suele estar representada por la $\Delta G^\ddagger$, análoga a la representación de la variación en la energía libre de Gibbs (ΔG), que se analizó. A partir del estado de transición, el conjunto de átomos puede liberar energía ya sea a medida que se forman los productos de reacción o a medida que los átomos “vuelven hacia atrás” a formar los reactivos originales. La velocidad (V) a la cual se generan los productos a partir de los reactivos durante la reacción bajo un conjunto de condiciones dadas (temperatura, presión, concentración de reactivos) dependerá de la concentración de material en el estado de

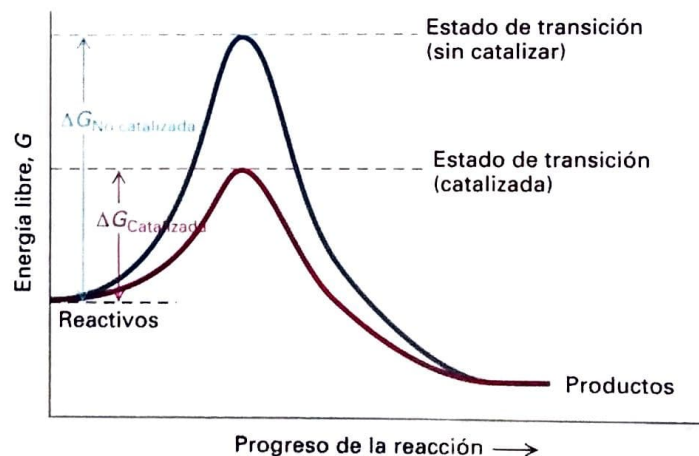


FIGURA 2-30 La energía de activación de las reacciones químicas catalizadas y no catalizadas. Esta vía de reacción hipotética (azul) describe los cambios en la energía libre, G , a medida que transcurre la reacción. Una reacción ocurrirá espontáneamente si la energía libre (G) de los productos es menor que la de los reactivos ($\Delta G < 0$). Sin embargo, todas las reacciones químicas proceden a través de uno (como se muestra aquí) o de más estados de transición de alta energía; y la velocidad de una reacción es inversamente proporcional a la energía de activación ($\Delta G^\ddagger$), que es la diferencia en energía libre entre los reactivos y el estado de transición. En una reacción catalizada (rojo), las energías libres de los reactivos y de los productos no cambian, pero la energía libre del estado de transición es más baja, por lo que se incrementa de este modo la velocidad de la reacción.

transición, que, a su vez, dependerá de la energía de activación y de la constante de velocidad característica (v) a la cual el estado de transición es convertido en productos. Cuanta más alta es la energía de transición, menor es la fracción de reactivos que alcanzan el estado de transición y más lenta es la velocidad de la reacción. La relación entre la concentración de los reactivos, v , y la V es

$$V = v [\text{reactivos}] \times 10^{-(\Delta G^\ddagger / 2.3RT)}$$

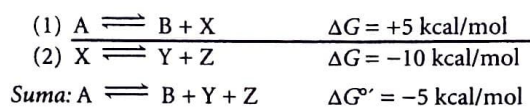
A partir de esta ecuación, se puede ver que disminuir la energía de activación —es decir, al disminuir la energía libre del estado de transición de la $\Delta G^\ddagger$ — lleva a una aceleración de la velocidad de la reacción global V . Una reducción en la $\Delta G^\ddagger$ de 1,36 kcal/mol conduce a un aumento de 10 veces en la velocidad de la reacción, mientras que una reducción de 2,72 kcal/mol produce un incremento de la velocidad de 100 veces. Por lo tanto, cambios relativamente pequeños en la $\Delta G^\ddagger$ pueden producir grandes cambios en la velocidad global de la reacción.

Los catalizadores como las enzimas (analizadas en el Cap. 3) aceleran las velocidades de la reacción al disminuir la energía relativa del estado de transición y, por lo tanto, la energía de activación necesaria para alcanzarla (véase la Fig. 2-30). Las energías relativas de los reactivos y los productos determinan si una reacción es termodinámicamente favorable (ΔG negativa), mientras que la energía de activación determinará cuán rápido se forman los productos, es decir, su cinética de reacción. Las reacciones termodinámicamente favorables no ocurrirán a velocidades apreciables si las energías de activación son demasiado altas.

La vida depende del acoplamiento de reacciones químicas desfavorables con otras energéticamente favorables

Muchos procesos en las células son energéticamente desfavorables ($\Delta G > 0$) y no procederán de manera espontánea. Como ejemplo, se pueden citar la síntesis del DNA a partir de nucleótidos y el transporte de una sustancia a través de la membrana plasmática desde una concentración más baja hacia una más alta. Las células pueden llevar a cabo una reacción que requiere energía, o endergónica ($\Delta G_1 > 0$), mediante el acoplamiento de esta a una reacción que libera energía; o exergónica ($\Delta G_2 < 0$), si la suma de las dos reacciones tiene una ΔG neta global negativa.

Suponiendo, por ejemplo, que la reacción $A \rightleftharpoons B + X$ tiene una ΔG de +5 kcal/mol y que la reacción $X \rightleftharpoons Y + Z$ tiene una ΔG de -10 kcal/mol:



En ausencia de la segunda reacción, habría mucho más A que B en el equilibrio. Sin embargo, debido a que la conversión de X en Y + Z es una reacción favorable, provocará que el primer proceso esté desplazado hacia la formación de B y el consumo de A. Las reacciones energéticamente desfavorables en las células suelen estar acopladas a la

hidrólisis de ATP que libera energía, como se analizará a continuación.

La hidrólisis de ATP libera una cantidad sustancial de energía libre y conduce muchos procesos celulares

En casi todos los organismos, el nucleótido **adenosina trifosfato**, o **ATP** (Fig. 2-31), es la molécula más importante para la captura, el almacenamiento transitorio y la subsecuente transferencia de energía para realizar “trabajo” (p. ej., para la biosíntesis y el movimiento mecánico). Comúnmente conocido como una “moneda” de energía celular, el ATP es un tipo de energía utilizable que las células pueden “gastar” con el fin de llevar a cabo sus actividades. La ilustre historia del ATP comienza con su descubrimiento en 1929, aparentemente de forma simultánea por Kurt Lohmann, quien trabajaba con el gran bioquímico Otto Meyerhof en Alemania y quien lo publicó primero, y por Cyrus Fiske y Yellagapada SubbaRow en los Estados Unidos de América. En 1930, se demostró que las contracciones musculares eran dependientes de ATP. La propuesta de que el ATP es el principal intermediario para la transferencia de energía en las células se le atribuye a Fritz Lipmann, alrededor de 1941. Se otorgaron muchos premios Nobel por el estudio del ATP y su función en el metabolismo energético celular, y su importancia para comprender la biología molecular y celular no debe ser

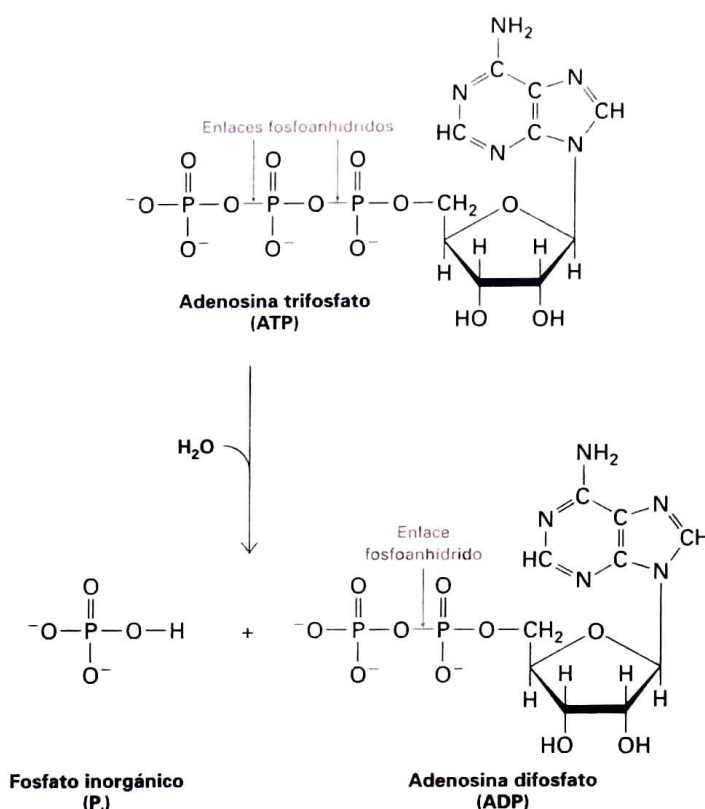
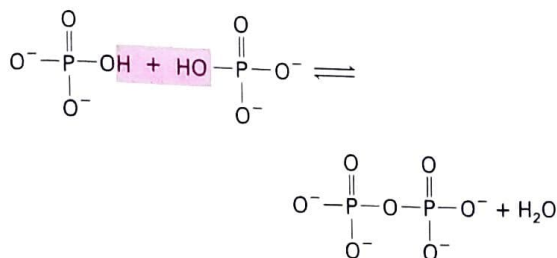


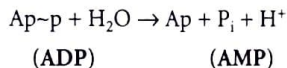
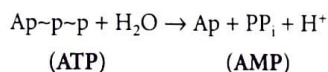
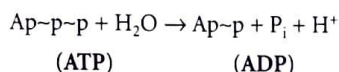
FIGURA 2-31 Hidrólisis del adenosin trifosfato (ATP). Los dos enlaces fosfoanhídridos (rojo) en el ATP (arriba), que unen los tres grupos fosfato, cada uno tiene una ΔG° de alrededor de -7,3 kcal/mol para la hidrólisis. La hidrólisis del enlace fosfoanhídrido terminal mediante la adición de agua produce la liberación de fosfato y la generación de adenosina difosfato. La hidrólisis de los enlaces fosfoanhídridos de la ATP, en especial de los terminales, es la fuente de energía que conduce muchas reacciones que requieren energía en los sistemas biológicos.

sobredimensionada.

La energía útil en una molécula de ATP está contenida en los **enlaces fosfodiésteres**, que son enlaces covalentes formados a partir de la condensación de dos moléculas de fosfato por la pérdida de agua:

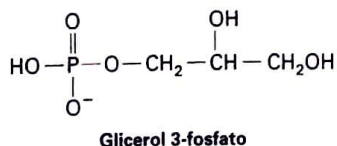


Como se muestra en la Figura 2-31, una molécula de ATP tiene dos enlaces fosfoanhídridos claves (también llamado “fosfodiésteres”). La formación de estos enlaces en el ATP requiere un aporte de energía. Cuando estos enlaces se hidrolizan, o se rompen por la adición de agua, esa energía se libera. La hidrólisis de un enlace fosfoanhídrido (representado por el símbolo ~) en cada una de las siguientes reacciones tiene una ΔG° altamente negativa de alrededor de $-7,3$ kcal/mol:



En estas reacciones que se producen en los sistemas biológicos, P_i representa el fosfato inorgánico (PO_4^{3-}) y PP_i para el pirofosfato inorgánico, dos grupos fosfato unidos por un enlace fosfoanhídrido. Al principio de las dos reacciones mostradas, la eliminación de un fosfato o de un grupo pirofosfato del ATP deja adenosina difosfato (ADP) o adenosina monofosfato (AMP), respectivamente.

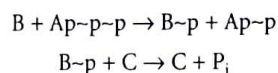
Un enlace fosfoanhídrido u otro “enlace de alta energía” (comúnmente denotado por ~) no es intrínsecamente diferente de otros enlaces covalentes. Los enlaces de alta energía simplemente liberan cantidades sustanciales de energía cuando se hidrolizan. Por ejemplo, la ΔG° para la hidrólisis de un enlace fosfoanhídrido en el ATP ($-7,3$ kcal/mol) es más de tres veces la ΔG° para la hidrólisis del enlace fosfoéster (rojo) en el glicerol 3-fosfato ($-2,2$ kcal/mol):



La razón principal de esta diferencia es que el ATP y sus productos de hidrólisis ADP y del P_i están altamente cargados a pH neutral. Durante la síntesis de ATP, se necesita un gran aporte de energía para forzar las cargas negativas del ADP y del P_i a juntarse. Por el contrario, toda esta energía se libera cuando el ATP es hidrolizado en ADP y P_i . En

comparación, la formación de enlace fosfoéster entre un hidroxilo sin carga en el glicerol y un P_i requiere menos energía, y se libera menos energía cuando este enlace es hidrolizado.

Las células han desarrollado mecanismos mediados por proteínas para la transferencia de energía libre liberada por la hidrólisis de enlaces fosfoanhídridos a otras moléculas; esto conduce así a reacciones que, de otra manera, serían energéticamente desfavorables. Por ejemplo, si la ΔG para la reacción $\text{B} + \text{C} \rightarrow \text{D}$ es positiva pero menor que la ΔG para la hidrólisis del ATP, la reacción puede transcurrir hacia la derecha mediante el acoplamiento de esta misma con la hidrólisis del enlace fosfoanhídrido terminal en el ATP. En un mecanismo común de tal *acoplamiento energético*, parte de la energía almacenada en este enlace fosfoanhídrido es transferida a uno de los reactivos mediante la ruptura del enlace en el ATP y la formación de un enlace covalente entre el grupo fosfato liberado y uno de los reactivos. El intermediario fosforilado generado de esta manera puede luego reaccionar con C para formar $\text{D} + \text{P}_i$ en una reacción que tiene una ΔG negativa:



La reacción total



es energéticamente favorable ($\Delta G < 0$).

Un mecanismo alternativo de acoplamiento energético es usar la energía liberada por la hidrólisis de ATP para cambiar la conformación de la molécula a un estado con tensión “rico en energía”. A su vez, la energía almacenada como tensión conformacional puede liberarse a medida que la molécula se “relaja” y regresa a su conformación sin tensión. Si el proceso de relajación puede acoplarse de forma mecánica a otra reacción, la energía liberada puede aprovecharse para llevar a cabo procesos celulares importantes.

Al igual que con muchas reacciones biosintéticas, el transporte de moléculas hacia el interior o el exterior de la célula suele tener una ΔG positiva y, por lo tanto, requiere un aporte de energía para proceder. Tales reacciones de transporte simple no involucran *directamente* la formación o la ruptura de enlaces covalentes; así, la ΔG° resulta 0. En el caso de una sustancia que se mueve hacia dentro de una célula, la Ecuación 2-7 se convierte en

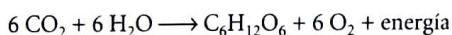
$$\Delta G = RT \ln \frac{[\text{C}_{\text{interior}}]}{[\text{C}_{\text{exterior}}]} \quad (2-10)$$

donde $[\text{C}_{\text{interior}}]$ es la concentración inicial de la sustancia dentro de la célula y $[\text{C}_{\text{exterior}}]$ es su concentración fuera de la célula. A partir de la Ecuación 2-10, se puede ver que la ΔG es positiva para el transporte de una sustancia hacia dentro de una célula en contra de su gradiente de concentración (cuando $[\text{C}_{\text{interior}}] > [\text{C}_{\text{exterior}}]$); la energía para conducir tal transporte “cuesta arriba” suele estar suministrada por la hidrólisis de ATP. Por el contrario, cuando una sustancia se mueve a favor de su gradiente de concentración ($[\text{C}_{\text{exterior}}] > [\text{C}_{\text{interior}}]$), la ΔG es negativa. Tal transporte “cuesta abajo” libera energía que puede acoplarse a una reacción que necesita energía, por ejemplo, el movimiento de otra sustancia cuesta arriba a través de la membrana o la síntesis de ATP en sí

misma (véanse los Capítulos 11 y 12).

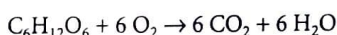
El ATP es generado durante la fotosíntesis y la respiración

El ATP es hidrolizado en forma continua para proporcionar energía para muchas actividades celulares. Algunas estimaciones sugieren que los seres humanos hidrolizan cada día una masa de ATP igual a la totalidad de su peso corporal. Claramente, para continuar funcionando, las células deben reabastecer de manera continua su suministro de adenosina trifosfato. El reabastecimiento constante de ATP requiere que las células continuamente obtengan energía de su entorno. Para casi todas las células, la fuente principal de energía usada para sintetizar ATP es la luz solar. Algunos organismos pueden usar la luz solar directamente. A través del proceso de fotosíntesis, las plantas, las algas y ciertas bacterias fotosintéticas atrapan la energía lumínica y la utilizan para sintetizar ATP a partir de ADP y P_i . Mucho del ATP producido por **fotosíntesis** es hidrolizado para proporcionar energía para la conversión de dióxido de carbono en azúcares de seis carbonos, un proceso llamado **fijación del carbono**:



Los azúcares sintetizados durante la fotosíntesis son una fuente de alimento y, por lo tanto, de energía para las plantas u otros organismos fotosintéticos que la realizan; y para los organismos no fotosintéticos, como los animales, ya sea que consumen las plantas directamente, o indirectamente al ingerir otros animales que hayan consumido plantas. De esta forma, la luz solar es la fuente directa o indirecta de energía para la mayoría de los organismos (véase el Cap. 12).

En las plantas, los animales, y casi todos los organismos, la energía libre en los azúcares y en otras moléculas derivadas de los alimentos se libera en los procesos de **glucólisis** y **respiración celular**. Durante la respiración celular, las moléculas ricas en energía de los alimentos (p. ej., la glucosa) son oxidadas a dióxido de carbono y agua. La oxidación completa de la glucosa



tiene una ΔG° de -686 kcal/mol y es la inversa de la fijación fotosintética del carbono. Las células utilizan un conjunto elaborado de reacciones mediadas por proteínas para acoplar la oxidación de una molécula de glucosa con la síntesis de hasta 30 moléculas de ATP a partir de 30 moléculas de ADP. Esta degradación (**catabolismo**) de la glucosa dependiente de oxígeno (**aeróbica**) es la principal vía para generar ATP en todas las células animales. El catabolismo de los ácidos grasos también puede ser una fuente importante de ATP.

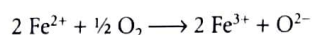
En el Capítulo 12, se analizarán los mecanismos de la fotosíntesis y de la respiración celular.

Aunque la energía lumínica capturada durante la fotosíntesis es la fuente primaria de energía química para las células, no es la única fuente. Ciertos microorganismos que viven en el interior o alrededor de las fosas oceánicas profundas, donde la luz solar adecuada falta por completo, obtienen la energía para convertir la ADP y el P_i en ATP a partir de la oxidación de compuestos inorgánicos reducidos. Estos compuestos reducidos se originan en las profundidades de la tierra y

son liberados en las fosas.

El NAD^+ y el FAD se acoplan a muchas reacciones biológicas de oxidación y reducción

En muchas reacciones químicas, los electrones son transferidos desde un átomo o molécula a otro; esta transferencia puede, o no, estar acompañada de la formación de nuevos enlaces químicos o de la liberación de energía, que puede acoplarse a otras reacciones. La pérdida de electrones de un átomo o de una molécula se denomina **oxidación**, y la ganancia de electrones por parte de un átomo o molécula se denomina **reducción**. Un ejemplo de oxidación es la eliminación de electrones de los grupos sulfhidrilos de dos cisteínas para formar un enlace disulfuro, como se describió en la Sección 2.2. Debido a que los electrones no se crean ni se destruyen en una reacción química, si un átomo o molécula se oxida, otro se debe reducir. Por ejemplo, el oxígeno extrae electrones de los iones Fe^{2+} (ferroso) para formar iones Fe^{3+} (férrico): una reacción que se produce como parte de un proceso por el cual los hidratos de carbono son degradados en las mitocondrias. Cada átomo de oxígeno recibe dos electrones, uno de cada ion Fe^{2+} :



Así, el Fe^{2+} se oxida y el O_2 se reduce. Tales reacciones, en las cuales una molécula se reduce y otra se oxida, suelen denominarse **reacciones redox**. El oxígeno es un aceptor de electrones en muchas reacciones en las células en condiciones aeróbicas.

Muchas reacciones de oxidación y reducción importantes biológicamente involucran la eliminación o la adición de átomos de hidrógeno (protones más electrones), en lugar de la transferencia aislada de electrones por sí solos. La oxidación del succinato a fumarato, que también se produce en las mitocondrias, es un ejemplo (Fig. 2-32). Los protones son solubles en soluciones acuosas (como H_3O^+), pero los electrones no, y deben ser transferidos directamente desde un átomo o molécula a otro sin un intermediario que se disuelva en agua. En este tipo de reacción de oxidación, los electrones suelen ser transferidos a moléculas pequeñas que transportan electrones, algunas veces llamadas "coenzimas". Los transportadores de electrones más comunes son la **NAD^+ (nicotinamida adenina dinucleótido)**, que se reduce a NADH, y la **FAD (flavina adenina dinucleótido)**, que se reduce a FADH_2 (Fig. 2-33). Las formas reducidas de estas coenzimas pueden transferir pro-

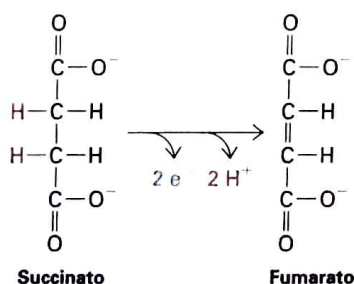
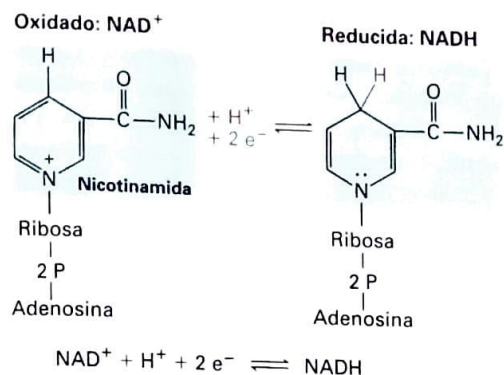


FIGURA 2-32 Conversión de succinato a fumarato. En este estado de oxidación, que se produce en la mitocondria como parte del ciclo del ácido carboxílico, el succinato pierde dos electrones y dos protones. Estos son transferidos al FAD, y lo reducen a FADH_2 .

(a)



(b)

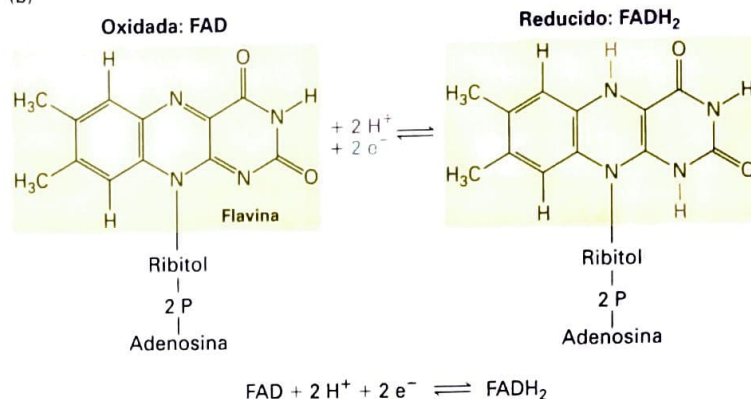


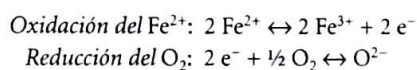
FIGURA 2-33 Las coenzimas transportadoras de electrones NAD^+ y FAD .

(a) El NAD^+ (nicotinamida adenina dinucleótido) se reduce a NADH por la adición de dos electrones y un protón simultáneamente. En muchas reacciones biológicas redox, se elimina un par de átomos de hidrógeno (dos protones y dos electrones) de una molécula. En algunos casos, uno de los protones y ambos electrones son transferidos a la NAD^+ ; el otro protón se libera a la solución.

(b) El FAD (flavina adenina dinucleótido) se reduce a FADH_2 por la adición de dos electrones y dos protones, como sucede cuando el succinato es convertido a fumarato (véase la Fig. 2-32). En esta reacción de dos pasos, la adición de un electrón junto con un protón genera primero un intermediario semiquinona de vida corta (no se muestra), que luego acepta un segundo electrón y protón.

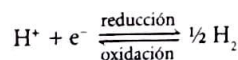
tones y electrones a otras moléculas y reducirlas.

Para describir las reacciones redox como la reacción de ion ferroso (Fe^{2+}) y oxígeno (O_2), lo más sencillo es dividir la reacción en dos mitades:



En este caso, el oxígeno reducido (O^{2-}) reacciona rápidamente con dos protones para formar una molécula de agua (H_2O). La facilidad con la cual un átomo o molécula gana un electrón es su **potencial de reducción E** . La tendencia a perder electrones, el **potencial de oxidación**, tiene la misma magnitud pero el signo opuesto que el potencial de reducción para la reacción inversa.

Los potenciales de reducción se miden en volts (V) a partir de un punto cero arbitrario establecido como el potencial de reducción de la siguiente mitad de reacción en condiciones estándar (25 °C, 1 atm, y reactivos a 1 M):



El valor de E para una molécula o un átomo en condiciones estándar es su potencial de reducción estándar, E° . Una molécula o ion con un E° positivo tiene mayor afinidad por los electrones que el ion H^+ en condiciones estándar. Contrariamente, una molécula o ion con un E° negativo tiene una menor afinidad por los electrones que el ion H^+ en condiciones estándar. Al igual que los valores para la ΔG° , los potenciales de reducción estándar pueden diferir de los hallados en condiciones celulares debido a que las concentraciones de los reactivos en una célula no son 1 M.

En una reacción redox, los electrones se mueven espontáneamente hacia átomos o moléculas que tienen potenciales de reducción más positivos. En otras palabras, una molécula que tiene un potencial de re-

ducción más negativo puede transferir electrones de manera espontánea, o reducirse, a una molécula con un potencial de reducción *más positivo*. En este tipo de reacción, la variación en el potencial eléctrico ΔE es la suma de los potenciales de reducción y de oxidación para las dos mitades de reacciones. El ΔE para una reacción redox está relacionado con la variación de la energía libre ΔG mediante la siguiente expresión:

$$\Delta G (\text{cal/mol}) = -n (23,064) \Delta E (\text{volts}) \quad (2-11)$$

donde n es el número de electrones transferidos. Nótese que una reacción redox con un valor positivo de ΔE tendrá una ΔG negativa y, por lo tanto, tenderá a proceder espontáneamente de izquierda a derecha.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 2.4

Energética bioquímica

- La variación de la energía libre, ΔG , es la medida más útil para predecir el potencial de las reacciones químicas que han de ocurrir de manera espontánea en los sistemas biológicos. Las reacciones químicas tienden a proceder espontáneamente en la dirección para la cual la ΔG es negativa. La magnitud de la ΔG es independiente de la velocidad de reacción. Una reacción con una ΔG negativa se denomina "termodinámicamente favorable".

- La variación de la energía química libre, ΔG° , es igual a $-2,3 RT \log K_{\text{eq}}$. Por lo tanto, el valor de la ΔG° se puede calcular a partir de las concentraciones de los reactivos y de los productos determinadas experimentalmente durante el equilibrio.

- La velocidad de una reacción depende de la energía de activación necesaria para energizar reactivos hasta un estado de transición. Los catalizadores, como las enzimas, aceleran las reacciones al disminuir la energía de activación del estado de transición.

• Una reacción química que tiene una ΔG positiva puede proceder si se acopla con una reacción que tenga una ΔG negativa de mayor magnitud.

• Muchos procesos celulares desfavorables energéticamente se producen por hidrólisis de enlaces fosfoanhídridos en el ATP (véase la Fig. 2-31).

• Directa o indirectamente, la energía lumínica capturada durante la fotosíntesis en plantas, algas y bacterias fotosintéticas es la fuente principal de energía química para casi todas las células.

• Una reacción de oxidación (pérdida de electrones) siempre está acoplada con una reacción de reducción (ganancia de electrones).

• Las reacciones de oxidación y reducción biológicas suelen estar acopladas a coenzimas transportadoras de electrones como el NAD^+ y el FAD (véase la Fig. 2-33).

• Las reacciones de oxidación-reducción con una ΔE positiva tienen una ΔG negativa y, por lo tanto, tienden a proceder de manera espontánea.

Palabras clave

ácido 46	hidrófilo 23
adenosina trifosfato (ATP) 52	hidrófobo 33
átomo de carbono α (C_α) 33	efecto hidrófobo 31
aminoácido 33	interacciones iónicas 28
anfipático 23	complementariedad molecular 32
base 46	monómero 33
solución amortiguadora (tampón) 47	monosacárido 37
catalizador 43	interacciones no covalentes 24
energía química potencial 49	nucleósido 37
enlace covalente 24	nucleótido 37
reacción de deshidratación 33	oxidación 54
dipolo 26	pH 45
constante de disociación (K_d) 45	enlace fosfoanhídrido 52
enlace disulfuro 35	fosfoglicérido 40
endergónica 49	bicapa fosfolipídica 40
endotérmica 50	polar 26
acoplamiento energético 53	polímero 33
entalpía (H) 50	reacción redox 54
entropía (S) 50	reducción 54
constante de equilibrio (K_{eq}) 43	saturada 40
exergónica 49	estado estacionario 44
exotérmico 50	estereoisómero 25
ácidos grasos 40	estado de transición 51
ΔG (variación de la energía libre) 49	insaturado 40
enlace de hidrógeno 28	interacción de van der Waals 30

Revisión de los conceptos

1. La salamandera es un reptil con una capacidad asombrosa para escalar superficies lisas, incluyendo vidrio. Descubrimientos recientes indican que las salamandras se adhieren a las superficies lisas a través de interacciones de van der Waals entre tabiques en sus pies y la superficie lisa. ¿Cómo es este método de adhesión ventajoso sobre las interacciones covalentes? Dado que las fuerzas de van der Waals están entre las interacciones moleculares más débiles, ¿cómo los pies de la salamandra se adhieren de forma tan eficiente?

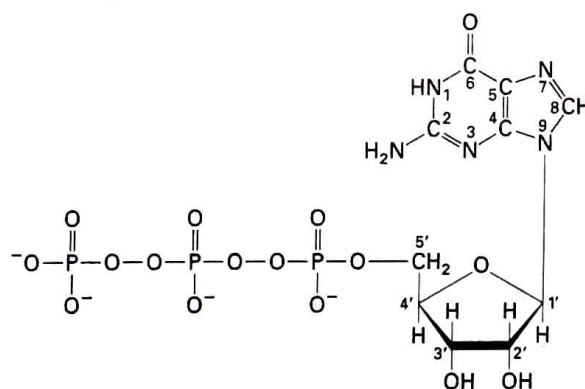
2. El canal de K^+ es un ejemplo de una proteína transmembrana (una proteína que atraviesa la bicapa fosfolipídica de la membrana plasmática). ¿Qué tipos de aminoácidos son más probables encontrar en (a) el recubrimiento interno del canal a través del cual pasan los K^+ , (b) el contacto con el centro hidrófobo de la bicapa fosfolipídica que contiene grupos acilos, (c) en el dominio citosólico de la proteína, (d) en el dominio extracelular de la proteína?

3. V-M-Y-F-E-N: estas son las abreviaturas de algunos aminoácidos: una letra para cada péptido. ¿Cuál es la carga neta de este péptido a pH 7,0? Una enzima denominada proteína tirosinasa puede adherir fosfatos a los grupos hidroxilos de la tirosina. ¿Cuál es la carga neta del péptido a pH 7,0 después de que ha sido fosforilado a una tirosinasa? ¿Cuál es la fuente probable de fosfato utilizada por la cinasa para esta reacción?

4. Los enlaces disulfuros contribuyen a estabilizar la estructura tridimensional de las proteínas. ¿Qué aminoácidos están involucrados en la formación de enlaces disulfuros? La formación de un enlace disulfuro ¿incrementa o disminuye la entropía (ΔS)?

5. En la década de 1960, el fármaco talidomida fue recetado a mujeres embarazadas para tratar las náuseas matutinas. Sin embargo, la talidomida causó defectos graves en las extremidades en los niños nacidos de algunas mujeres que habían ingerido el fármaco, y se desaconsejó su uso para tratar las náuseas matutinas. En la actualidad, se sabe que la talidomida se administró como una mezcla de dos compuestos que son estereoisómeros, uno de los cuales aliviaba las náuseas y el otro era el responsable de los defectos congénitos. ¿Qué son los estereoisómeros? ¿Por qué dos compuestos estrechamente relacionados tienen efectos fisiológicos tan diferentes?

6. Nombre el siguiente compuesto.

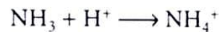


Este nucleótido ¿es un componente del DNA, del RNA o de ambos?

7. Las bases químicas de la especificidad de grupo sanguíneo residen en los hidratos de carbono exhibidos en la superficie de los eritrocitos. Los hidratos de carbono tienen el potencial para la gran diversidad estructural. En efecto, la complejidad estructural de los oligosacáridos que se pueden formar a partir de cuatro azúcares es mayor que la de los oligopéptidos que pueden formarse a partir de cuatro aminoácidos. ¿Qué propiedades de los hidratos de carbono hacen posible esta gran diversidad estructural?

8. Calcular el pH de 1 litro de agua pura en el equilibrio. ¿Cómo cambiará el pH después de que se disuelven en el agua 0,008 moles de una base fuerte NaOH? Ahora, calcular el pH de una solución acuosa de 50 mM del ácido débil ácido 3-(N-morfolino) propano1-sulfónico (MOPS) en el cual el 61% del soluto está en su forma de ácido débil y el 39% está en la forma de base conjugada MOPS (el pK_a para MOPS es 7,20). ¿Cuál es el pH final después de añadir 0,008 moles de NaOH a 1 litro de este tampón MOPS?

9. El amoníaco (NH_3) es una base débil que, en condiciones ácidas, se protona para dar el ion amonio en la siguiente reacción:



El NH_3 atraviesa libremente las membranas, incluyendo la de los lisosomas. El lisosoma es un orgánulo subcelular con un pH de alrededor de 4,5-5,0; el pH del citoplasma es ~7,0. ¿Cuál es el efecto en el pH del contenido líquido de los lisosomas cuando las células son expuestas a amoníaco? *Nota:* el amoníaco protonado no se difunde libremente a través de las membranas.

10. Considere la reacción de unión $L + R \longrightarrow LR$, donde L es un ligando y R es su receptor. Cuando se agrega 1×10^{-3} M de L a una solución que contiene 5×10^{-2} M de R, el 90% de L se une a la forma de LR. ¿Cuál es la K_{eq} de esta reacción? ¿Cómo será afectada la K_{eq} por la adición de una proteína que facilita (cataliza) esta reacción de unión? ¿Qué es la constante de equilibrio de disociación K_d ?

11. ¿Cuál es el estado de ionización del ácido fosfórico en el citoplasma? ¿Por qué el ácido fosfórico es un compuesto fisiológico tan importante?

12. La ΔG° para la reacción $X + Y \longrightarrow XY$ es $-1\,000$ cal/mol. ¿Cuál es el ΔG a 25 °C (298 Kelvin) comenzando con 0,01 M de cada X, Y y XY? Sugiera dos formas que podrían hacer que esta reacción sea energéticamente favorable.

13. De acuerdo con expertos en salud, los ácidos grasos, que provienen de las grasas animales, son un factor importante que contribuye a las enfermedades cardiovasculares. ¿Qué distingue a un ácido graso saturado de uno insaturado, y a qué se refiere el término saturado? Recientemente, los ácidos grasos insaturados trans, o grasas trans, que elevan las concentraciones totales de colesterol en el cuerpo, también han sido implicadas en las enfermedades coronarias. ¿Cómo difiere el estereoisómero cis de la configuración trans, y qué efectos tiene la configuración cis en la estructura de la cadena de ácido graso?

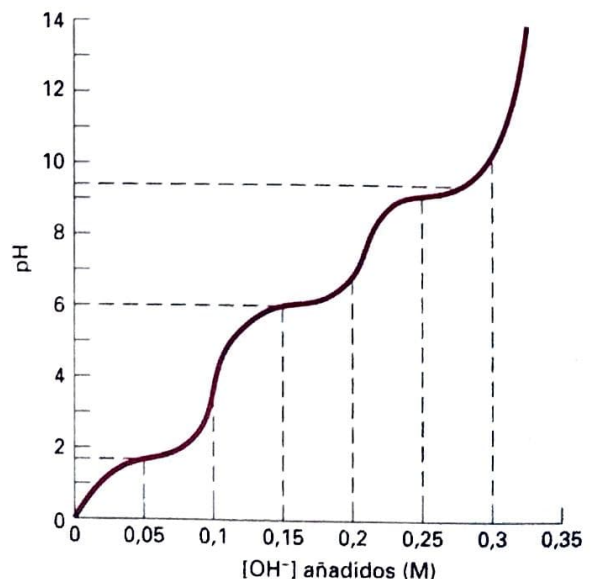
14. Las modificaciones químicas de los aminoácidos contribuyen a la diversidad y a la función de las proteínas. Por ejemplo, la γ -carboxilación de aminoácidos específicos es necesaria para que algunas proteínas

sean biológicamente activas. ¿Qué aminoácido particular sufre estas modificaciones, y cuál es la relevancia biológica? La warfarina –un derivado de la cumarina, que está presente en muchas plantas– inhibe la γ -carboxilación de este aminoácido y se utilizó en el pasado como veneno contra las ratas. En la actualidad, también se la utiliza clínicamente en los seres humanos. ¿A qué tipo de pacientes se les podría recetar warfarina y por qué?

Análisis de los datos

1. Durante gran parte del “siglo de las luces”, en la Europa del siglo XVIII, los científicos trabajaron con la creencia de que las cosas vivas y el mundo inanimado eran fundamentalmente formas diferentes de materia. Luego, en 1828, Friedrich Wöhler demostró que él podía sintetizar urea, un producto de desecho de los animales, a partir de los minerales isocianato de plata y cloruro de amoníaco. ¡“Puedo sintetizar urea sin los riñones”!, se dice que comentó. Del descubrimiento de Wöhler, el químico por excelencia Justus von Liebig escribió, en 1837, que la “producción de urea debía considerarse uno de los descubrimientos con el cual comenzaba una nueva era en la ciencia”. Apenas más de cien años después, Stanley Miller descargó chispas en una mezcla de H_2O , CH_4 , NH_3 , y H_2 en un esfuerzo por simular las condiciones químicas de una atmósfera reducida terrestre ancestral (la chispa imitaba la descarga eléctrica que impacta sobre un océano primitivo o “sopa”) e identificó muchas biomoléculas en la mezcla resultante, incluyendo aminoácidos e hidratos de carbono. ¿Qué sugieren estos experimentos acerca de la naturaleza de las biomoléculas y la relación que existe entre la materia orgánica (viva) y la inorgánica (no viva)? ¿Qué sugirieron acerca de la evolución de la vida? ¿Qué indican acerca del valor de la química en la comprensión de las cosas vivas?

2. En el siguiente gráfico, se ilustra el efecto que la adición de una base fuerte, como el hidróxido de sodio, tiene sobre el pH de una solución acuosa de 0,1 M de un aminoácido. Asumir que, antes de la adición de cualquier OH^- , los aminoácidos disueltos por completo en la muestra están en su forma totalmente protonada. La adición de OH^- causa el incremento abrupto esperado en el pH de la solución, hasta que, aproximada-



mente entre los 0,03 a 0,07 M de NaOH, el pH de la solución permanece casi constante a un pH 1,8 aproximadamente. ¿Qué causa la resistencia al cambio del pH en este intervalo? ¿Cómo se denominan las soluciones que resisten cambios en el pH? ¿Qué grupo químico orgánico de los aminoácidos es más probable que sea responsable de este fenómeno a un pH 1,8? La base adicional causa que el pH aumente rápidamente hasta que la concentración de la base alcanza los 0,15 M y 0,25 M, puntos en los cuales el pH de la solución oscila alrededor de valores de 6 y 9,3, respectivamente. ¿Cuál es el significado de estos valores de pH? ¿Qué aminoácido sospecha usted está siendo titulado?

Bibliografía

- Alberty, R. A., and R. J. Silbey. 2005. *Physical Chemistry*, 4th ed. Wiley.
- Atkins, P., and J. de Paula. 2005. *The Elements of Physical Chemistry*, 4th ed. W. H. Freeman and Company.
- Berg, J. M., J. L. Tymoczko, and L. Stryer. 2007. *Biochemistry*, 6th ed. W. H. Freeman and Company.
- Cantor, P. R., and C. R. Schimmel. 1980. *Biophysical Chemistry*. W. H. Freeman and Company.
- Davenport, H. W. 1974. *ABC of Acid-Base Chemistry*, 6th ed. University of Chicago Press.
- Eisenberg, D., and D. Crothers. 1979. *Physical Chemistry with Applications to the Life Sciences*. Benjamin-Cummings.
- Guyton, A. C., and J. E. Hall. 2000. *Textbook of Medical Physiology*, 10th ed. Saunders.
- Hills, T. J. 1977. *Free Energy Transduction in Biology*. Academic Press.
- Klotz, I. M. 1978. *Energy Changes in Biochemical Reactions*. Academic Press.
- Murray, R. K., et al. 1990. *Harper's Biochemistry*, 25th ed. Lange. Nicholls, D. G., and S. J. Ferguson. 1992. *Bioenergetics 2*. Academic Press.
- Oxtoby, D., H. Gillis, and N. Nachtrieb. 2003. *Principles of Modern Chemistry*, 5th ed. Saunders.
- Sharon, N. 1980. Carbohydrates. *Sci. Am.* **243**(5):90-116.
- Tanford, C. 1980. *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*, 2d ed. Wiley.
- Tinoco, I., K. Sauer, and J. Wang. 2001. *Physical Chemistry—Principles and Applications in Biological Sciences*, 4th ed. Prentice Hall.
- Van Holde, K., W. Johnson, and P. Ho. 1998. *Principles of Physical Biochemistry*. Prentice Hall.
- Voet, D., and J. Voet. 2004. *Biochemistry*, 3d ed. Wiley.
- Wood, W. B., et al. 1981. *Biochemistry: A Problems Approach*, 2d ed. Benjamin-Cummings.



Modelo molecular del proteasoma de la arqueobacteria termófila y acidófila *T. acidophilum*, representada tanto mediante las superficies accesibles al solvente (*abajo*) como por el modelo de cintas (*arriba*). Los proteasomas son máquinas moleculares que digieren proteínas, constituidos por un núcleo catalítico medio (rojo, beige y gris) en el que tiene lugar la degradación y dos casquetes que son subunidades reguladoras (amarillo y negro), que reconocen a las proteínas que han sido marcadas para su destrucción por la adición de moléculas de ubiquitina. (Ramón Andrade 3DCiencia/Science Photo Library)

Estructura y función de las proteínas

Las proteínas, que son polímeros de aminoácidos, existen en muchas formas y tamaños. Su diversidad tridimensional refleja principalmente las variaciones en sus longitudes y secuencias de aminoácidos. En general, el polímero lineal no ramificado de aminoácidos que compone cualquier proteína se plegará solo en una o en unas pocas formas tridimensionales relacionadas, llamadas **conformaciones**. La conformación de una proteína junto con las propiedades químicas distintivas de sus cadenas laterales de aminoácidos determina su función. Dadas sus muchas formas y propiedades químicas diferentes, las proteínas pueden desempeñar una cantidad sorprendente de funciones distintas, dentro de las células y fuera de ellas, que resultan esenciales para la vida o para proporcionar una ventaja evolutiva selectiva a la célula o al organismo que las contiene. Por lo tanto, no resulta sorprendente que la caracterización de las estructuras y actividades de las proteínas sea un requisito fundamental para comprender cómo funciona

la célula. La mayor parte de este libro está dedicada a examinar el modo en que las proteínas actúan en conjunto, para que las células puedan vivir y funcionar adecuadamente.

Si bien sus estructuras son diversas, la mayoría de las proteínas individuales pueden agruparse en una de unas pocas clases funcionales amplias. Las *proteínas estructurales*, por ejemplo, determinan las formas de las células y sus ambientes extracelulares y sirven como cables-guía o rieles para dirigir el movimiento intracelular de las moléculas y orgánulos. Habitualmente se forman por el ensamblaje de múltiples unidades proteicas en estructuras muy grandes, largas. Las *proteínas de andamiaje* mantienen juntas a otras proteínas en disposiciones ordenadas, para que desempeñen funciones específicas más eficientemente que si no se encontraran ensambladas. Las *enzimas* son proteínas que catalizan las reacciones químicas. Las *proteínas de transporte de membrana* permiten el flujo de iones y de moléculas a

CONTENIDO

3.1 Estructura jerárquica de las proteínas	61	3.5 Purificación, detección y caracterización de proteínas	93
3.2 Plegamiento de las proteínas	70	3.6 Proteómica	106
3.3 Unión de las proteínas y catálisis enzimática	77		
3.4 Regulación de la función de las proteínas	85		

través de las membranas celulares. Las *proteínas reguladoras* actúan como señales, sensores e interruptores, para controlar las actividades de las células al alterar las funciones de otras proteínas y genes. Las proteínas reguladoras incluyen proteínas de señalización, como las hormonas y los receptores de la superficie celular, que transmiten las señales extracelulares al interior de la célula. Las *proteínas motoras* son responsables del movimiento de otras proteínas, orgánulos, células e inclusive organismos completos. Cualquier proteína puede ser miembro de más de una clase proteica, como ocurre en el caso de ciertos receptores de la superficie celular de señalización, que son tanto enzimas como proteínas reguladoras, porque transmiten señales del exterior al interior de las células al catalizar reacciones químicas. Para llevar a cabo de forma eficiente sus distintas misiones algunas proteínas se ensamblan en complejos de mayor tamaño llamados con frecuencia *máquinas moleculares*.

¿Cómo desempeñan las proteínas tantas funciones distintas? Lo hacen explotando unas pocas actividades simples. Básicamente, las proteínas se *unen* entre sí, a otras macromoléculas, como el DNA y a moléculas pequeñas y iones. En muchos casos, esta unión induce un cambio de conformación de la proteína que, de ese modo, ejerce influencia sobre su actividad. La unión se basa en la complementariedad molecular entre una proteína y su compañera de unión, según se describió en el Capítulo 2. Una segunda actividad clave es la *catálisis* enzimática. El plegamiento apropiado de una proteína ubicará ciertas cadenas laterales de aminoácidos y grupos carboxilo y amino de su esqueleto, en posiciones que permiten la catálisis de reconfiguración de enlaces covalentes. Una tercera actividad implica el *plegamiento* en un canal o poro dentro de una membrana, a través del cual fluyen moléculas y iones. Aunque estas son actividades especialmente cruciales de las proteínas, no son las únicas. Por ejemplo, los peces que viven en aguas gélidas (el pez polar *Pagothenia borchgrevinki* y los bacalao árticos) tienen unas proteínas anticongelación en los sistemas circulatorios para evitar la cristalización del agua.

La comprensión integral del modo en que las proteínas permiten que las células vivan y se desarrollen requiere la identificación y caracterización de todas las proteínas usadas por una célula. En un sentido, los biólogos celulares moleculares desean compilar una “lista de componentes” completa de una proteína y construir un “manual de usuario” que describa la forma en que funcionan. La compilación de un inventario abarcador de las proteínas se ha vuelto posible en años recientes al secuenciar *genomas* —conjunto completo de genes— completos de un número creciente de organismos. A partir del análisis por ordenador de las secuencias genómicas, los investigadores pueden deducir las secuencias aminoácídicas y aproximarse al número de proteínas codificadas (véase Cap. 5). El término *proteoma* fue acuñado para aludir al complemento total de las proteínas de un individuo. El genoma humano contiene entre 20 000 y 23 000 genes que codifican proteínas. Sin embargo, las variaciones en la producción del mRNA tales como el corte y empalme alternativo (véase Cap. 8) y más de 100 tipos de modificaciones proteicas, pueden generar cientos de miles de distintas proteínas humanas. Al comparar las secuencias y estructuras de las proteínas de función desconocida con aquellas cuya función se conoce, los científicos con frecuencia pueden deducir mucho acerca de lo que hacen estas proteínas. En el pasado, la caracterización de la función proteica por métodos genéticos, bioquímicos o fisiológicos, con frecuencia precedía a la identificación de proteínas particulares. En la moderna era genómica y proteómica, con frecuencia se identifica a la proteína antes de determinar su función.

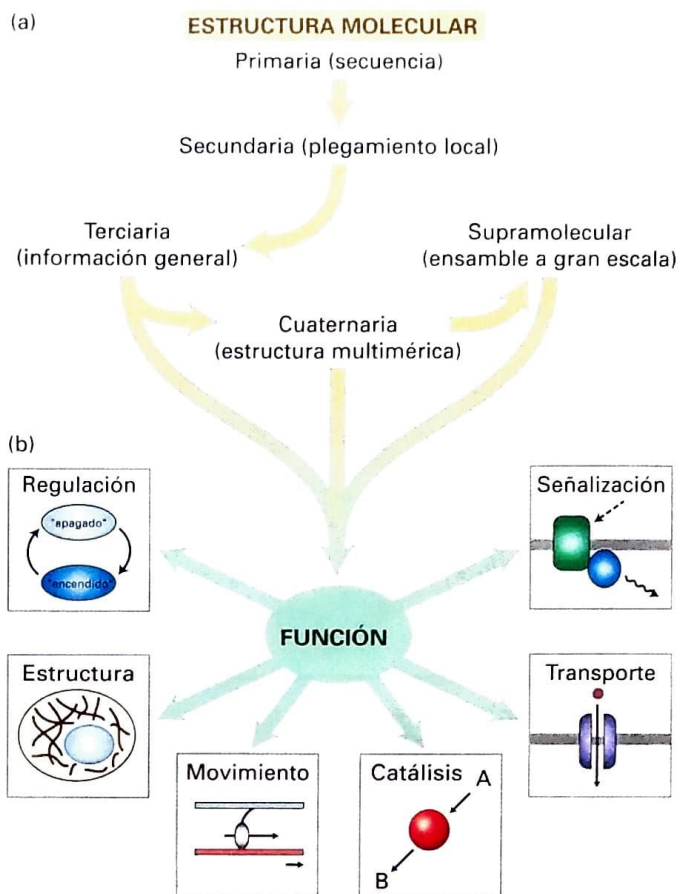


FIGURA 3-1 Resumen de la estructura y función de las proteínas.

(a) Las proteínas tienen una estructura jerárquica. Una secuencia lineal de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos (estructura primaria) se pliega en hélices u hojas locales (estructura secundaria) que se empaquetan en una forma tridimensional compleja (estructura terciaria). Algunos polipéptidos individuales se asocian en complejos de múltiples cadenas (estructura cuaternaria) que, en algunos casos, pueden ser muy grandes y consistir en decenas a cientos de subunidades (complejos supramoleculares). (b) Las proteínas desempeñan numerosas funciones que incluyen la organización en el espacio tridimensional del genoma, los orgánulos, el citoplasma, los complejos proteicos y las membranas (estructura); el control de la actividad proteica (regulación); la monitorización del ambiente y la transmisión de información (señalización); el movimiento de pequeñas moléculas e iones a través de las membranas (transporte); la catálisis de reacciones químicas (por medio de enzimas) y la generación de fuerza para el movimiento (mediante proteínas motoras). Estas y otras funciones surgen de interacciones de unión específicas y de cambios de conformación en la estructura de una proteína adecuadamente plegada.

En este capítulo comenzamos nuestro estudio considerando el modo en que la estructura de una proteína dará lugar a su función, tema que recurrirá durante todo este libro (Fig. 3-1). La primera sección examina de qué manera las cadenas lineales de los bloques estructurales de aminoácidos se disponen en una jerarquía estructural tridimensional. La siguiente sección analiza la forma en que las proteínas se pliegan en estas estructuras. Luego nos dedicamos a la función proteica, fijándonos en las enzimas, la clase especial de proteínas que catalizan las reacciones químicas. Se cubren luego diferentes mecanismos que las células usan para controlar las actividades y el espectro vital de las proteínas. El capítulo concluye con un debate acerca de las técnicas usadas con frecuencia para identificar, aislar y caracterizar a las proteínas e incluye un análisis del floreciente campo de la proteómica.

3.1 Estructura jerárquica de las proteínas

Una cadena proteica se pliega en una forma tridimensional característica, estabilizada principalmente por interacciones no covalentes entre las regiones de la secuencia lineal de aminoácidos. Un concepto clave para comprender el modo en que opera una proteína es que la función deriva de la estructura tridimensional, y la estructura tridimensional está determinada tanto por la secuencia de aminoácidos, como por las interacciones intramoleculares no covalentes de una proteína. Los principios que relacionan la estructura y la función biológica fueron formulados inicialmente por los biólogos Johann von Goethe (1749-1832), Ernst Haeckel (1834-1919) y D'Arcy Thompson (1860-1948), cuyo trabajo ha tenido gran influencia en la biología y la ha trascendido. En realidad, sus ideas ejercieron gran influencia en la escuela de la arquitectura "orgánica", pionera de los inicios del siglo XX reflejada a la perfección por la sentencia "la forma hace a la función" (Louis Sullivan) y "la forma es la función" (Frank Lloyd Wright). Aquí consideramos la arquitectura de las proteínas en cuatro niveles de organización: primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria (Fig. 3-2).

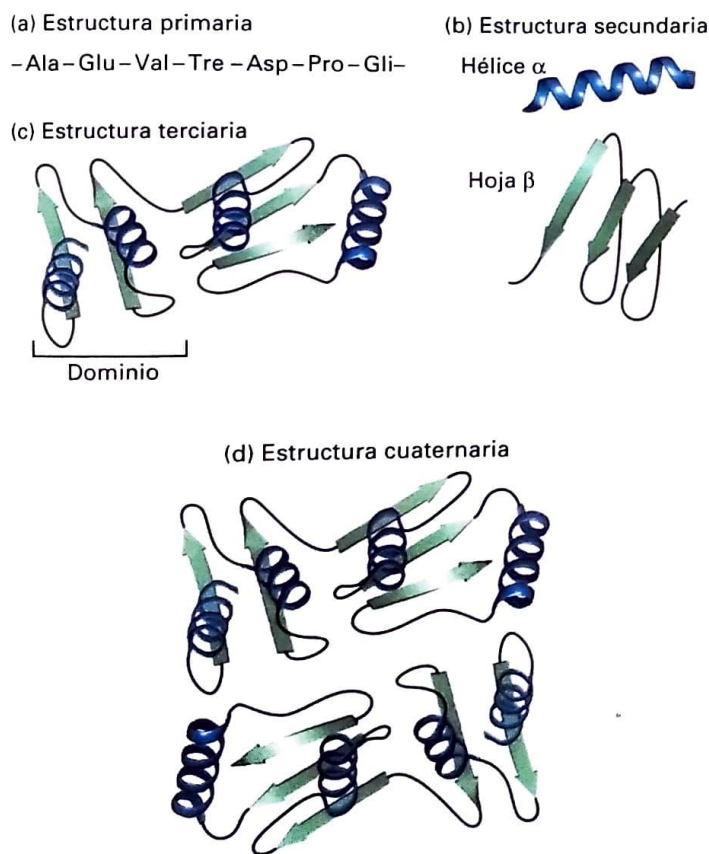


FIGURA 3-2 Cuatro niveles de jerarquía proteica. (a) La secuencia lineal de aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos es la estructura primaria. (b) El plegamiento de la cadena peptídica en hélices α u hojas β representa la estructura secundaria. (c) Los elementos estructurales secundarios, junto con varios bucles y giros en una cadena polipeptídica individual, se empaquetan en una estructura estable independiente de mayor tamaño que puede incluir distintos dominios; esta es la estructura terciaria. (d) Algunas proteínas consisten en más de un polipéptido asociado en una estructura cuaternaria.

La estructura primaria de una proteína es su disposición lineal de aminoácidos

En el Capítulo 2 analizamos que las proteínas son polímeros contruidos a partir de 20 tipos diferentes de aminoácidos. Los aminoácidos individuales están unidos en cadenas lineales no ramificadas mediante enlaces amida covalentes, llamados **enlaces peptídicos**. La formación de un enlace peptídico entre el grupo amino de un aminoácido y el grupo carboxilo de otro da como resultado la liberación neta de una molécula de agua, y así, es una forma de reacción de deshidratación (Fig. 3-3a). Los átomos repetidos N amida, carbono α (C_α) y el C del carbonilo y los átomos de oxígeno de cada residuo de aminoácido for-

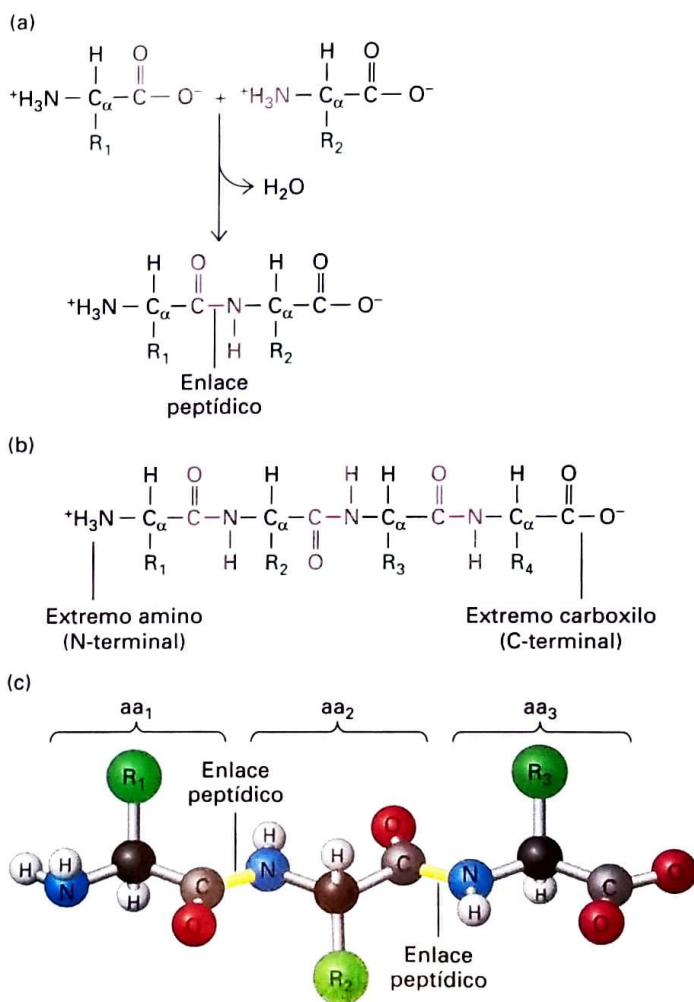


FIGURA 3-3 Estructura de un polipéptido. (a) Los aminoácidos individuales se mantienen unidos por enlaces peptídicos que se forman mediante reacciones que resultan en la pérdida de agua (deshidratación). R1, R2, etc., representan las cadenas bilaterales ("grupos R") de los aminoácidos. (b) Los polímeros lineales de aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos se llaman **polipéptidos**, que tienen un extremo amino libre (N-terminal) y un extremo carboxilo libre (C-terminal). (c) Un modelo de esferas y palillos muestra los enlaces peptídicos (amarillo) que unen los átomos de nitrógeno (azul) de un aminoácido (aa) con el átomo de carbono de un carbonilo (gris) de un carbono adyacente de la cadena. Los grupos R (verde) se extienden desde los átomos de carbono α (negro) de los aminoácidos. Estas cadenas laterales determinan en gran medida las distintas propiedades de las proteínas individuales.

man el esqueleto de una molécula proteica, a partir de la cual se proyectan los diversos grupos de las cadenas laterales (Fig. 3-3b,c). Como consecuencia del enlace peptídico, el esqueleto muestra direccionalidad, habitualmente referida como una orientación N a C, dado que todos los grupos amino se encuentran localizados en un mismo lado de los átomos C_{α} . Así, un extremo de una proteína tiene un grupo de amino libre (no ligado) (*N-terminal*) y el otro extremo tiene un grupo carboxilo libre (*C-terminal*). La secuencia de una cadena proteica, por convención, se escribe con su aminoácido N-terminal a la izquierda y el C-terminal a la derecha, y los aminoácidos se numeran secuencialmente iniciando en el extremo amino terminal.

La **estructura primaria** de una proteína simplemente es la disposición covalente lineal, o secuencia, de los residuos de aminoácidos que la componen. La primera estructura primaria de una proteína determinada fue la de la insulina, a comienzos de la década de 1950, y actualmente el número de secuencias conocidas excede los 10 000 000 y crece día a día. Se emplean muchos términos para denotar a las cadenas formadas por la polimerización de los aminoácidos, con una secuencia definida, se llama **oligopéptido** o simplemente **péptido**; las cadenas más largas se designan como **polipéptidos**. Generalmente, los péptidos contienen menos de 20-30 residuos de aminoácidos, mientras que los polipéptidos con frecuencia tienen una extensión de 200-500 residuos. La proteína más larga descrita hasta la fecha es la titina del músculo con > 35 000 residuos. Generalmente reservamos el término **proteína** para un polipéptido (o complejo de polipéptidos) que tiene estructura tridimensional bien definida.

El tamaño de una proteína o de un polipéptido se expresa como su masa en **daltons** (un dalton es 1 unidad de masa atómica) o como su peso molecular (PM), que es un número adimensional, igual a la masa expresada en daltons. Por ejemplo, una proteína de PM 10 000 tiene una masa de 10 000 daltons (Da) o 10 kilodaltons (kDa). Más adelante en este capítulo, consideraremos diferentes métodos para medir los tamaños y otras características físicas de las proteínas. Las proteínas codificadas por el genoma de la levadura tienen un peso molecular promedio de 52.728 y contienen en promedio 466 residuos de aminoácidos. El peso molecular promedio de los aminoácidos presentes en las proteínas es 113, teniendo en cuenta su abundancia relativa promedio. Este valor puede emplearse para asignar el número de residuos de una proteína a partir de su peso molecular o, por el contrario, su peso molecular a partir del número de residuos.

Las estructuras secundarias son los elementos cruciales de la arquitectura proteica

El segundo nivel en la estructura jerárquica de las proteínas es la **estructura secundaria**. Las estructuras secundarias son configuraciones espaciales estables de los segmentos de una cadena polipeptídica, que se mantienen juntos mediante puentes de hidrógeno entre los grupos amida y carbonilo del esqueleto, y con frecuencia involucran patrones estructurales repetitivos. Un único polipéptido puede contener múltiples tipos de estructuras secundarias en diversas porciones de la cadena, dependiendo de su secuencia. Las estructuras secundarias principales son la **hélice alfa** (α), la **hoja beta** (β) y el **giro beta** (β) corto, en forma de U. Las partes del polipéptido que no integran estas estructuras pero sin embargo tienen una forma estable y bien definida, se dice que tienen una estructura *irregular*. El término *enrollamiento al azar* o *aleatorio* (*random coil*) se aplica a partes muy flexibles de una

cadena polipeptídica, que no tienen estructura tridimensional fija. En una proteína promedio, el 60% de la cadena polipeptídica existe en forma de hélices α y hojas β , y el resto de la molécula está en estructuras irregulares, espirales y giros. Así, las hélices α y las hojas β son los elementos de sostén interno principales de la mayor parte de las proteínas. En esta sección exploramos las formas de las estructuras secundarias y las fuerzas que favorecen su formación. En secciones posteriores, examinamos de qué manera las configuraciones de las estructuras secundarias se pliegan juntos en otros de mayor tamaño, más complejos, llamados estructuras terciarias.

La hélice α En un segmento polipeptídico plegado en una hélice α , el esqueleto forma una estructura espiralada, en la cual el átomo de oxígeno del carbonilo de cada enlace peptídico está ligado por puentes de hidrógeno al átomo de hidrógeno de la amida del aminoácido que está a 4 residuos de distancia en la cadena polipeptídica en dirección C-terminal (Fig. 3-4). Dentro de una hélice α , todos los grupos carboxilo y amino del esqueleto están ligados mediante puentes de hidrógeno entre sí, excepto al inicio y al final de la hélice. Esta disposición perió-

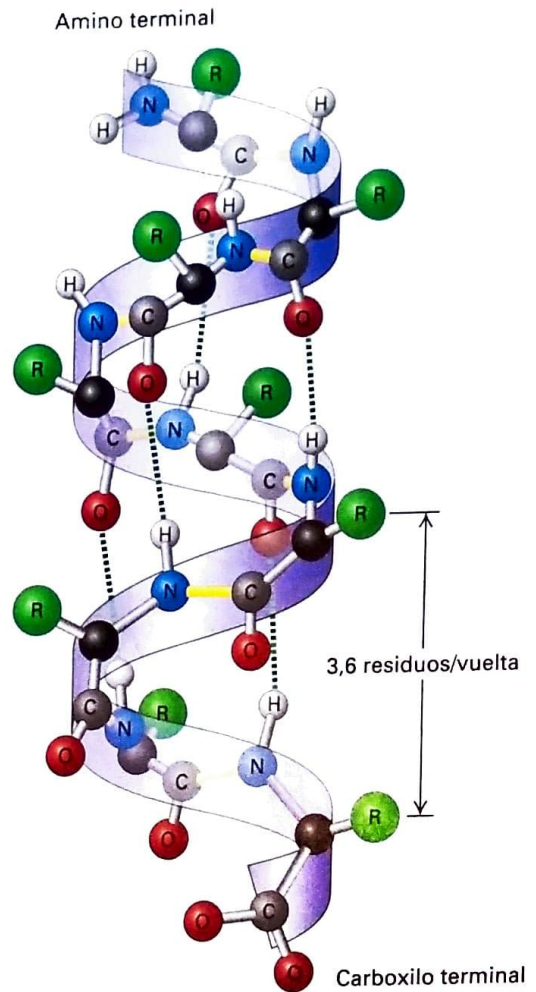


FIGURA 3-4 La hélice α , una estructura secundaria común de las proteínas. El esqueleto del polipéptido (que se muestra como una cinta) está plegado en una espiral que se mantiene en su lugar mediante puentes de hidrógeno, entre los átomos de oxígeno e hidrógeno del esqueleto. Solo se muestran los hidrógenos implicados en los puentes. La superficie externa de la hélice está cubierta por los grupos R de las cadenas laterales (verde).

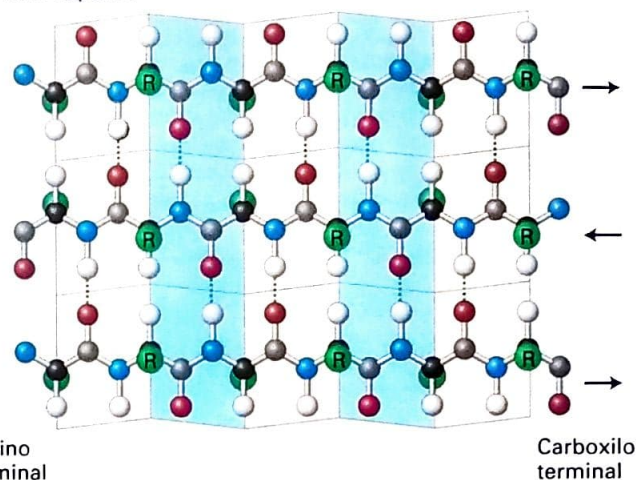
dica de los enlaces le confiere una direccionalidad amino a carboxi terminal a la hélice, porque todos los aceptores del puente del hidrógeno (es decir, los grupos carbonilo) tienen la misma orientación (señalado en la dirección hacia abajo en la Fig. 3-4), lo que da como resultado una estructura en la que cada 3,6 residuos hay un giro completo de la espiral. Una hélice α de 36 aminoácidos de longitud tiene 10 giros de la hélice y 5,4 nm (0,54 nm/giro) de longitud.

La disposición estable de los aminoácidos unidos mediante puentes de hidrógeno en la hélice α mantiene al esqueleto recto en forma de un bastón, con las cadenas laterales señalando hacia el exterior. La calidad relativamente hidrofóbica o hidrofílica de una hélice en particular, dentro de una proteína, está determinada por completo por las características de las cadenas laterales. En las proteínas hidrosolubles, las hélices hidrofílicas tienden a encontrarse en las superficies externas, donde pueden interactuar con el ambiente acuoso, mientras que las hélices hidrofóbicas tienden a estar encerradas dentro de la zona central de la proteína plegada. El aminoácido prolina habitualmente no se encuentra en las hélices α porque la unión covalente de su grupo amino con un carbono de la cadena lateral evita su participación en la estabilización del esqueleto a través puentes de hidrógeno normales. Mientras que la hélice α clásica es la forma helicoidal más común, e intrínsecamente la más estable en las proteínas, hay variaciones tales como hélices más estrechamente compactadas o más laxamente enrolladas. Por ejemplo, en una hélice especializada llamada espiral enrollada (que se describe varias secciones más adelante) la hélice está más estrechamente enrollada (3,5 residuos y 0,51 nm por vuelta).

La hoja β Otro tipo de estructura secundaria, la hoja β , consiste en hebras β unidas lateralmente. Cada hebra β es un segmento polipeptídico casi completamente extendido, corto (5 a 8 residuos). A diferencia de las hélices α , en las que se forma un puente de hidrógeno entre los grupos amino y carboxilo del esqueleto entre residuos casi adyacentes, los puentes de hidrógeno de la hoja β se establecen entre átomos del esqueleto que se encuentran en hebras β adyacentes pero separadas, y se orientan perpendicularmente a las cadenas de los átomos del esqueleto (Fig. 3-5a). Estas hebras β distintas pueden estar o bien en una misma cadena polipeptídica con bucles cortos o largos entre los segmentos de la hebra β , o en diferentes cadenas polipeptídicas en una proteína que está compuesta por múltiples polipéptidos. La Figura 3-5b muestra el modo en que dos o más hebras β se alinean en hileras adyacentes, formando una hoja plegada β casi bidimensional (o simplemente *hoja plegada*), en la cual los puentes de hidrógeno dentro del plano de la hoja mantienen juntas a las hebras β , mientras que las cadenas laterales emergen por encima y por debajo del plano. Al igual que las hélices α , las hebras β tienen una direccionalidad que está definida por la orientación del enlace peptídico. Por lo tanto, en una hoja plegada, las hebras β adyacentes pueden estar orientadas en la misma dirección (paralelas) u opuestas alternantes (antiparalelas) entre sí. En la Figura 3-5a se puede ver que las orientaciones N a C de las cadenas, indicadas por flechas, alternan las direcciones entre las cadenas adyacentes, lo cual significa una hoja antiparalela. En algunas proteínas, las hojas β forman el suelo de un bolsillo de unión o de un núcleo hidrofóbico; en las proteínas embebidas en la membrana las hojas β se curvan y forman un poro hidrofílico central, a través del cual pueden fluir los iones y moléculas pequeñas (véase el Cap. 11).

Giros β Compuestos por 4 residuos, los giros β se localizan en la superficie de una proteína formando curvaturas pronunciadas que invierten

(a) Vista superior



(b) Vista lateral

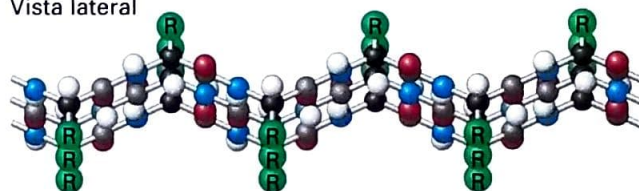


FIGURA 3-5 La hoja β , otra estructura secundaria común en las proteínas. (a) Vista desde arriba de una hoja β de tres hebras simple con hebras β antiparalelas, según se indica con las flechas que representan las orientaciones N a C de las cadenas. Las líneas punteadas color verde indican los puentes de hidrógeno estabilizadores presentes entre las hebras β . (b) Vista lateral de una hoja β . En esta vista resulta obvia la proyección de los grupos R (verde) por encima y por debajo del plano de la hoja. Los ángulos fijos de enlace en el esqueleto del polipéptido producen un contorno plegado.

la dirección del esqueleto polipeptídico, con frecuencia hacia el interior de las proteínas. Estas estructuras secundarias cortas con forma de U, con frecuencia se estabilizan mediante puentes de hidrógeno entre sus residuos terminales (Fig. 3-6). La glicina y la prolina son frecuentes en estos giros. La falta de una cadena lateral grande en la glicina y la

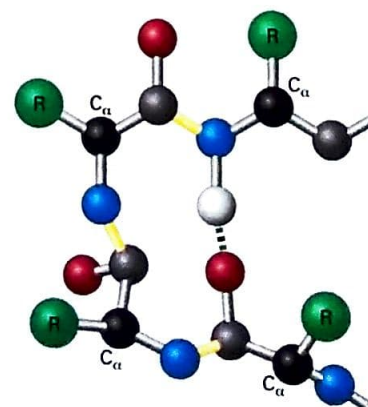
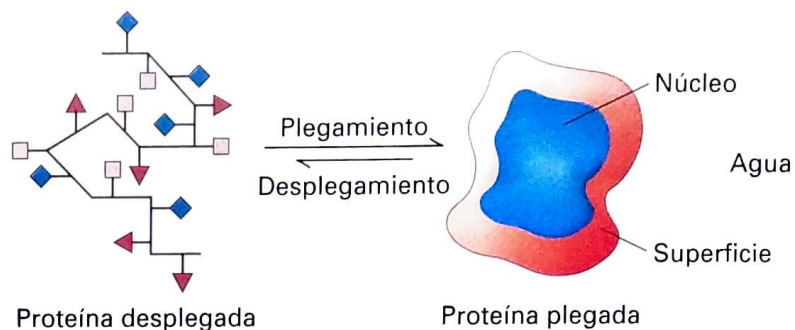


FIGURA 3-6 Estructura de un giro β . Compuesto por cuatro residuos, los giros β invierten la dirección de una cadena polipeptídica (giro U 180°). Los carbonos C_{α} del primer y cuarto residuo, habitualmente están a una distancia < 0,7 nm y aquellos residuos con frecuencia se encuentran unidos mediante un puente de hidrógeno. El giro β facilita el plegamiento de polipéptidos largos en estructuras compactas.

FIGURA 3-7 Modelo de la gota de aceite del plegamiento proteico. Los residuos hidrofóbicos (azul) de una cadena polipeptídica tienden a agruparse de un modo similar al de una gota de aceite, en la parte interna o núcleo de una proteína plegada, excluyéndose del entorno acuoso por el efecto hidrofóbico (véase Cap. 2). Las cadenas laterales cargadas y no cargadas polares (rojo) aparecen sobre la superficie de la proteína donde pueden formar interacciones estabilizadoras con el agua y los iones que la rodean.



presencia de una curvatura interna en la prolina permiten que el esqueleto polipeptídico se despliegue con una forma de U estrecha. Los giros β ayudan a las proteínas grandes a plegarse en estructuras altamente compactas. Hay 6 tipos de giros bien definidos; sus estructuras detalladas dependen de la disposición de las interacciones mediante puentes de hidrógeno. Un esqueleto polipeptídico también puede contener curvaturas más largas o bucles. Por oposición a lo que ocurre con los giros β estrechos, que tienen solo unas pocas conformaciones bien definidas, los bucles más largos tienen muchas conformaciones distintas.

La estructura terciaria es el plegamiento global de una cadena polipeptídica

La **estructura terciaria** se refiere a la conformación global de una cadena polipeptídica, es decir, a la disposición tridimensional de todos sus residuos de aminoácidos. Al contrario de lo que ocurre con las estructuras secundarias, que se estabilizan solo mediante puentes de hidrógeno, la estructura terciaria se estabiliza principalmente mediante interacciones hidrofóbicas entre las cadenas laterales no polares, junto con los puentes de hidrógeno que involucran a las cadenas laterales polares y a los grupos amino y carboxilo del esqueleto. Estas fuerzas estabilizadoras mantienen juntos, en forma compacta, a los elementos de la estructura secundaria –hélices α , hebras β , giros y espirales–. Dado que las interacciones estabilizadoras con frecuencia son débiles, sin embargo, la estructura terciaria de una proteína no está fija en forma rígida sino que sufre fluctuaciones continuas mínimas, y ciertos segmentos dentro de la estructura terciaria de una proteína pueden también tener tanta movilidad que se los considera desordenados, es decir, que carecen de una estructura tridimensional estable bien definida. Esta variación estructural tiene consecuencias importantes para la función y regulación de las proteínas.

Las propiedades químicas de las cadenas laterales de los aminoácidos ayudan a definir la estructura terciaria. Los **puentes disulfuro** entre las cadenas laterales de los residuos de cisteína de algunas proteínas enlazan de forma covalente regiones de las proteínas, lo que restringe de este modo su flexibilidad e incrementa la estabilidad de sus estructuras terciarias. Los aminoácidos con cadenas laterales hidrofílicas cargadas tienden a encontrarse en la superficie externa de las proteínas; al interactuar con el agua, ayudan a que estas proteínas sean solubles en soluciones acuosas y puedan formar interacciones no covalentes con otras moléculas hidrosolubles, incluidas otras proteínas. Por el contrario, los aminoácidos con cadenas laterales no polares hidrofóbicas habitualmente se encuentran fuera de las superficies de una proteína que en-

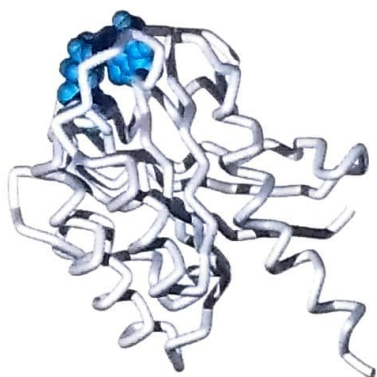
tran en contacto con el agua; en muchos casos forman un núcleo central no soluble en agua. Esta observación llevó a lo que se conoce como el “modelo de la gota de aceite” de la conformación de las proteínas, a raíz de su núcleo relativamente hidrofóbico o “aceitoso” (Fig. 3-7). Las cadenas laterales, polares, hidrofílicas, no cargadas se encuentran tanto en la superficie como en el núcleo interno de las proteínas.

Las proteínas habitualmente constituyen una de tres grandes amplias categorías estructurales, de acuerdo con su estructura terciaria: proteínas globulares, fibrosas e integrales de la membrana. Las **proteínas globulares** generalmente son estructuras hidrosolubles, plegadas de manera compacta, que con frecuencia, aunque no siempre, son esféricas y comprenden una mezcla de estructuras secundarias (véase la estructura de la mioglobina más abajo). Las **proteínas fibrosas** son moléculas grandes, alargadas, con frecuencia rígidas. Algunas proteínas fibrosas están compuestas por una larga cadena polipeptídica que comprende muchas copias repetidas de una secuencia aminoacídica corta, que forma una única estructura secundaria que se repite (véase la estructura del colágeno, la proteína más abundante de los mamíferos, en la Fig. 20-24). Otras proteínas fibrosas están compuestas por subunidades proteicas globulares repetidas, como la disposición helicoidal de los monómeros de la proteína G-actina que forma los microfilamentos de F-actina (véase Cap. 17). Las proteínas fibrosas, que con frecuencia se agregan en fibras multiproteicas grandes, que no se disuelven fácilmente en agua, generalmente desempeñan una función estructural o participan en los movimientos celulares. Las **proteínas integrales de la membrana** están incrustadas dentro de la bicapa fosfolipídica de las membranas que rodean a las células y a los orgánulos (véase el Cap. 10). Las tres amplias categorías de proteínas que se mencionaron aquí no son mutuamente excluyentes –algunas proteínas están constituidas por una combinación de dos e incluso las tres categorías–.

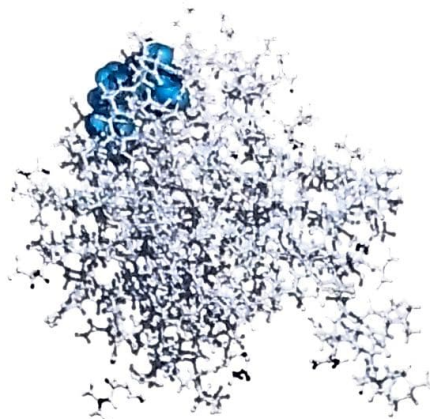
Diferentes formas de representar la conformación de las proteínas confieren diferentes tipos de información

La forma más simple de representar la estructura tridimensional de una proteína es seguir el recorrido de los átomos del esqueleto, en ocasiones solo los átomos C_{α} , con una línea sólida (llamada trazo C_{α} , Fig. 3-8a); el modelo más complejo muestra cada átomo (Fig. 3-8b). El primero muestra el plegamiento general de la cadena polipeptídica, sin considerar las cadenas laterales de los aminoácidos; el último, un modelo de esferas y palillos (en el que las esferas representan a los átomos y los palillos a los enlaces), detalla las interacciones de los átomos de las cadenas laterales que inclu-

(a) Representación del esqueleto de C_{α}



(b) Esferas y palillos



(c) Cintas



(d) Superficie accesible al solvente

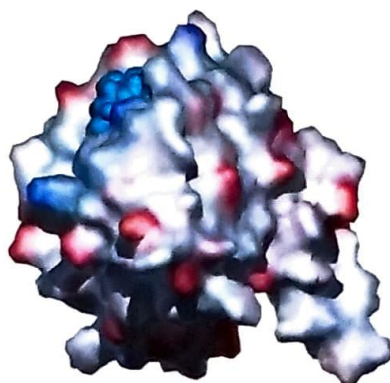


FIGURA 3-8 Cuatro maneras de ver la estructura de una proteína. Aquí se muestran cuatro métodos distintos para representar la estructura de una proteína llamada ras, una proteína monomérica (cadena polipeptídica única) que se une a la guanosina difosfato (GDP, representada en azul). (a) El dibujo del esqueleto de C_{α} muestra de qué manera el polipéptido está estrechamente empaquetado en un pequeño volumen. (b) Una representación de esferas y palillos muestra la localización de todos los átomos. (c) Una representación de cintas pone énfasis en el modo en que las hebras β (azul claro) y las hélices α (rojo) se organizan en la proteína. Nótese los giros y los bucles que conectan los pares de hélices y hebras. (d) Un modelo de la superficie accesible al agua muestra los numerosos bultos, protuberancias y grietas en la superficie de la proteína. Las regiones de carga positiva están coloreadas en púrpura y las regiones de carga negativa en rojo.

ven a aquellos que estabilizan la conformación de la proteína e interactúan con otras moléculas, así como con los átomos del esqueleto. Si bien ambas representaciones son útiles, los elementos de las estructuras secundarias no siempre se disciernen fácilmente en ellos. Otro tipo de representación emplea símbolos taquigráficos comunes para indicar la estructura secundaria —por ejemplo, cintas enrolladas o cilindros sólidos para las hélices α , cintas planas o flechas para las hebras β y hebras delgadas y flexibles para los giros espirales y bucles β (Fig. 3-8c)—. En una variación del diagrama de cintas básico, los modelos de esferas y bastones o los modelos espaciales de la totalidad o un subconjunto de cadenas laterales pueden estar unidos a las cintas del esqueleto. De este modo, las cadenas laterales que resultan de interés, pueden verse en el contexto de las estructuras secundarias, que se representan con especial claridad mediante las cintas.

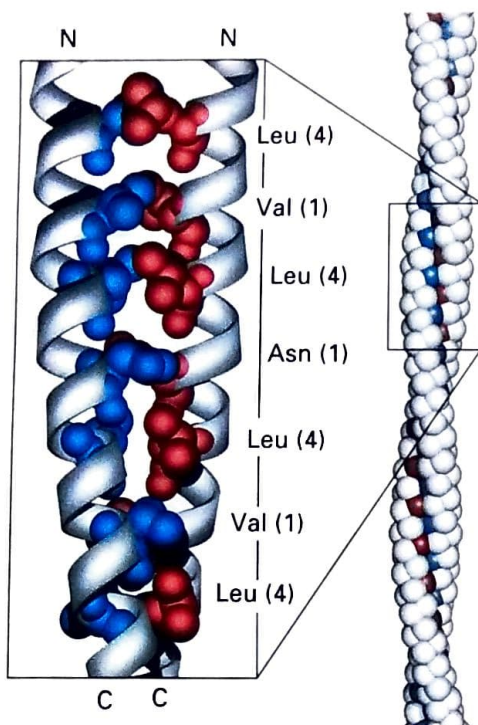
Sin embargo, ninguna de estas tres formas de representar la estructura proteica confiere mucha información acerca de la superficie de la proteína, que resulta de interés porque es allí donde otras moléculas habitualmente se unen a ella. El análisis con ordenador permite identificar los átomos superficiales que se encuentran en contacto con el medio acuoso. Sobre esta superficie accesible al agua pueden identificarse, mediante colores (Fig. 3-8d), las regiones que tienen una característica química en común, por ejemplo, la hidrofobicidad o la hidrofiliidad y características de carga, como las cadenas laterales positivas (básicas) o negativas (ácidas). Modelos de este tipo revelan la topografía de la superficie proteica y la distribución de la carga, ambas características importantes de los sitios de unión, así como las hendiduras en la superficie a las que se unen moléculas pequeñas. Esta imagen representa la proteína como si fuese “vista” por otra molécula.

Los motivos estructurales son combinaciones regulares de estructuras secundarias

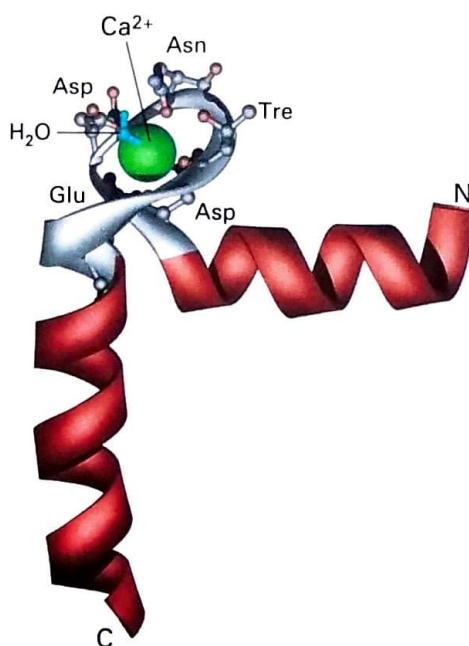
La combinación particular de dos o más estructuras secundarias que forma una estructura tridimensional característica, se denomina **motivo estructural** cuando aparece en múltiples proteínas. Con frecuencia, aunque no siempre, un motivo estructural se encuentra asociado con una función específica. Cualquier motivo estructural particular con frecuencia desempeñará una misma función en distintas proteínas, tal como la unión a una pequeña molécula en particular, por ejemplo, calcio o ATP.

Un motivo estructural común es la **espiral enrollada**, construida sobre la base de la hélice α , o repetición en heptada. Muchas proteínas, incluidas las proteínas fibrosas y las que regulan al DNA, llamadas factores de transcripción (véase el Cap. 7), se ensamblan en dímeros o trímeros, empleando un motivo de espiral enrollada, en la cual las hélices α provenientes de dos, tres e incluso cuatro cadenas polipeptídicas separadas se enrollan una sobre otra dando como resultado una espiral de espirales; de allí el nombre (Fig. 3-9a). Las hélices individuales se unen estrechamente entre sí porque cada hélice tiene una banda de cadenas laterales alifáticas (hidrofóbicas pero no aromáticas) (leucina, valina, etc.) que discurren a un costado de la hélice, que interactúa con una banda semejante en la hélice adyacente, secuestrando de este modo los grupos hidrofóbicos del contacto con el agua y estabilizando el ensamblaje de múltiples hélices independientes. Estas cintas hidrofóbicas se generan a lo largo de solo un lado de la hélice, porque la estructura primaria de cada hélice está compuesta por unidades repetitivas de 7 aminoácidos, llamadas heptadas, en las cuales las cadenas laterales del

(a) Motivo de espiral enrollada



(b) Motivo mano EF/hélice-bucle-hélice



(c) Motivo dedo de zinc

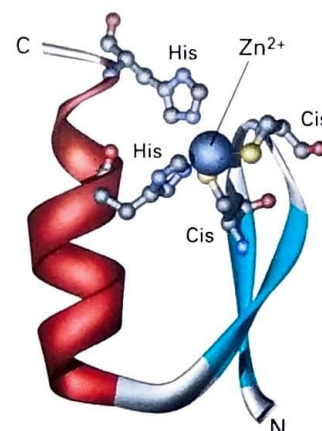


FIGURA 3-9 Motivos de la estructura secundaria de una proteína. (a) El motivo espiral enrollada de dos cadenas paralelas (izquierda) se caracteriza por dos hélices α enrolladas una alrededor de la otra. El empaquetamiento de las hélices se estabiliza mediante interacciones entre las cadenas laterales hidrofóbicas (rojas y azules) presentes a intervalos regulares a lo largo de cada cadena y se encuentran a lo largo de la unión de las hélices entrelazadas. Cada hélice α muestra una secuencia repetida en héptada característica, con un residuo hidrofóbico con frecuencia, pero no siempre, en las posiciones 1 y 4, según se indica. La naturaleza de espiral enrollada de este motivo estructural es más aparente en las hélices enrolladas largas que contienen muchos de estos motivos (derecha). (b) Una mano EF, un tipo de motivo hélice-bucle-hélice, que consiste en dos hélices conectadas por un bucle corto en una conformación

específica. Este motivo estructural es común a muchas proteínas, incluidas muchas proteínas reguladoras que unen calcio y DNA. En las proteínas que unen calcio, como la calmodulina, los átomos de oxígeno de cinco residuos en el bucle ácido rico en glutamato y aspartato y una molécula de agua forman enlaces iónicos con el ion Ca^{2+} . (c) El motivo dedo de cinc está presente en muchas proteínas que unen DNA y ayudan a regular la transcripción. El ion Zn^{2+} está sostenido entre un par de hebras beta (azul) y una hélice α individual (rojo) por un par de residuos de cisteína y un par de residuos de histidina. Los dos residuos invariables de cisteína con frecuencia están en las posiciones 3 y 6 y los dos residuos de histidina invariables en las posiciones 20 y 24 en este motivo de 25 residuos. (Véase A. Lewit-Bentley y S. Rety, 2000, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**:637-643; S. A. Wolfe, L. Nekudova y C. O. Pabo, 2000, *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **29**:183-212.)

primero y cuarto residuo son alifáticas, y las otras cadenas laterales con frecuencia son hidrofílicas (Fig. 3-9a). Dado que las cadenas laterales hidrofílicas se extienden a lo largo de un lado de las hélices y las cadenas laterales hidrofóbicas a lo largo del lado opuesto, la estructura helicoidal global es **anfipática**. Puesto que la leucina frecuentemente aparece en las posiciones 4 y las cadenas laterales hidrofóbicas emergen juntas como los dientes de una cremallera, estos motivos estructurales también se llaman **cremalleras de leucina**.

Muchos otros motivos estructurales contienen hélices α . Un motivo común que une calcio, llamado la **mano EF**, contiene dos hélices cortas conectadas por un bucle (Fig. 3-9b). Este motivo estructural, uno de varios motivos estructurales **hélice-giro-hélice**, se encuentra en más de 100 proteínas y se emplea para detectar los niveles de calcio de las células. La unión del ion Ca^{2+} a los átomos de oxígeno en los residuos conservados del bucle depende de la concentración de Ca^{2+} y con frecuencia induce un cambio conformacional en la proteína, que altera su actividad. Así, las concentraciones de calcio pueden controlar en forma directa las estructuras y funciones de las proteínas. Algunos motivos ligeramente diferentes del tipo hélice-giro-hélice y **hélice-**

bucle-hélice básico (HBHb), se emplean para la unión de la proteína al DNA y, en consecuencia, la regulación de la actividad de los genes (véase el Cap. 7). Otro motivo estructural adicional que se encuentra en las proteínas que se unen al RNA o DNA es el **dedo de cinc**, que contiene tres estructuras secundarias –una hélice α y dos hebras β con orientación antiparalela– que forman un haz con forma de dedo que se mantiene unido por un ion cinc (Fig. 3-9c).

La relación entre la estructura primaria de una cadena polipeptídica y los motivos estructurales en los cuales se pliega no siempre es lineal. Las secuencias de aminoácidos responsables de cualquier motivo estructural pueden ser muy semejantes entre sí. En otras palabras, un **motivo de secuencia** puede dar como resultado un motivo estructural común. Tal es el caso para las repeticiones de héptada, que forman las espirales enrolladas. Sin embargo, es posible para las secuencias de aminoácidos no relacionadas y semejantes plegarse en un motivo estructural en común, de modo que no siempre es posible predecir qué secuencias de aminoácidos se plegarán en cierto motivo estructural. Por el contrario, es posible que un motivo de secuencia que ocurra frecuentemente no se pliegue en un motivo estructural bien definido. En ocasiones, los

motivos de secuencias cortas que tienen una abundancia inusual de un aminoácido dado, por ejemplo, prolina, aspartato o glutamato, se denominan "dominios"; sin embargo, estos y otros segmentos contiguos cortos se llaman más apropiadamente motivos de secuencia que dominios, lo cual tiene un significado distinto y se define más abajo.

Encontraremos numerosos motivos adicionales en análisis de otras proteínas en este capítulo y en otros. La presencia del mismo motivo estructural en diferentes proteínas con funciones similares indica con claridad que estas combinaciones útiles de estructuras secundarias se han conservado durante la evolución.

Los dominios son módulos de estructura terciaria

Distintas regiones de la estructura de la proteína con frecuencia se conocen como **dominios**. Hay 3 clases principales de dominios proteicos: funcional, estructural y topológico. Un *dominio funcional* es una región de una proteína que muestra una actividad particular, característica de la proteína, habitualmente aun cuando se lo aisle del resto de la molécula. Una región particular de una proteína puede ser responsable de su actividad catalítica (p. ej., un dominio cinasa que adiciona en forma covalente un grupo fosfato a otra molécula) o una capacidad de unión (p. ej., un dominio que une DNA o un dominio que se une a la membrana). Los dominios funcionales, con frecuencia se identifican en forma experimental al reducir una proteína a su fragmento activo más pequeño, con ayuda de las proteínas **proteasas**, enzimas que escinden uno o más enlaces peptídicos en un polipéptido diana. De forma alternativa, el DNA que codifica para una proteína puede modificarse

de modo tal que cuando el DNA modificado se emplea para generar la proteína, solo se sintetiza una región particular o dominio de la proteína completa. Así, es posible determinar si partes específicas de una proteína son responsables de las actividades particulares mostradas por ella. De hecho, los dominios funcionales con frecuencia también se asocian con los dominios estructurales correspondientes.

Un *dominio estructural* es una región de ~ 40 aminoácidos o más de longitud, dispuesta en una estructura única estable y distintiva que con frecuencia abarca una o más estructuras secundarias. Los dominios estructurales con frecuencia pueden plegarse en sus estructuras características, independientemente del resto de la proteína en la cual están sumergidos. Como consecuencia, dominios estructurales distintos pueden mantenerse unidos (en ocasiones por espaciadores cortos o largos) para formar una proteína grande multidominio. Por ejemplo, cada una de las cadenas polipeptídicas en la hemaglutinina del virus de la influenza contiene un dominio globular y un dominio fibroso (Fig. 3-10a). Al igual que los motivos estructurales (compuestos por estructuras secundarias), los dominios estructurales se incorporan como módulos a diferentes proteínas. El enfoque modular de la arquitectura proteica es particularmente sencillo de reconocer en proteínas grandes, que tienden a ser mosaicos de diferentes dominios, que contienen actividades distintivas y así pueden desempeñar diferentes funciones en forma simultánea. Hasta el 75% de las proteínas de los eucariontes tienen dominios estructurales múltiples. Los dominios estructurales con frecuencia también lo son funcionales, porque tienen una actividad independiente del resto de la proteína.

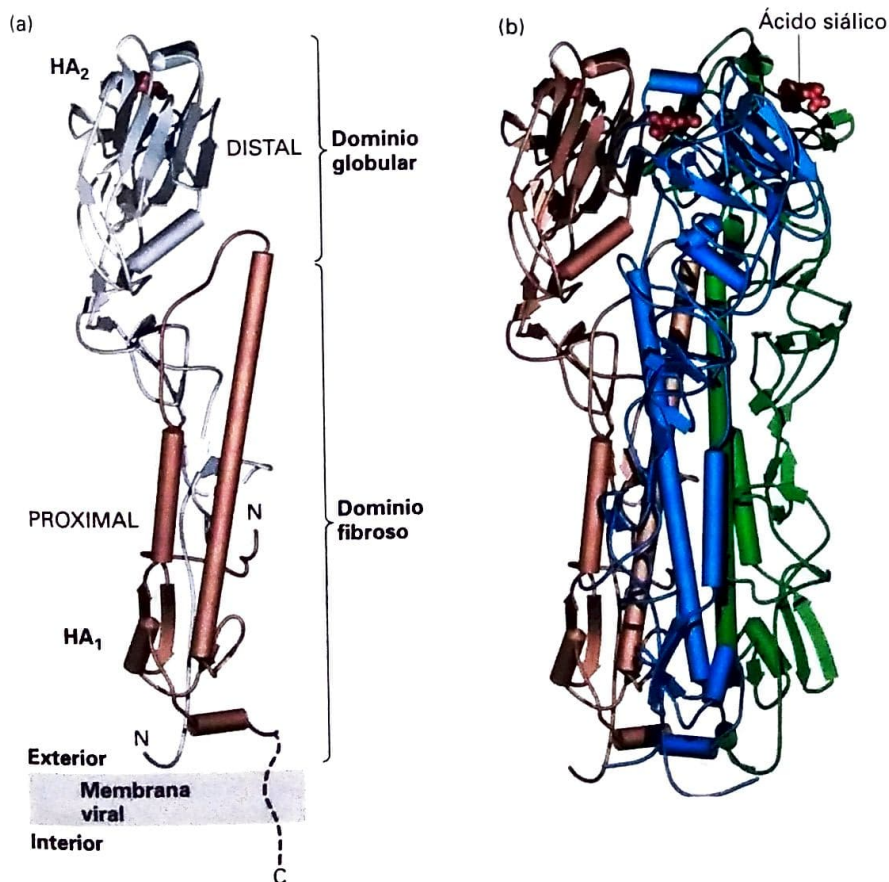


FIGURA 3-10 Niveles terciario y cuaternario de estructura. La proteína que se dibuja aquí, la hemaglutinina (HA) se encuentra en la superficie del virus de la influenza. Esta molécula, larga, multimérica, tiene tres subunidades idénticas, cada una de las cuales está compuesta por dos cadenas polipeptídicas HA₁ y HA₂. (a) La estructura terciaria de cada subunidad HA comprende el plegamiento de sus hélices y de sus hebras en una estructura compacta que tiene 13,5 nm de longitud y está dividida en dos dominios. El dominio distal a la membrana (plateado) está plegado en una conformación globular. El dominio proximal a la membrana (dorado) tiene una conformación fibrosa, en forma de tallo debido al alineamiento de dos hélices α largas (cilindros) de HA₁ con hebras β en HA₂. Los giros cortos y los bucles más largos, con frecuencia en la superficie de la molécula, conectan las hélices y las hebras de cada cadena. (b) La estructura cuaternaria de la HA es estabilizada por las interacciones laterales entre las hélices largas (cilindros) de los dominios fibrosos de las tres subunidades (dorado, azul y verde) que forman un tallo en espiral enrollada de triple hebra. Cada uno de los dominios globulares distales de la HA une ácido siálico (rojo) de la superficie de las células diana. Al igual que muchas proteínas de la membrana, la HA contiene varias cadenas de hidratos de carbono unidas en forma covalente (que no se muestran).

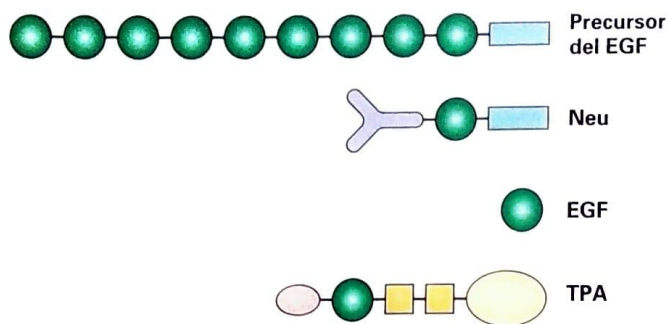


FIGURA 3-11 Naturaleza modular de los dominios proteicos. El factor de crecimiento epidérmico (EGF) es generado por la escisión proteolítica de una proteína precursora que contiene múltiples dominios de EGF (verde) y un dominio que se extiende en la membrana (azul). El dominio EGF también está presente en la proteína Neu y en el activador de plasminógeno tisular (TPA). Estas proteínas también contienen otros dominios de alta distribución, indicados por forma y color. (Adaptado de I. D. Campbell y P. Bork, 1993, *Curr. Opin. Struc. Biol.* 3:385.)

El dominio del factor de crecimiento epidérmico (EGF) es un dominio estructural presente en varias proteínas (Fig. 3-11). El EGF es una hormona peptídica pequeña soluble, que se une a las células del embrión y de la piel y del tejido conectivo de los adultos, provocando su división. Está generado por la hidrólisis proteolítica (rotura de un enlace peptídico) entre dominios de EGF repetidos en la proteína precursora del EGF, anclada en la membrana celular por un dominio que se expande dentro de ella. Los dominios de EGF con secuencias similares a las presentes en la hormona peptídica, si bien no idénticas a ellos, se presentan en otras proteínas y pueden ser liberados por proteólisis. Estas proteínas incluyen el activador del plasminógeno tisular (TPA), una proteasa empleada para disolver los coágulos sanguíneos en las víctimas de ataques cardíacos; la proteína Neu que participa en la diferenciación embrionaria, y la proteína Notch, una proteína receptora de la membrana plasmática que funciona en señalizaciones importantes en el desarrollo (véase Cap. 16). Además del dominio EGF, estas proteínas tienen otros en común con otras proteínas. Por ejemplo, el TPA posee un dominio tripsina que es funcional en ciertas proteasas. Se estima que hay aproximadamente 1 000 tipos diferentes de dominios estructurales en todas las proteínas. Algunos de estos no son muy comunes, mientras que otros se encuentran en muchas proteínas distintas. De hecho, según ciertas estimaciones, 9 tipos de dominios estructurales dan cuenta de hasta la tercera parte de todos los dominios estructurales presentes en las proteínas. Los dominios estructurales pueden reconocerse, en las proteínas cuyas estructuras se han determinado, mediante la cristalografía de rayos X o resonancia magnética nuclear (RMN) o imágenes capturadas por microscopía electrónica.

Las regiones de las proteínas definidas por sus relaciones espaciales distintivas con respecto al resto de las proteínas son *dominios topológicos*. Por ejemplo, algunas proteínas asociadas con las membranas de la superficie celular pueden tener una parte que se extiende hacia adentro al citoplasma (dominio citoplasmático), una parte embebida en la bicapa fosfolipídica de la membrana (dominio que se expande en la membrana) y una parte que se extiende hacia el exterior, al espacio extracelular (dominio extracelular). Cada uno de estos puede comprender uno o más dominios estructurales y funcionales.

En el Capítulo 6 consideramos el mecanismo por el cual los segmentos génicos que corresponden al dominio se distribuyeron en el

transcurso de la evolución dando como resultado su presencia en muchas proteínas. Una vez que un dominio funcional, estructural o topológico se ha identificado y caracterizado en una proteína, es posible emplear esa información para buscar otros dominios similares en otras proteínas y para sugerir funciones potencialmente similares para aquellos dominios en dichas proteínas.

Múltiples polipéptidos se ensamblan en estructuras cuaternarias y complejos supramoleculares

Las proteínas **multiméricas** consisten en dos o más cadenas polipeptídicas, las que en este contexto se nombrarán como subunidades. Un cuarto nivel de organización estructural, la **estructura cuaternaria**, describe el número (estequiometría) y las posiciones relativas de la subunidades en las proteínas multiméricas. La hemaglutinina del virus de la influenza, por ejemplo, es un trímero de 3 subunidades idénticas (homotrímero) que se mantienen unidas por enlaces no covalentes (véase la Fig. 3-10b). Otras proteínas multiméricas pueden estar compuestas por números diversos de subunidades idénticas (homoméricas) o distintas (heteroméricas). La hemoglobina, la molécula portadora de oxígeno de la sangre, es un ejemplo de proteína heteromérica; tiene dos copias de cada una de las dos cadenas polipeptídicas diferentes (que se analizan más adelante). Sin embargo, las unidades monoméricas individuales de una proteína multimérica no pueden funcionar normalmente a menos que se encuentren ensambladas en la proteína multimérica. En algunos casos, el ensamblaje en una proteína multimérica permite que estas moléculas actúen en forma secuencial en una vía, para aumentar su eficacia operativa debido a la yuxtaposición espacial, fenómeno conocido como “acoplamiento metabólico”. Son ejemplos clásicos de este acoplamiento las sintasas de los ácidos grasos, las enzimas de los hongos que sintetizan ácidos grasos y las policétido sintasas, que son los grandes complejos multiproteicos presentes en las bacterias responsables de la síntesis de un conjunto variado de moléculas de importancia farmacológica, llamadas policétidos, que incluyen al antibiótico eritromicina.

El nivel más alto en la jerarquía de la estructura proteica es la asociación de las proteínas en complejos supramoleculares. Típicamente, estas estructuras son muy grandes, en algunos casos exceden en su masa a 1 MDa, aproximándose a un tamaño de entre 30 y 300 nm, y con decenas a cientos de cadenas polipeptídicas y, en ocasiones, otros biopolímeros como ácidos nucleicos. La cápside que rodea a los ácidos nucleicos del genoma viral es un ejemplo de un complejo supramolecular con función estructural. Los haces de filamentos del citoesqueleto, que sostienen y dan forma a la membrana plasmática, son otro ejemplo de ellos. Otros complejos supramoleculares actúan como máquinas moleculares, desempeñando los procesos celulares más complejos, al integrar múltiples proteínas, cada una con diferentes funciones, en un ensamble grande. Por ejemplo, una máquina transcripcional es la responsable de la síntesis del RNA mensajero (mRNA) que emplea un DNA como molde. Esta máquina de transcripción, cuyos detalles operativos se analizarán en el Capítulo 4, consiste en una RNA polimerasa, en sí una proteína multimérica, y alrededor de 50 componentes adicionales que incluyen a los factores generales de transcripción, a las proteínas que se unen al promotor, a la helicasa y a otros complejos proteicos (Fig. 3-12). Los ribosomas, que también se analizan en el Capítulo 4, son maquinarias multiproteicas y multinucleicas complejas que sintetizan proteínas. Uno de los ensamblados multiproteicos más complejos es el poro nuclear, estructura que permite la comunicación y

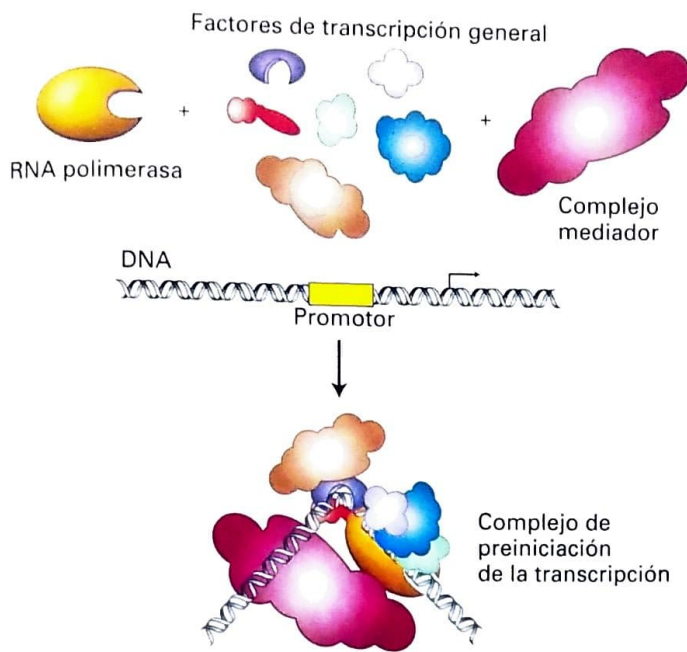


FIGURA 3-12 Una máquina macromolecular: el complejo de la iniciación de la transcripción. La RNA polimerasa de la zona del centro, los factores de transcripción general, un complejo mediador que contiene aproximadamente 20 subunidades y otros complejos proteicos que no se muestran aquí, se ensamblan a un promotor presente en el DNA. La polimerasa lleva a cabo la transcripción del DNA; se requieren las proteínas asociadas para la unión inicial de la polimerasa a un promotor específico. Los múltiples componentes funcionan en conjunto como una máquina.

el paso de macromoléculas entre el nucleoplasma y el citoplasma (véase el Cap. 14). Está compuesto por múltiples copias de aproximadamente 30 proteínas distintas y forma un ensamble con una masa estimada de 50 megadaltons aproximadamente. Las sintasas de ácidos grasos y las policétido sintasas mencionadas más arriba, son máquinas supramoleculares.

Los miembros de una familia de proteínas tienen un ancestro común en la evolución

Los estudios realizados en la mioglobina y en la hemoglobina, transportadoras de oxígeno en los músculos y los eritrocitos, respectivamente, proporcionaron evidencia inicial de que la función de las proteínas deriva de su estructura tridimensional, la que a su vez está especificada por la secuencia de aminoácidos. Los análisis por cristalografía de rayos X mostraron que las estructuras tridimensionales de la mioglobina (un monómero) y de las subunidades α y β de la hemoglobina (tetramero $\alpha_2\beta_2$) son notablemente similares. La secuenciación de las subunidades de la mioglobina y de la hemoglobina reveló que a lo largo de toda la estructura primaria de ambas proteínas se encuentran muchos residuos idénticos, o químicamente similares, en posiciones equivalentes. Una mutación en el gen que codifica la cadena β y da como resultado la sustitución de un ácido glutámico por valina, altera el plegamiento y la función de la hemoglobina y provoca la anemia de células falciformes.

Comparaciones semejantes hechas entre otras proteínas confirmaron de modo concluyente la relación entre la secuencia de aminoácidos,

la estructura tridimensional y la función de las proteínas. El empleo de las comparaciones de la secuencia para deducir la función de las proteínas se ha expandido notablemente en años recientes a medida que se han secuenciado los genomas de un número cada vez mayor de organismos. Mientras que este enfoque comparativo resulta muy poderoso, debe tenerse cautela cuando se atribuya a una proteína, o parte de ella, una función o estructura similar a otra, solo teniendo en cuenta las similitudes en la secuencia de aminoácidos. Hay ejemplos en los cuales las proteínas con secuencias globales semejantes muestran funciones distintas, y casos en los cuales proteínas no relacionadas en su función, con secuencias de aminoácidos disímiles, sin embargo, tienen estructuras terciarias con plegamientos muy semejantes como se explicará más adelante. Aun así, en muchos casos las comparaciones de este tipo proporcionan conocimientos importantes acerca de la estructura y la función de las proteínas.

La revolución molecular en biología de las últimas décadas del siglo XX creó un nuevo esquema de clasificación biológica sobre la base de las similitudes y diferencias en la secuencia de las proteínas. Las que tienen un ancestro en común se conocen como **homólogas**. La principal evidencia de la **homología** de las proteínas, y así de un ancestro en común, es la similitud de sus secuencias que, con frecuencia, también se ve reflejada en estructuras similares. Podemos afirmar que las proteínas homólogas pertenecen a una “familia” y trazar su linaje a partir de las comparaciones de sus secuencias. En general, las proteínas más relacionadas mostrarán más similitud de secuencia que las que están menos vinculadas, porque durante la evolución, se acumulan las mutaciones en los genes que codifican estas proteínas. Las estructuras tridimensionales plegadas de las proteínas homólogas pueden ser semejantes, aunque parte de su estructura primaria muestre escasa evidencia de homología en la secuencia. Inicialmente, las proteínas con similitudes de secuencia relativamente altas (> 50% de coincidencias exactas o “identidades”) y funciones y estructuras relacionadas, fueron definidas como una *familia* relacionada evolutivamente, mientras que una *superfamilia* comprende dos o más familias en las cuales las secuencias interfamiliares tienen menor grado de concordancia (~30-40% de identidad de secuencia) que dentro de una familia. Se piensa generalmente que las proteínas con una identidad de secuencia del 30% es probable que tengan estructuras tridimensionales similares; sin embargo, esta alta identidad de frecuencia no es necesaria para que las proteínas compartan estructuras similares. Recientemente se han propuesto definiciones revisadas de *familia* y *superfamilia*, según las cuales una familia comprende proteínas con una relación evolutiva clara (> 30% de identidad en la secuencia o información adicional estructural y funcional, que muestre una descendencia común aunque la identidad sea < 30%), mientras que una superfamilia comprende proteínas que tienen sólo un probable origen evolutivo común –por ejemplo, identidades de secuencia porcentuales más bajas pero uno o más motivos o dominios en común.

La similitud entre proteínas homólogas se ve más fácilmente en un diagrama tridimensional, formulado sobre la base de los análisis de secuencia. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de las globinas (las proteínas hemoglobina, mioglobina y sus parientes de las bacterias de plantas y animales) sugieren que evolucionaron de una proteína ancestral monomérica capaz de unir oxígeno (Fig. 3-13). Con el paso del tiempo, el gen de esta proteína ancestral cambió lentamente, divergiendo en etapas iniciales a linajes que llevaron a la globinas animales y vegetales. Cambios posteriores dieron lugar a la mioglobina, la proteína monomérica que almacena oxígeno en el músculo, y a las subunidades α y β de la molécula tetramérica de la hemoglobina ($\alpha_2\beta_2$) del sistema circulatorio de los vertebrados.

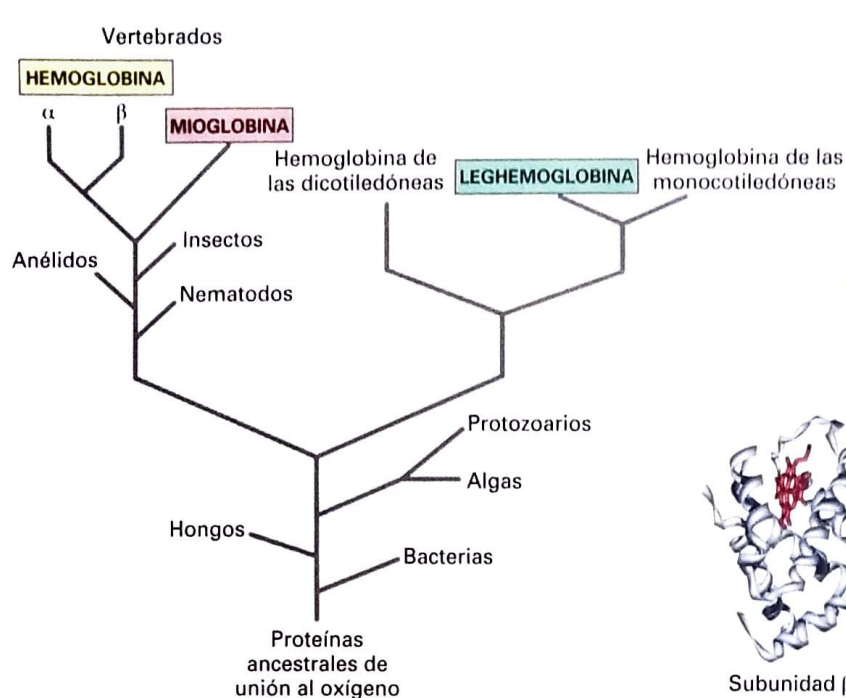
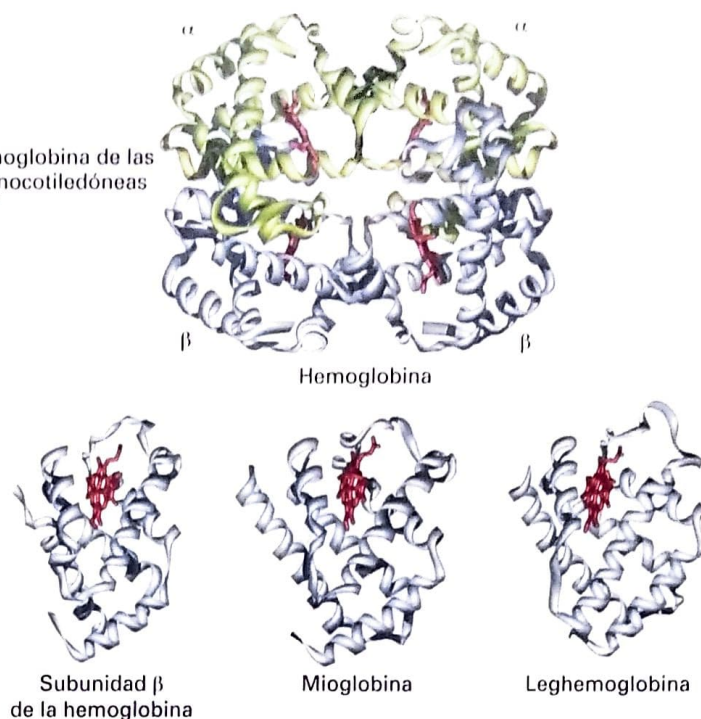


FIGURA 3-13 Evolución de la familia de proteínas de la globina. *Izquierda:* se piensa que una primitiva globina monomérica capaz de unir oxígeno fue el ancestro de las hemoglobinas sanguíneas modernas, de las mioglobinas del músculo y de las leghemoglobinas de las plantas. Las comparaciones de secuencia han mostrado que la evolución de las globinas es paralela a la evolución de los animales y de las plantas. Las principales diferencias han ocurrido con la divergencia de las globinas vegetales y las globinas animales y de la mioglobina



a partir de la hemoglobina. La posterior duplicación de los genes dio lugar a las subunidades α y β de la hemoglobina. *Derecha:* La hemoglobina es un tetrámero de dos subunidades α y dos subunidades β . La similitud estructural de estas subunidades con la leghemoglobina y la mioglobina, ambas monómeros, resulta evidente. Una molécula hemo (rojo) asociada en forma no covalente con cada polipéptido de hemoglobina, es directamente responsable de la unión del oxígeno entre estas proteínas. (Adaptado de R. C. Hardison, 1996, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**:5675)

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 3.1

Estructura jerárquica de las proteínas

- Las proteínas son polímeros lineales de aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos. Una proteína puede tener una única o múltiples cadenas polipeptídicas. La estructura primaria de una cadena polipeptídica es la secuencia de aminoácidos unidos en forma covalente que integran la cadena. Varias interacciones, principalmente no covalentes, entre los aminoácidos de la secuencia lineal estabilizan la estructura tridimensional plegada específica de una proteína o su conformación.
- La hélice α , la hebra β y la hoja β y el giro β son los elementos de mayor prevalencia en la estructura secundaria de las proteínas. Las estructuras secundarias se estabilizan mediante puentes de hidrógeno entre los átomos del esqueleto peptídico (véanse las Figs. 3-4 a 3-6).
- La estructura terciaria de la proteína resulta de las interacciones hidrofóbicas entre los grupos laterales no polares y los puentes de hidrógeno e interacciones iónicas que implican a los grupos laterales polares y al esqueleto polipeptídico. Estas interacciones estabilizan el plegamiento de la proteína, lo cual incluye a sus elementos estructurales secundarios en una configuración tridimensional global.
- Ciertas combinaciones de estructuras secundarias originan diferentes motivos estructurales presentes en una diversidad de proteínas que con frecuencia están asociados con funciones específicas (véase la Fig. 3-9).

- Con frecuencia las proteínas contienen diferentes dominios, regiones plegadas de modo independiente con propiedades estructurales, funcionales y topológicas características (véase la Fig. 3-10).
- La incorporación de dominios como módulos en diferentes proteínas durante la evolución ha generado diversidad en la estructura y la función proteica.
- El número y la organización de las subunidades polipeptídicas individuales de las proteínas multiméricas definen su estructura cuaternaria.
- Las células contienen grandes estructuras supramoleculares llamadas, en ocasiones, máquinas moleculares, en las cuales todos los participantes necesarios en los procesos celulares complejos (p. ej., DNA, RNA y síntesis proteica; fotosíntesis; transducción de las señales) están unidos entre sí.
- Las proteínas homólogas son moléculas que evolucionaron de un ancestro común y por lo tanto tienen secuencias, estructuras y funciones similares. Pueden clasificarse en familias y superfamilias.

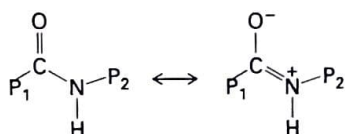
3.2 Plegamiento de las proteínas

Como se notó previamente, cuando se trata de la arquitectura de las proteínas, “la forma hace a la función”. Así, resulta esencial que cuando un polipéptido se sintetiza con su secuencia de aminoácidos en parti-

cular, se pliegue en la conformación tridimensional adecuada con la estructura secundaria, terciaria y posiblemente cuaternaria para cumplir su papel biológico dentro de las células o fuera de ellas. ¿Cómo se genera una proteína con una secuencia adecuada? Una cadena polipeptídica se sintetiza mediante un proceso complejo llamado **traducción**, que tiene lugar en el citoplasma sobre un complejo grande de proteína-ácido nucleico, llamado ribosoma. Durante la traducción, una secuencia de **RNA mensajero (mRNA)**, sirve como molde a partir del cual se dirige el ensamblado de la secuencia de aminoácidos correspondientes. Inicialmente, el mRNA se genera mediante un proceso llamado **transcripción**, en el que una secuencia nucleotídica del DNA se convierte, por medio de la maquinaria de transcripción del núcleo, a una secuencia de mRNA. La complejidad de la transcripción y la traducción se analizan en el Capítulo 4. Aquí describimos los determinantes clave del plegamiento adecuado de una cadena polipeptídica recién formada o en formación (naciente) a medida que emerge del ribosoma.

Los enlaces peptídicos planos limitan las formas en las cuales pueden plegarse las proteínas

Un rasgo estructural crítico de los polipéptidos que limita el modo en el cual puede plegarse la cadena es el enlace peptídico plano. La Figura 3-3 ilustra el grupo amida en los enlaces peptídicos de una cadena polipeptídica. Dado que el enlace peptídico parcialmente se comporta espacialmente como un doble enlace,



el grupo carbonilo y el átomo de nitrógeno amida y los átomos unidos directamente a ellos deben encontrarse todos en un plano fijo (Fig. 3-14); no hay rotación posible alrededor del enlace peptídico. En con-

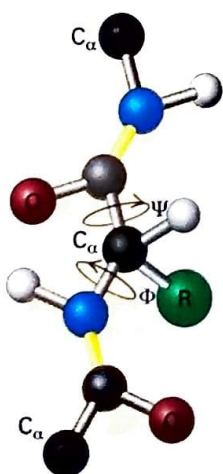


FIGURA 3-14 Rotación entre los grupos peptídicos planos en las proteínas. La rotación alrededor del enlace amino del nitrógeno del carbono C_{α} (el ángulo Φ) y el enlace carbonilo del carbono C_{α} (el ángulo Ψ) permite a los esqueletos polipeptídicos, en principio, adoptar un número muy grande de conformaciones potenciales. Sin embargo, las restricciones estéricas debido a la estructura del esqueleto polipeptídico y las propiedades de las cadenas laterales de los aminoácidos restringen en forma notable las conformaciones potenciales que puede asumir cualquier proteína dada.

secuencia, la única flexibilidad en el esqueleto de una cadena de un polipéptido, que le permite girar y enroscarse —y así plegarse en diferentes formas en tres dimensiones— es la rotación de los planos fijos de los enlaces peptídicos adyacentes uno con respecto a otro alrededor de dos enlaces: el enlace amino del nitrógeno del C_{α} (cuyo ángulo de rotación se conoce como Φ) y el enlace carbonilo del carbono C_{α} (cuyo ángulo de rotación es llamado Ψ).

Una restricción adicional a las conformaciones potenciales que puede adoptar la cadena del esqueleto polipeptídico, es el hecho de que sólo son posibles un número limitado de ángulos Φ y Ψ , dado que para la mayor parte de este tipo de ángulos, los átomos del esqueleto o la cadena lateral se encontrarán demasiado cercanos uno del otro, y por lo tanto, la conformación asociada sería muy inestable e incluso físicamente imposible de lograr.

La secuencia de aminoácidos de una proteína determina su plegamiento

Si bien las restricciones de los ángulos de los enlaces del esqueleto parecen muchas, cualquier cadena polipeptídica que contenga solo unos pocos residuos, en principio, podría plegarse en muchas conformaciones; por ejemplo, si los ángulos Φ y Ψ se limitaran a solo 8 combinaciones, un polipéptido potencial de n residuos de longitud, tendría potencialmente 8^n conformaciones; aún para un pequeño polipéptido de solo 10 residuos, habría aproximadamente 8 600 000 conformaciones posibles. En general, sin embargo, cualquier proteína en particular adopta solo una o muy pocas conformaciones muy relacionadas, llamadas *estado nativo*; para la gran mayoría de las proteínas, el estado nativo es la forma plegada de mayor estabilidad de la molécula y la que permite que funcione con normalidad. En términos termodinámicos, el estado nativo habitualmente es la conformación con la menor energía libre (G) (véase el Cap. 2).

¿Qué características de las proteínas limitan su plegamiento de muchas conformaciones potencialmente posibles, a solo una? Las propiedades de las cadenas laterales (p. ej., tamaño, hidrofobicidad, capacidad para formar puentes de hidrógeno y enlaces iónicos) junto con su secuencia particular en el esqueleto polipeptídico, imponen restricciones clave. Por ejemplo, una cadena lateral grande como la del triptófano podría bloquear estéricamente que una región de la cadena se empaquetara estrechamente con la otra, mientras que una cadena lateral con carga positiva como la arginina, atraería a un segmento del polipéptido que tiene una cadena lateral complementaria cargada negativamente (p. ej., el ácido aspártico). Otro ejemplo que ya ha sido analizado es el efecto de las cadenas laterales alifáticas en la héptadas repetidas, para la promoción de la asociación de hélices y la consecuente formación de espirales enrolladas. Así, la estructura primaria de un polipéptido determina su estructura secundaria, terciaria y cuaternaria.

La evidencia inicial de que la información necesaria para que una proteína se pliegue adecuadamente está codificada en su secuencia de aminoácidos, provino de estudios *in vitro* sobre el replegamiento de proteínas purificadas, especialmente por los estudios que fueron galardonados con el premio Nobel en 1960 hechos por Christian Anfinsen, sobre el replegamiento de la ribonucleasa A, una enzima que escinde el RNA. Otros habían mostrado previamente que varias perturbaciones químicas y físicas pueden romper las interacciones débiles, no covalentes, que estabilizan la conformación nativa de una proteína, llevando a la pérdida de su estructura terciaria normal. El proceso por el cual se desarma la estructura de una proteína (y esto puede incluir la estructura

secundaria y terciaria) se llama **desnaturalización**. La desnaturalización puede ser inducida por la energía térmica proveniente del calor, los pH extremos que alteren las cargas en las cadenas laterales de los aminoácidos y la exposición a desnaturalizantes como la urea o el clorhidrato de guanidina a concentraciones de 6-8 M, todo lo cual desarma las interacciones no covalentes, estabilizadoras de la estructura. El tratamiento con agentes reductores, como el β -mercaptoetanol, que rompen los puentes disulfuro pueden desestabilizar adicionalmente las proteínas que lo contienen. Bajo estas condiciones de desplegamiento o desnaturalización, una población de moléculas uniformemente plegadas se desestabiliza y se convierte en un conjunto de muchas moléculas no plegadas o desnaturalizadas, que pueden tener muchas conformaciones diferentes no nativas, y sin actividad biológica. Como hemos visto, existe un gran número de conformaciones no nativas posibles (p. ej., $8^n - 1$).

La desnaturalización espontánea de las proteínas en condiciones desnaturalizantes no resultan una sorpresa dado el incremento importante de la entropía que acompaña a la proteína desnaturalizada, que asume muchas conformaciones no nativas. Sin embargo, lo que resulta sorprendente es que cuando una muestra pura de un único tipo de proteína no plegada colocada en un tubo de ensayo se retorna muy cuidadosamente a las condiciones normales (temperatura corporal, niveles normales de pH, reducción de la concentración de los desnaturalizantes), algunos polipéptidos desnaturalizados pueden plegarse en forma espontánea a sus estados nativos, biológicamente activos, como ocurrió en los experimentos de Anfinsen. Este tipo de experimento de replegamiento, así como los estudios que muestran que las proteínas sintéticas hechas químicamente pueden plegarse en forma adecuada, mostraron que la información que contiene la estructura primaria de la proteína podría ser suficiente para dirigir el replegamiento correcto. Las nuevas proteínas sintéticas recién sintetizadas se pliegan en sus conformaciones adecuadas, tal como lo hacen las proteínas desnaturalizadas. La similitud observada en las estructuras tridimensionales de las proteínas con secuencias similares de aminoácidos, que se notó en la Sección 3.1, proporcionó evidencia adicional de que la secuencia primaria determina también el plegamiento proteico in vivo. La formación de estructuras secundarias y motivos estructurales se produce tempranamente en el proceso de plegamiento, seguida del ensamble de dominios estructurales más complejos, los cuales se asocian con estructuras terciarias y cuaternarias aún más complejas (Fig. 3-15).

El plegamiento de las proteínas in vivo está promovido por las chaperonas

Las condiciones de replegamiento de una proteína purificada desnaturalizada en un tubo de ensayo difieren notablemente de las condiciones bajo las cuales se pliega un polipéptido recién sintetizado dentro de una célula. La presencia de otras biomoléculas que incluyen a muchas otras proteínas a muy altas concentraciones (~ 300 mg/mL en las células de mamíferos), parte de las cuales son nacientes y están en el proceso de plegamiento, puede interferir potencialmente con el plegamiento autónomo espontáneo de una proteína. Aún más, si bien el plegamiento de una proteína a su estado nativo puede ocurrir in vitro, no sucede en forma sincronizada para todas las moléculas desplegadas. Teniendo en cuenta estos impedimentos, las células requieren un mecanismo más rápido y más eficiente para plegar las proteínas a sus formas correctas que el que proporciona su secuencia. Sin esta ayuda, las células desperdiciarían mucha energía en la síntesis de proteínas plegadas de manera incorrecta, no funcionales, que deberían ser destruidas para evitar que

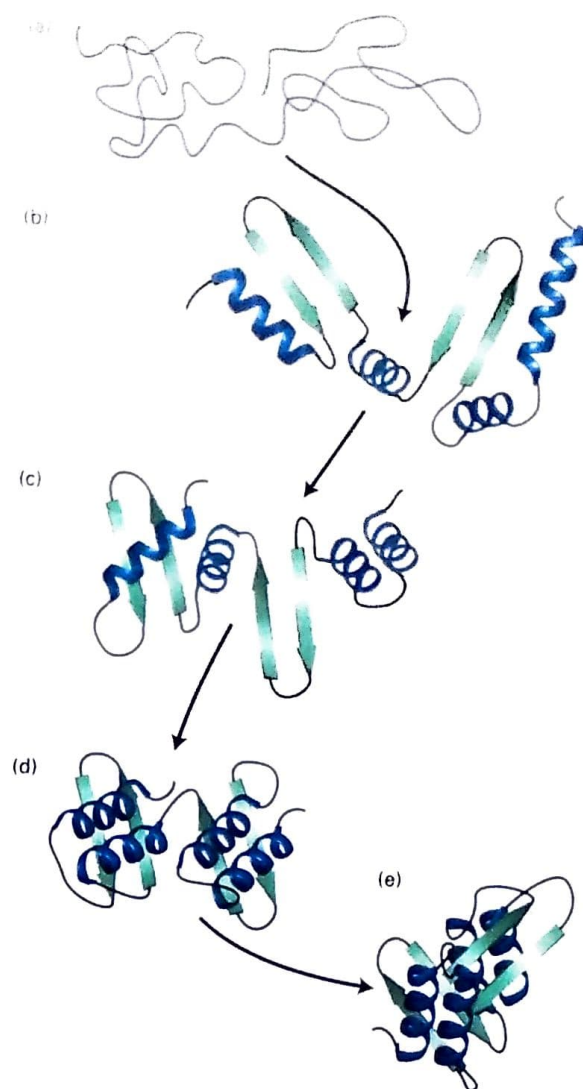


FIGURA 3-15 Vía de plegamiento hipotética de una proteína. El plegamiento de una proteína monomérica sigue la jerarquía estructural de estructura primaria (a) $\rightarrow$ secundaria (b-d) $\rightarrow$ terciaria (e). La formación de pequeños motivos estructurales (c) parece preceder la formación de dominios (d) y la estructura terciaria final (e).

afectasen la función celular. Las células claramente tienen mecanismos de este tipo dado que más del 95% de las proteínas presentes dentro de las células han mostrado encontrarse en sus conformaciones nativas. La explicación de esta notable eficiencia de las células para promover el plegamiento adecuado de las proteínas es que las células sintetizan un conjunto de proteínas, llamadas **chaperonas**, que facilitan el plegamiento adecuado de las proteínas nacientes.

La importancia de las chaperonas está resaltada por la observación de que muchas se han conservado durante la evolución. Se encuentran en todos los organismos, desde las bacterias hasta los seres humanos, y algunas son homólogas, con alta similitud de secuencia, y usan mecanismos casi idénticos para ayudar al plegamiento de las proteínas. Las chaperonas emplean la unión al ATP, la hidrólisis de ATP a ADP y el intercambio de una nueva molécula de ATP por el ADP para inducir una serie de cambios de conformación esenciales para su funcionamiento.

Las chaperonas pueden plegar a las proteínas recién sintetizadas a conformaciones funcionales, volver a plegar proteínas mal plegadas o desplegadas a sus conformaciones funcionales, desensamblar agregados de proteínas potencialmente tóxicos que se forman durante el plegamiento inadecuado de estas moléculas y ensamblar y dismantlar grandes complejos multiproteicos. Las chaperonas, que en los eucariontes se localizan en cada compartimento y orgánulo celular, se unen a las proteínas diana en cuyo plegamiento asistirán. Hay varios tipos distintos de chaperonas con diferentes estructuras, todas las cuales usan la unión al ATP y su hidrólisis en una diversidad de formas para facilitar el plegamiento. Estas incluyen 1) incrementar la unión de la proteína a los sustratos y 2) cambiar la conformación de las chaperonas. El cambio de conformación dependiente de ATP se emplea para 1) optimizar el plegamiento después de que un sustrato se ha plegado, 2) retornar la chaperona a su estado inicial con el fin de que esté disponible para auxiliar en el plegamiento de otra molécula y 3) establecer el tiempo permitido para el replegamiento, que puede ser determinado por la tasa de hidrólisis de ATP.

Se han identificado dos familias generales de chaperonas:

- Las **chaperonas moleculares**, que se unen a un segmento corto de un sustrato proteico y estabilizan a las proteínas desplegadas o parcialmente plegadas, evitando de este modo que éstas se agreguen y se degraden.
- Las **chaperoninas** que forman pequeñas cámaras plegadas dentro de las cuales puede quedar secuestrada la totalidad o una parte de la proteína no plegada, dando tiempo y un medio adecuado para que se pliegue adecuadamente.

Una razón por la cual son necesarias las chaperonas para el plegamiento de las proteínas intracelulares es que ayudan a evitar el agregado de proteínas no plegadas. Las proteínas desnaturalizadas o parcialmente plegadas tienden a agregarse en masas grandes, frecuentemente insolubles en agua, a partir de las cuales es extremadamente difícil que una proteína se disocie y luego se pliegue en su conformación adecuada. En parte, esta agregación se debe a la exposición de las cadenas laterales hidrofóbicas que aún no han tenido oportunidad de ocultarse en el núcleo central de la proteína plegada. Estas cadenas laterales hidrofóbicas expuestas en diferentes moléculas, se pegarán entre sí debido al efecto hidrofóbico (véase el Cap. 2) y promoverán, de este modo, la agregación. El riesgo de esta agregación es especialmente alto para las proteínas recién sintetizadas que aún no han completado su plegamiento adecuado. Las chaperonas evitan la agregación uniéndose al polipéptido efector o secuestrándolo de otras proteínas parcial o completamente desplegadas, dando así a la proteína naciente el tiempo para plegarse adecuadamente.

Chaperonas moleculares La proteína de choque térmico Hsp70 del citosol y sus homólogos (Hsp70 de la matriz mitocondrial, BiP del retículo endoplasmático y DnaK de las bacterias) son chaperonas moleculares. Fueron identificadas tras su aparición rápida después de que la célula haya sufrido estrés por un choque térmico (*Hsp* corresponde a la denominación en inglés "*heat shock protein*", o su equivalente en español proteína de choque térmico). La Hsp70 y sus homólogas son las principales chaperonas en todos los organismos. Al unirse al ATP, la proteína Hsp monomérica adquiere una forma abierta, en la cual el bolsillo hidrofóbico capaz de unir sustrato expuesto se une en forma

transitoria a las regiones hidrofóbicas expuestas de una proteína efectora plegada en forma incompleta o parcialmente naturalizada, y luego libera rápidamente este sustrato en tanto esté unida al ATP (paso 1 de la Fig. 3-16a). La hidrólisis del ATP unido hace que la chaperona molecular adquiera una forma cerrada, que se une a su proteína sustrato mucho más estrechamente, y esta unión más estrecha parece facilitar el plegamiento de la proteína diana en parte al evitar que se agregue con otras proteínas desplegadas. El intercambio del ATP por el ADP unido a la proteína genera un cambio de conformación en la chaperona, que libera a la proteína diana. Si ahora la diana está adecuadamente plegada, no puede volver a unirse a una Hsp70. Si permanece al menos parcialmente desplegada, puede unirse nuevamente para tener otra oportunidad de plegarse en forma adecuada.

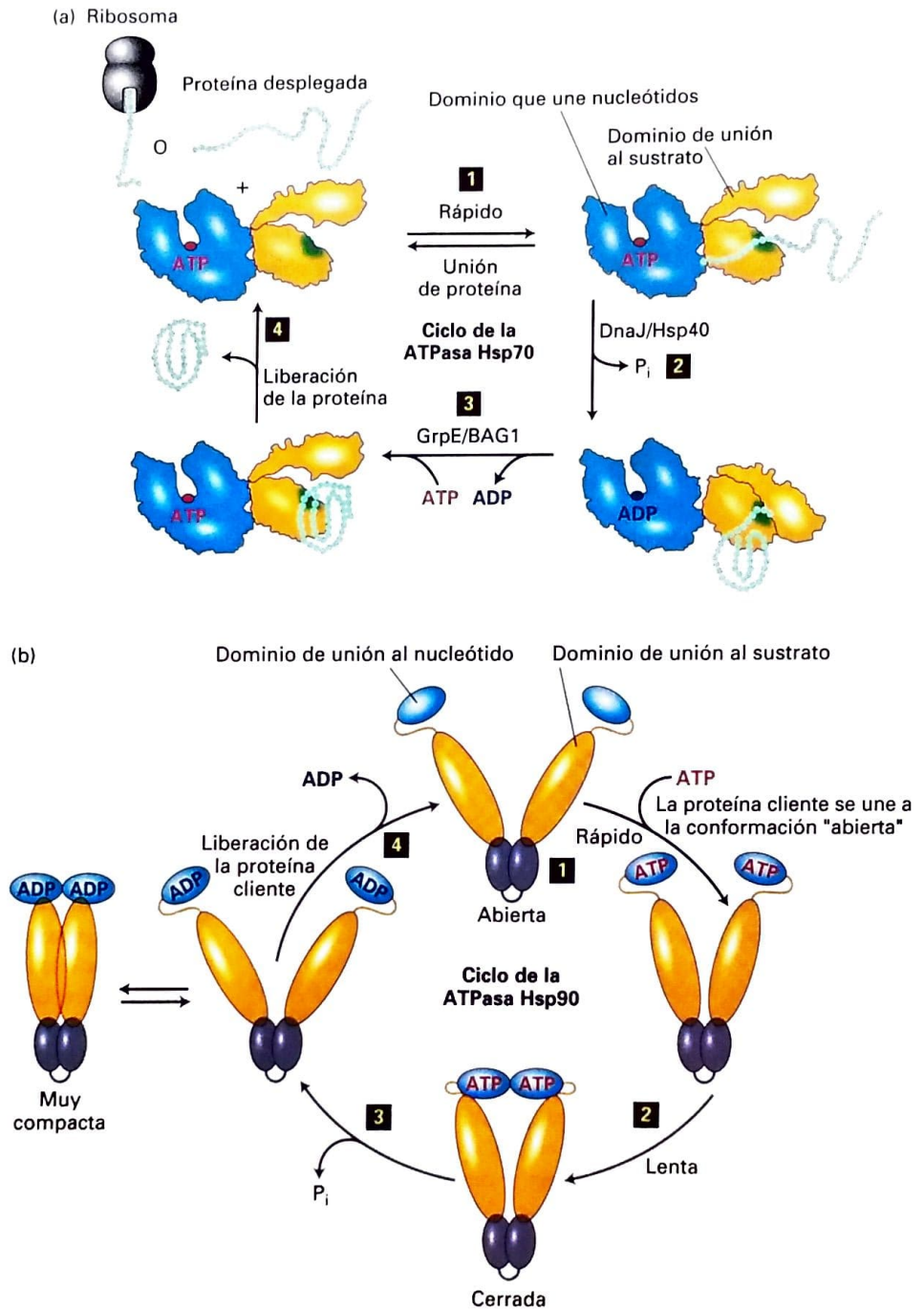
Proteínas adicionales como la co-chaperona Hsp40 de los eucariontes (DnaJ de las bacterias) ayudan a incrementar la eficiencia del plegamiento de muchas proteínas, mediado por Hsp70, al estimular —junto con la unión al sustrato— la tasa de hidrólisis del ATP mediada por Hsp70/DnaK, entre 100 y 1 000 veces (véase el paso 2 en la Fig. 3-16a). Los miembros de 4 familias diferentes de factores de intercambio de nucleótidos (p. ej., GrpE de las bacterias, BAG, HspBP y Hsp110 de los eucariontes) interactúan también con la Hsp70/DnaK, y promueven el intercambio de ATP por ADP. Se piensa que múltiples chaperonas moleculares se unen a todas las cadenas polipeptídicas nacientes, a medida que son sintetizadas en los ribosomas. En las bacterias, el 85% de las proteínas se liberan de sus chaperonas y se pliegan normalmente; en el caso de los eucariontes, esta vía la sigue un porcentaje más elevado de proteínas.

La familia proteica Hsp70 no es la única clase de chaperona molecular. Otra clase distinta de chaperonas moleculares es la familia Hsp90. Los miembros de esta familia están presentes en todos los organismos, excepto las bacterias archaea. En los eucariontes hay distintas Hsp90 localizadas en diferentes orgánulos, y la Hsp90 es una de las proteínas más abundantes en el citosol (1-2% de las proteínas totales). El abanico de sustratos proteicos de las chaperonas Hsp90 no es tan amplio como el de algunas otras chaperonas; las Hsp90 son de importancia crítica para las células. Las ayudan a manejar las proteínas desnaturalizadas generadas por el estrés (p. ej., choque térmico) y aseguran que parte de sus sustratos llamados "clientes", puedan convertirse de un estado inactivo a uno activo, o bien mantenerse en una conformación funcional. En algunos casos, las Hsp90 forman un complejo relativamente estable con sus clientes, hasta que una señal adecuada provoque su disociación, liberándola para llevar a cabo cierta función regulada en las células. Estos clientes incluyen factores de transcripción como los receptores para las hormonas esteroideas, estrógeno o testosterona, que regulan el desarrollo y la función sexual, controlando las actividades de muchos genes (véase el Cap. 7). Otro tipo de cliente de las Hsp90 son las enzimas llamadas cinasas, que controlan las actividades de muchas proteínas por fosforilación (véanse los Caps. 15 y 16); se estima que hasta el 20% de todas las proteínas de las levaduras tienen influencia directa o indirecta de la actividad de las Hsp90.

A diferencia de la Hsp70 monomérica, la Hsp90 opera como dímero, en un ciclo en el cual la unión-hidrólisis de ATP y la liberación de ADP están acopladas a cambios conformacionales mayores y la unión, activación y liberación de los clientes (Fig. 3-16b). Si bien aún queda por aprender acerca del mecanismo de las Hsp90, queda claro que los clientes se unen a la conformación "abierta", que la unión de ATP conduce a la interacción de los dominios que unen ATP y la formación de una conformación "cerrada", y que la hidrólisis del ATP desempeña

FIGURA 3-16 Plegamiento molecular de las proteínas mediado por chaperonas. (a) Hsp70.

Muchas proteínas se plegan en sus estructuras tridimensionales adecuadas con la asistencia de proteínas similares a la Hsp70. Estas chaperonas moleculares se unen a un polipéptido nascente en cuanto emerge de un ribosoma o a una proteína que se ha plegado de alguna otra forma. En el ciclo de la Hsp70, una proteína no plegada se une en rápido equilibrio a la conformación abierta del dominio que une sustrato (SBD, anaranjado) de la Hsp70 monomérica, a la cual se une un ATP (óvalo rojo) en el dominio que une nucleótido (NBD, azul) (paso 1). El bolsillo que une sustrato se muestra como un parche verde en el dominio que une sustrato. Las proteínas accesorias co chaperonas (DnaJ/Hsp40) estimulan la hidrólisis de ATP a ADP (óvalo azul) y un cambio de conformación en la Hsp70 dando como resultado la forma cerrada, en la cual el sustrato queda fijado al SBD; aquí, se facilita el plegamiento adecuado (paso 2). El intercambio del ATP por el ADP unido, estimulado por otras proteínas co chaperonas accesorias (GrpE/BAG1), convierte la Hsp70 nuevamente a la forma abierta (paso 3), liberando al sustrato adecuadamente plegado (paso 4). (b) Hsp90. Las proteínas Hsp90 son dímeros cuyos monómeros contienen un dominio NBD N-terminal (azul), un dominio de unión (SBD, anaranjado) de un sustrato central (cliente) y un dominio de dimerización C-terminal (gris). El ciclo de la Hsp90 comienza cuando no hay nucleótido unido al NBD y el dímero está en una configuración muy flexible, abierta (en forma de Y) que puede unirse a los sustratos (paso 1). La rápida unión de ATP lleva a un lento cambio de conformación en el cual los NBD se dimerizan y los SBD se mueven en conjunto a una conformación cerrada (paso 2). La hidrólisis de ATP da como resultado el plegamiento del cliente y la liberación de la proteína cliente (pasos 3 y 4). La Hsp90 unida al ADP puede adoptar varias conformaciones, que incluyen una forma muy compacta. La liberación del ADP regenera el estado inicial, que puede entonces interactuar con clientes adicionales (paso 4). (Parte [b] modificada de M. Taipale, D. F. Jarosz y S. Lindquist, 2010, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11[7]:515-528)



un papel importante en la activación de ciertas proteínas cliente y su ulterior liberación de la Hsp90. Sabemos también que hay al menos 20 co-chaperonas que pueden tener profundos efectos en la actividad de la Hsp90, y éstas incluyen la actividad de la ATPasa y la determinación de cuáles serán las proteínas clientes (especificidad de clientes). Las co-chaperonas también pueden ayudar a coordinar las actividades de la Hsp90 y la Hsp70. Por ejemplo, la Hsp70 puede ayudar a iniciar el

plegamiento de un cliente que luego es asistido por una co-chaperona para el procesamiento adicional por la Hsp90. La actividad de la Hsp90 también puede verse afectada por su modificación covalente a cargo de pequeñas moléculas. Finalmente, las Hsp90 pueden ayudar a que las células reconozcan proteínas mal plegadas, incapaces de volver a plegarse, y facilitar su degradación mediante mecanismos que se analizan más adelante en este capítulo. Así, como parte del sistema de control

de calidad de las células, las chaperonas pueden ayudar al plegamiento adecuado de las proteínas o facilitar la destrucción de las que no se pueden plegar adecuadamente.

Las chaperoninas El plegamiento adecuado de una gran variedad de proteínas recién sintetizadas requiere además la ayuda de otro tipo de proteínas, las chaperoninas, llamadas también Hsp60. Estos ensamblados supramoleculares cilíndricos de gran tamaño se forman a partir de dos anillos de oligómeros. Hay dos grupos distintos de chaperoninas que difieren en cierta medida en sus estructuras, mecanismos moleculares detallados y localizaciones. Las chaperoninas del grupo I, presentes en los procariontes, cloroplastos y mitocondrias,

están formados por dos anillos, cada uno de los cuales tiene siete subunidades que interactúan con una “tapa” co-chaperona homoeptamérica. La chaperonina bacteriana del grupo I conocida como GroEL/GroES se muestra la Figura 3-17a. En la bacteria *E. coli* se cree que la GroEL participa en el plegamiento de aproximadamente el 10% de todas las proteínas. Las chaperoninas del grupo II, que se encuentran en el citosol de las células eucariontes (p. ej., la TriC de los mamíferos) y en las bacterias archaea, puede tener entre 8 y 9 subunidades homoméricas o heteroméricas en cada anillo, y la función “tapa” está incorporada en esas subunidades –no se requiere una tapa separada–. Al parecer, la hidrólisis de ATP dispara el cierre de la tapa de las chaperoninas del grupo II.

ANIMACIÓN FOCALIZADA: Ciclo de la ATPasa groEL

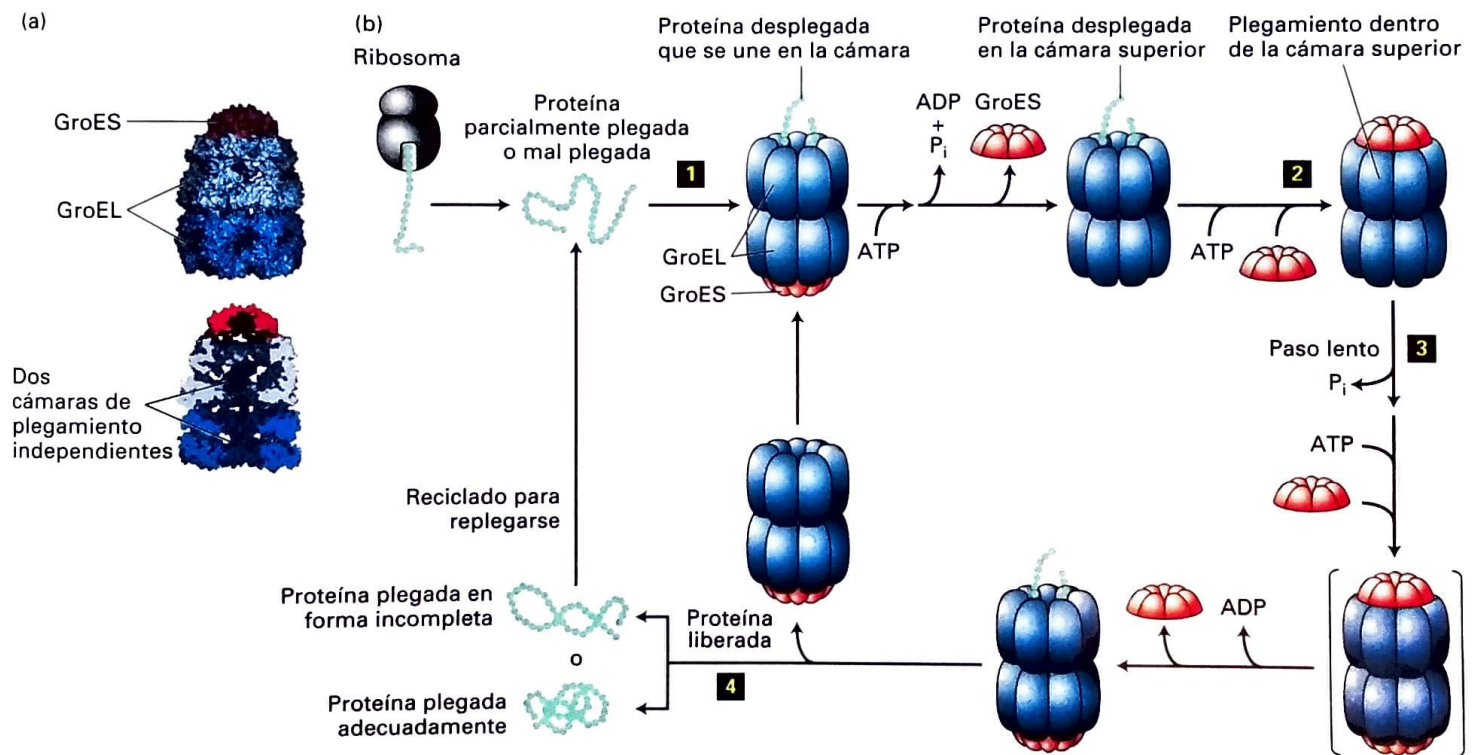


FIGURA 3-17 Plegamiento de las proteínas mediado por chaperoninas.

El plegamiento adecuado de algunas proteínas depende de las chaperoninas, como la chaperonina procarionte del grupo I, GroEL. (a) La GroEL es un complejo con forma de barril de 14 subunidades idénticas de ~60 000 PM dispuestas en dos anillos apilados (azul y rojo), de 7 subunidades cada uno, que forman dos cámaras de plegamiento de polipéptidos internos diferentes. Las tapas homoeptaméricas (subunidades de 10 000 PM), GroES (amarillo), se pueden unir a cada uno de los extremos del barril y sellar la cámara en cada lado. (b) Ciclo de plegamiento GroEL-GroES. Un polipéptido parcialmente plegado o plegado en forma incorrecta entra a una de las cámaras de plegamiento (paso 1). La segunda cámara queda bloqueada por una tapa GroES. Cada anillo de 7 subunidades GroEL se une a 7 ATP, los hidroliza y libera los ADP, en una serie ordenada con la unión y la liberación de GroES y la unión, liberación

y plegamiento del polipéptido. Los cambios conformacionales mayores que ocurren en los anillos de GroEL controlan la unión de la tapa GroES que sella la cámara (paso 2). El polipéptido permanece encerrado en la cámara tapada, donde puede plegarse hasta que la hidrólisis del ATP, el paso más lento y limitante de la velocidad en este ciclo ($t_{1/2} \sim 10$ s) (paso 3), induce la unión de ATP y un GroES diferente al otro anillo (intermediario transitorio que se muestra entre paréntesis). Entonces, esto hace que la tapa GroES y el ADP unido al anillo que contiene el péptido se liberen, abriendo la cámara y permitiendo que la proteína plegada difunda hacia fuera de la cámara (paso 4). Si el polipéptido se pliega en forma adecuada, puede avanzar el funcionamiento en el interior de la célula. Si permanece plegado parcialmente o mal plegado, puede volver a un GroEL no ocupado y puede repetirse el ciclo (Parte [a] modificada de David L. Nelson y Michael M. 2000, Cox, Lehninger: Principles of Biochemistry, 3d ed., W. H. Freeman and Co.)

La Figura 3-17b ilustra el ciclo GroEL/GroES del plegamiento proteico. Un polipéptido plegado o mal plegado < 60 kD de masa es capturado por residuos hidrofóbicos cerca de la entrada de la cámara GroEL, y entra a una de las cámaras de plegamiento (cámara superior de la Fig. 3-17b). La segunda cámara está bloqueada por la tapa GroES. Cada una de las 14 subunidades de GroEL puede unir ATP, hidrolizarlo y posteriormente liberar ADP. Estas reacciones están concertadas para cada subconjunto de 7 subunidades en un anillo único, y conducen a cambios conformacionales mayores. Estos cambios controlan tanto la unión de la tapa GroES, que sella la cámara, como el ambiente de la cámara en el cual ocurre el plegamiento del polipéptido. El polipéptido permanece encerrado en la cámara cerrada por esta tapa. Allí puede plegarse hasta que la hidrólisis de ATP en esa cámara, el paso más lento y limitante de la velocidad del ciclo ($t_{1/2}$ ~10 s) induzca la unión de ATP y de un GroES diferente al otro anillo. Este luego hace que la tapa GroES y el ADP unidos al anillo que contiene el péptido se liberen, abriendo la cámara y permitiendo que la proteína plegada difunda hacia el exterior de ésta. Si el polipéptido se plegó en forma adecuada, puede proceder a funcionar en la célula. Si permanece parcialmente plegado o mal plegado puede volver a unirse a una GroEL no ocupada, y el ciclo se puede repetir. Hay una relación recíproca entre los dos anillos en un complejo GroEL. El cierre de una cámara por GroES para permitir que el sustrato secuestrado se pliegue en ella está acompañado de la liberación de un polipéptido sustrato de la cámara del segundo anillo (unión, plegamiento y liberación simultánea desde la segunda cámara no se ilustran en la Fig. 3-17b). Hay una similitud sorprendente entre el diseño de un barril con tapa de GroEL/GroES, en el cual las proteínas están secuestradas para su plegamiento, y la estructura del proteasoma 26S que participa en la degradación proteica (y que se analiza en la Sección 3.4). Además, un grupo de proteínas que son parte de la familia AAA* de ATPasas, están compuestas por anillos hexaméricos con un poro central, en el cual pueden entrar los sustratos para plegarse o desplegarse o, en algunos casos, sufrir proteólisis; ejemplos de esto se analizarán en el Capítulo 13.

Las proteínas plegadas en forma alternativa tienen implicación en las enfermedades

La evidencia reciente sugiere que una proteína puede plegarse en una estructura tridimensional alternativa como resultado de mutaciones, modificaciones covalentes inadecuadas, que se producen después de la síntesis proteica u otras razones aún no identificadas. Este “plegamiento erróneo” no solo lleva a la pérdida de la función normal de la proteína, sino que con frecuencia la etiqueta para su degradación proteolítica. Sin embargo, cuando la degradación es incompleta o no está acompañada de plegamiento inadecuado, la acumulación posterior de la proteína mal plegada o sus fragmentos proteolíticos contribuyen a ciertas enfermedades degenerativas caracterizadas por la presencia de agregados insolubles, desordenados o proteínas desordenadas (placas), en varios órganos, que incluyen el hígado y el cerebro.

Algunas enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer y la enfermedad de Parkinson de los seres humanos, y la encefalopatía espongiforme transmisible (enfermedad de las “vacas locas”), en las vacas y ovejas, están marcadas por la formación de placas filamentosas enredadas en un cerebro en deterioro (Fig. 3-18). Los *filamentos amiloides* que componen estas estructuras derivan de abundantes proteínas naturales como la proteína precursora amiloidea Tau, que está embebida en la membrana plasmática, una proteína que se une a los microtúbulos, y

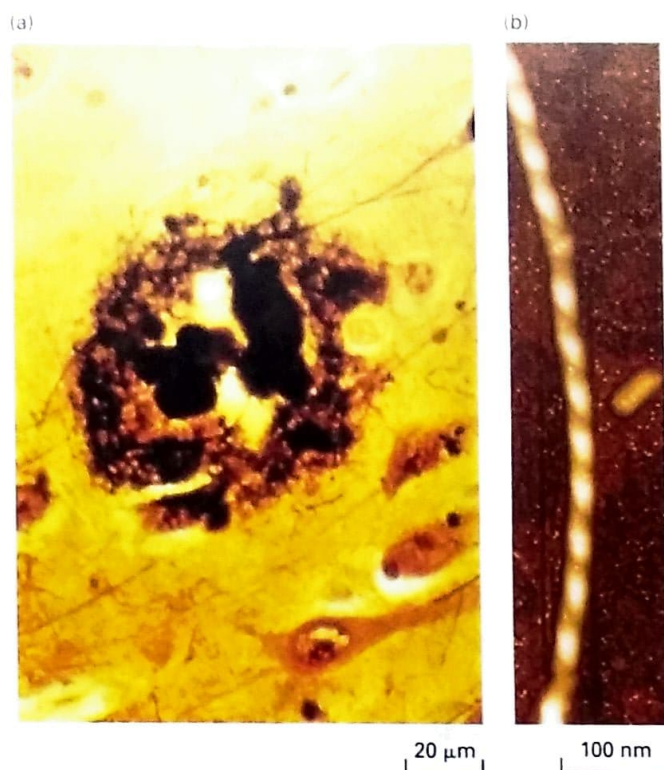


FIGURA 3-18 La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la formación de placas insolubles compuestas por proteína amiloide. (a) A baja resolución, una placa amiloide del cerebro de un paciente con Alzheimer aparece como una maraña de filamentos. (b) La estructura regular de los filamentos de las placas se revela en el microscopio de fuerza atómica. La proteólisis de las proteínas precursoras que se presentan naturalmente en la placa amiloide dan un fragmento corto llamado proteína β amiloide que, por razones desconocidas, cambia de una conformación helicoidal a una hoja β . Esta estructura alternativa se agrega en los filamentos muy estables (amiloides) presentes en las placas. Los cambios patológicos similares de otras proteínas provocan otras enfermedades degenerativas. (Cortesía de K. Joshi)

la proteína priónica, una proteína “infecciosa”. Bajo la influencia de causas desconocidas, estas proteínas con helices α o sus fragmentos proteolíticos se plegan a estructuras que contienen una hoja β alternativa y se polimerizan a filamentos muy estables. Si los depósitos extracelulares de estos filamentos o las proteínas plegadas en forma alternativa, solubles, resultan tóxicas para las células, aún no está claro. ■

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 3.2

Plegamiento proteico

- La estructura primaria (secuencia de aminoácidos) de una proteína determina su estructura tridimensional, la que a su vez determina su función. En resumen, la función deriva de la estructura y la estructura deriva de la secuencia.
- Dado que la función de la proteína deriva de su estructura, las proteínas recién sintetizadas deben plegarse en la forma correcta para funcionar adecuadamente.

- La estructura plana del enlace peptídico limita el número de conformaciones que puede tener un polipéptido (véase Fig. 3-14).
- La secuencia de aminoácidos de una proteína dicta su plegamiento a una conformación tridimensional específica, el estado nativo. Las proteínas se desplegarán o se desnaturalizarán si se las trata en condiciones que alteran las interacciones no covalentes que estabilizan sus estructuras tridimensionales.
- El plegamiento de las proteínas *in vivo* ocurre con la ayuda de las chaperonas dependientes de ATP. Las chaperonas pueden influenciar a las proteínas de varias maneras, que incluyen el evitar el plegamiento inadecuado y la agregación, el facilitar el plegamiento adecuado y el mantener una estructura adecuada, estable, requerida para la actividad ulterior de las proteínas (véase la Fig. 3-16).
- Hay dos grandes clases de chaperonas: 1) las chaperonas moleculares que se unen a un segmento corto de un sustrato proteico y 2) las chaperoninas que forman cámaras de plegamiento dentro de las cuales puede estar secuestrada parte o toda una proteína no plegada, dándole tiempo, en el ambiente adecuado, para que se pliegue adecuadamente.
- Parte de las enfermedades neurodegenerativas son provocadas por agregados de proteínas plegadas en forma estable en una conformación alternativa.

3.3 Unión de las proteínas y catálisis enzimática

Las proteínas llevan a cabo una diversidad extraordinaria de actividades dentro y fuera de las células y la mayoría de estas funciones se basan sobre la capacidad de estas moléculas de comprometerse en una actividad en común: la unión. Las proteínas se unen entre sí, a otras macromoléculas, a moléculas pequeñas y a iones. En esta sección describimos algunas características clave de la unión de las proteínas y luego nos centramos en un grupo de proteínas, las enzimas, con mayor detalle. Las actividades de otras clases funcionales de proteínas (estructurales, de andamiaje, transporte, regulación, motoras) se describirán en capítulos posteriores.

La unión específica de ligandos subyace a las funciones de la mayoría de las proteínas

La molécula a la cual se une una proteína se llama **ligando**. En algunos casos la unión del ligando provoca un cambio en la forma de la proteína. Estos cambios de conformación son integrales al mecanismo de acción de muchas proteínas e importantes en la regulación de su actividad.

Dos propiedades de una proteína caracterizan el modo en el que se une al ligando. La *especificidad* se refiere a la capacidad de la proteína de unirse a una molécula o a un grupo muy pequeño de moléculas con preferencia a todas las demás. La *afinidad* se refiere a la estrechez o la fuerza de la unión, expresada habitualmente por la constante de disociación (K_d). La K_d para un complejo proteína-ligando, que es la

inversa de la constante de equilibrio K_{eq} para la reacción de unión, es la medida cuantitativa más común de la afinidad (véase el Cap. 2). Cuanto más fuerte sea la interacción entre una proteína y un ligando, menor será el valor de K_d . Tanto la especificidad como la afinidad de una proteína por un ligando dependen de la estructura del *sitio de unión al ligando*. Para que ocurran interacciones de alta afinidad y alta especificidad, la forma y las propiedades químicas del sitio de unión deben ser complementarias a las de las moléculas de ligando, propiedad llamada **complementariedad molecular**. Como vimos en el Capítulo 2, la complementariedad molecular permite que las moléculas formen múltiples interacciones no covalentes en un espectro cercano y de este modo se mantienen unidas.

Uno de los ejemplos mejor estudiados proteína-ligando, que implica exquisita afinidad y alta especificidad, es el de los **anticuerpos** que se unen a los **antígenos**. Los anticuerpos son proteínas que circulan en la sangre y son fabricadas por el sistema inmunitario (véase el Cap. 23) en respuesta a los antígenos que son habitualmente macromoléculas presentes en los agentes infecciosos (p. ej., una bacteria o un virus) u otras sustancias extrañas (p. ej., proteínas o polisacáridos de los pólenes). Los diferentes anticuerpos se generan en respuesta a diferentes antígenos y estos anticuerpos tienen la notable característica de unirse en forma específica (“reconocimiento”) a una parte del antígeno llamada **epítipo**, que inicialmente indujo la producción del anticuerpo, y no de otras moléculas. Los anticuerpos actúan como sensores específicos para los antígenos, formando complejos antígeno-anticuerpo que inician una cascada de reacciones protectoras por las células del sistema inmunitario.

Todos los anticuerpos son moléculas en forma de Y, constituidas por dos cadenas idénticas más largas o *pesadas*, y dos cadenas idénticas más cortas o *ligeras* (Fig. 3-19a). Cada brazo de una molécula de anticuerpo contiene una cadena ligera única, ligada a una cadena pesada por un puente disulfuro. Cerca del extremo de cada brazo hay seis bucles altamente variables llamados *regiones determinadoras de la complementariedad (CDR)* que forman los sitios de unión al antígeno. Las secuencias de los 6 bucles son altamente variables entre los anticuerpos, lo cual genera sitios de unión al ligando, de complementariedad única, que los hacen específicos para diferentes epítipos (Fig. 3-19b). El íntimo contacto entre estas dos superficies, estabilizado por numerosas interacciones no covalentes, es responsable de la especificidad de unión extremadamente precisa que muestra un anticuerpo.

La especificidad de los *anticuerpos* es tan precisa que pueden distinguir entre las células de los miembros individuales de una especie y, en algunos casos, entre proteínas que difieren solo por un único aminoácido, o inclusive entre proteínas con secuencias idénticas, que solo tienen diferencias en las modificaciones postraduccionales. Dada su especificidad y la facilidad con la cual pueden producirse (véase el Cap. 23), los anticuerpos son reactivos de mucha utilidad en muchos de los experimentos que se analizarán en capítulos posteriores.

Veremos muchos ejemplos de unión proteína-ligando en este libro, lo que incluye hormonas que se unen a receptores (véase el Cap. 15), moléculas de regulación que se unen al DNA (véase el Cap. 7) y moléculas de adhesión celular que se unen a la matriz extracelular (véase el Cap. 20), solo por nombrar algunas. Aquí nos fijamos en el modo en que la unión de una clase de proteínas, las enzimas, a sus ligandos resultan en la catálisis de las reacciones químicas esenciales para la supervivencia y funcionamiento de las células.

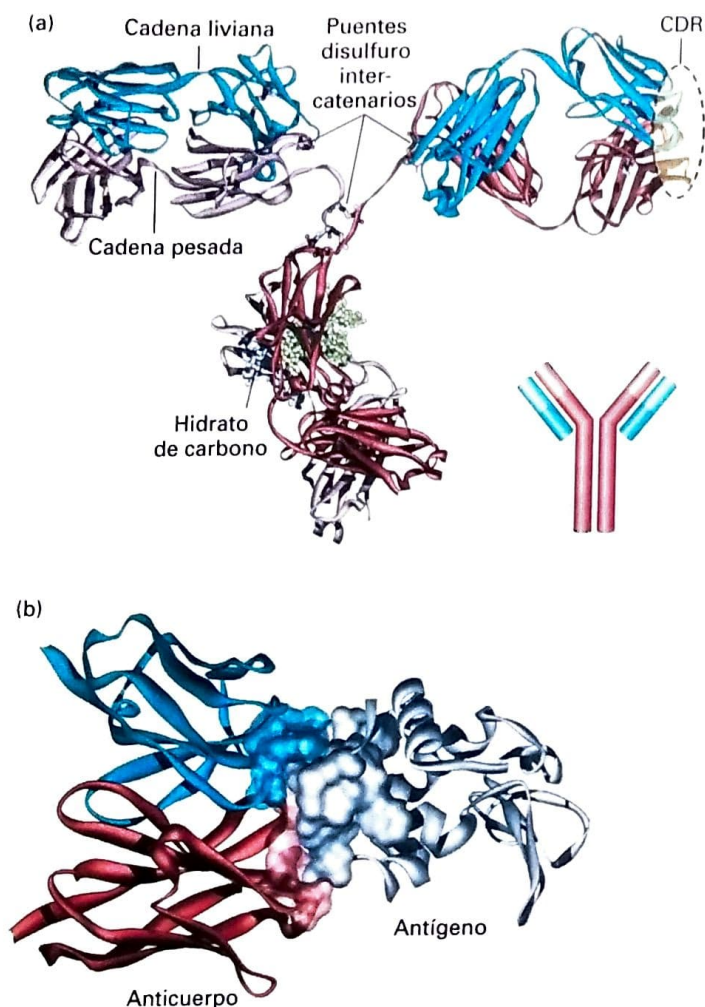


FIGURA 3-19 Unión proteína-ligando de los anticuerpos. (a) Modelo de cinta de un anticuerpo. Cada molécula de anticuerpo de la inmunoglobulina clase IgG consiste en dos cadenas pesadas idénticas (rojo claro y rojo oscuro) y dos cadenas livianas idénticas (azul) unidas covalentemente por puentes disulfuro. El esquema muestra un diagrama de la estructura general que contiene las dos cadenas ligeras y las dos pesadas. (b) Ajuste de guante-mano entre un anticuerpo y el sitio al cual se une (epitopo) sobre su antígeno diana –en este caso, la lisozima de la clara del huevo–. Las regiones en las que las dos moléculas se contactan se muestran como superficies. El anticuerpo hace contacto con el antígeno con residuos de todas sus regiones determinantes de la complementariedad (CDR). En esta vista, es especialmente aparente la complementariedad molecular del antígeno y del anticuerpo, donde los “dedos” que se extienden desde la superficie del antígeno se enfrentan a los “surcos” de la superficie del anticuerpo.

Las enzimas son catalizadores altamente eficientes y específicos

El subconjunto de proteínas que catalizan las reacciones químicas, la formación y ruptura de enlaces covalentes se llaman **enzimas**, y los ligandos de las enzimas se llaman **sustratos**. Las enzimas constituyen una clase muy grande e importante de proteínas –de hecho, casi toda reacción química de la célula es catalizada por un catalizador específico, habitualmente un enzima–. El RNA es otra forma de macromolécula catalítica de la célula. Estos RNA se llaman **ribozimas** (véase el Cap. 4).

Se han identificado miles de diferentes tipos de enzimas, cada una de las cuales cataliza una reacción química única o un conjunto de reacciones íntimamente relacionadas. Ciertas enzimas se hallan en la mayoría de las células, porque catalizan la síntesis de productos celulares comunes (p. ej., proteínas, ácidos nucleicos y fosfolípidos) o participan en la cosecha energética a partir de los nutrientes (p. ej., por la conversión de glucosa y oxígeno a dióxido de carbono y agua, durante la respiración celular). Otras enzimas solo están presentes en un tipo particular de célula, porque catalizan las reacciones químicas únicas de ese tipo celular (p. ej., las enzimas de las células nerviosas que convierten tirosina a dopamina, un neurotransmisor). Si bien la mayoría de las enzimas se localiza dentro de las células, algunas se secretan y funcionan en sitios extracelulares como la sangre, el aparato digestivo o incluso fuera del organismo (p. ej., las enzimas tóxicas del veneno de las serpientes venenosas).

Como todos los **catalizadores** (véase el Cap. 2), las enzimas aumentan la velocidad de una reacción, sin afectar el grado de ésta, que está determinado por el cambio de energía libre (ΔG) entre los reactantes y los productos, y no cambian en forma permanente como consecuencia de la reacción que catalizan. Las enzimas aumentan la velocidad de reacción al bajar la energía del **estado de transición**, y por lo tanto, la **energía de activación** requerida para alcanzarlo (Fig. 3-20). En el tubo de ensayo, los catalizadores como el carbón y el platino facilitan las reacciones, pero habitualmente solo a altas temperaturas o presiones, a pH extremadamente alto o bajo o en solventes orgánicos. Sin embargo, dentro de las células, las enzimas deben funcionar en forma efectiva en un ambiente acuoso a 37 °C y 1 atmósfera de presión, y a valores de pH fisiológicos, habitualmente 6,5-7,5 aunque en ocasiones más bajo. Notablemente, las enzimas muestran un inmenso poder catalítico-

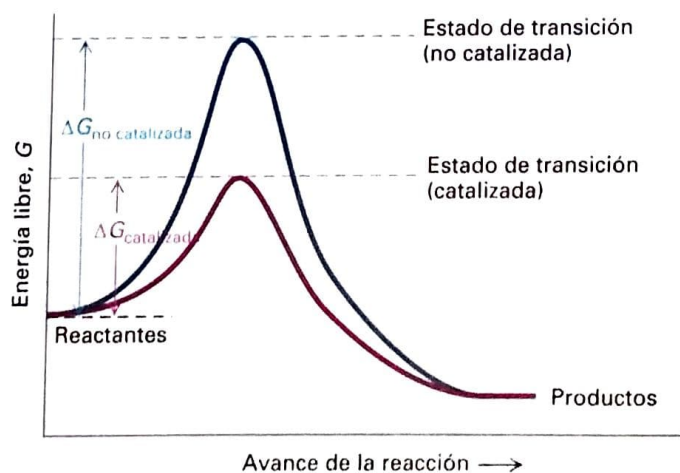


FIGURA 3-20 Efecto de una enzima sobre la energía de activación de una reacción química. Esta vía de reacción hipotética muestra los cambios en la energía libre, G, a medida que avanza la reacción. Una reacción ocurrirá en forma espontánea sólo si la G total de los productos es menor que la de los reactantes (ΔG negativa). Sin embargo, todas las reacciones químicas proceden a través de uno o más estados de transición de alta energía, y la velocidad de una reacción es inversamente proporcional a la energía de activación ($\Delta G^\ddagger$), que es la diferencia de energía libre entre los reactantes y el estado de transición (el punto más elevado a lo largo de la vía). Las enzimas y otros catalizadores aceleran la velocidad de una reacción, reduciendo la energía libre del estado de transición y, de este modo, el $\Delta G^\ddagger$.

co, acelerando las velocidades de reacción 10^6 – 10^{12} veces con respecto a las reacciones no catalizadas correspondientes en condiciones por lo demás similares.

Un sitio activo de la enzima se une al sustrato y efectúa la catálisis

Ciertos aminoácidos de una enzima son particularmente importantes para determinar su especificidad y poder catalítico. En la conformación nativa de una enzima, los aminoácidos críticamente importantes (que habitualmente provienen de diferentes partes de la secuencia lineal del polipéptido), se mantienen cercanos formando un surco en la superficie llamado el sitio activo (Fig. 3-21). Un **sitio activo** habitualmente constituye solo una pequeña parte del total de la proteína, y la parte restante está implicada en el plegamiento del polipéptido, la regulación del sitio activo y las interacciones con otras moléculas.

Un sitio activo tiene dos regiones funcionalmente importantes: el *sitio de unión al sustrato*, que reconoce y se une al sustrato o a los sustratos, y el *sitio catalítico* que lleva a cabo la reacción química una vez que el sustrato se ha unido. Los grupos catalíticos del sitio catalítico son cadenas laterales de los aminoácidos y los grupos carbonilo y amino del esqueleto. En algunas enzimas se superponen los sitios catalítico y de unión al sustrato; en otras, las dos regiones son estructuralmente distintas.

El sitio de unión al sustrato es el responsable de la notable especificidad de las enzimas—su capacidad de actuar en forma selectiva sobre un sustrato o sobre un pequeño número de sustratos químicamente relacionados—. La alteración de la estructura de un sustrato de una enzima en solo uno o unos pocos átomos, o un cambio sutil en la geometría, por ejemplo estereoquímico del sustrato, pueden resultar en una molécula variante que ya no sea sustrato de la enzima. Como ocurre con la especificidad de los anticuerpos por los antígenos, descrita previamente, la especificidad de las enzimas por los sustratos es consecuencia de la precisa complementariedad molecular entre el sitio de unión al sustrato y éste. Habitualmente solo uno o unos pocos sustratos pueden encajar con precisión en un sitio de unión.

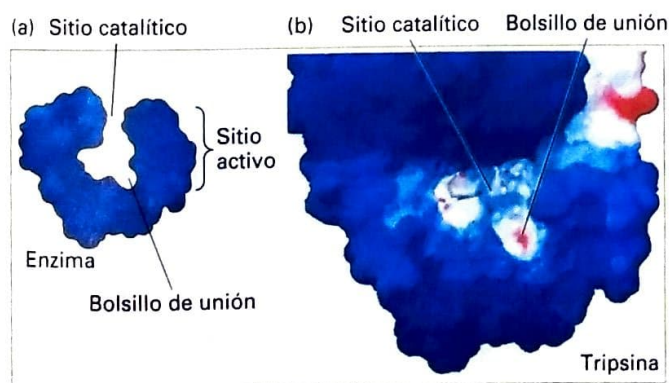


FIGURA 3-21 Sitio activo de la enzima tripsina. (a) Un sitio activo de una enzima está compuesto por un bolsillo de unión donde une específicamente un sustrato y un sitio catalítico, donde lleva a cabo la catálisis. (b) Una representación de la superficie de la proteasa de la serina tripsina. Las grietas del sitio activo que contienen el sitio catalítico (las cadenas laterales de la tríada catalítica Ser-195, Asp-102 y His-57 que se muestran como figuras pegadas) y la especificidad de la cadena lateral del sustrato del bolsillo de unión pueden verse con claridad. (La parte [b] es cortesía de P. Teesdale-Spittell.)

La idea de que los sustratos deben unirse a las enzimas del modo en que una llave encaja en una cerradura fue sugerida por primera vez por Emil Fischer en 1894. En 1913, Leonor Michaelis y Maud Leonora Menten proporcionaron evidencia crucial en apoyo de esta hipótesis. Mostraron que la velocidad de una reacción enzimática era proporcional a la concentración del sustrato a bajas concentraciones del sustrato, pero a medida que la concentración de éste aumentaba, la reacción alcanzaba una **velocidad máxima** ($V_{\max}$) y se independizaba de la concentración del sustrato, puesto que el valor de $V_{\max}$ era directamente proporcional a la cantidad de enzima presente en la mezcla de reacción (Fig. 3-22).

Dedujeron que esta saturación a alta concentración de sustrato se debía a la unión de las moléculas de sustrato (S) a un número fijo y limitado de sitios en las enzimas (E), y llamaron a las especies unidas

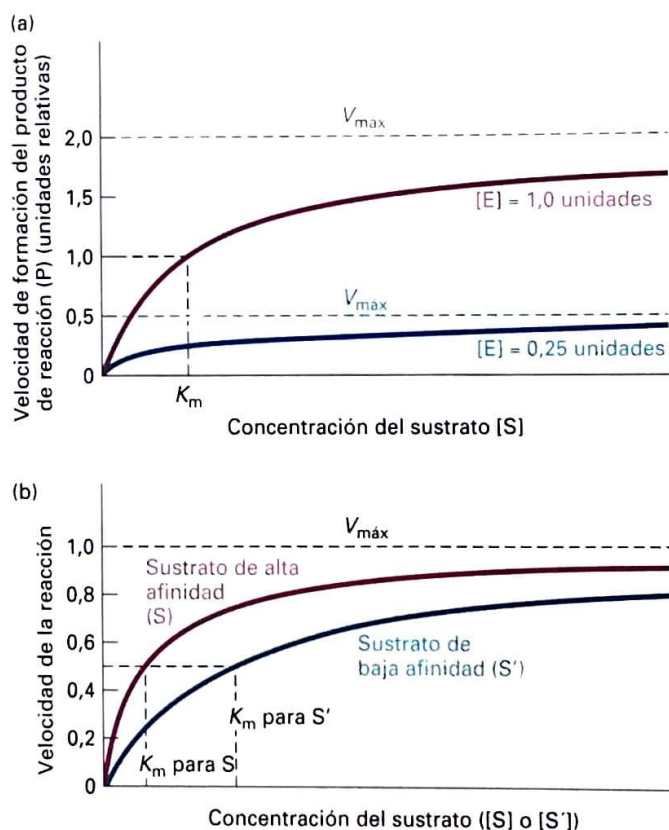


FIGURA 3-22 K_m y $V_{\max}$ para una reacción catalizada por enzimas. La K_m y la $V_{\max}$ se determinan a partir del análisis de la dependencia de la velocidad de reacción inicial con la concentración del sustrato. La forma de estas curvas cinéticas hipotéticas es característica de una reacción simple catalizada por enzima en la cual un sustrato (S) se convierte a un producto (P). La velocidad inicial se mide inmediatamente después de la adición de la enzima al sustrato, antes que la concentración de este cambie de modo apreciable. (a) Gráficas de la velocidad inicial a dos concentraciones diferentes de la enzima [E] como función de la concentración del sustrato [S]. La [S] que resulta en una velocidad de reacción semimáxima es la constante de Michaelis, K_m , una medida de la afinidad de E para transformar S a P. Cuadruplicar la concentración de la enzima genera un incremento proporcional en la velocidad de la reacción y, por lo tanto, la $V_{\max}$ se cuadruplica; sin embargo, la K_m no se altera. (b) Gráficas de la velocidad inicial versus la concentración del sustrato con un sustrato S para el cual la enzima tiene una alta afinidad y con un sustrato S' para el cual la enzima tiene una baja afinidad. Nótese que la $V_{\max}$ es la misma con ambos sustratos porque [E] es la misma, pero la K_m es más alta para S', el sustrato de baja afinidad.

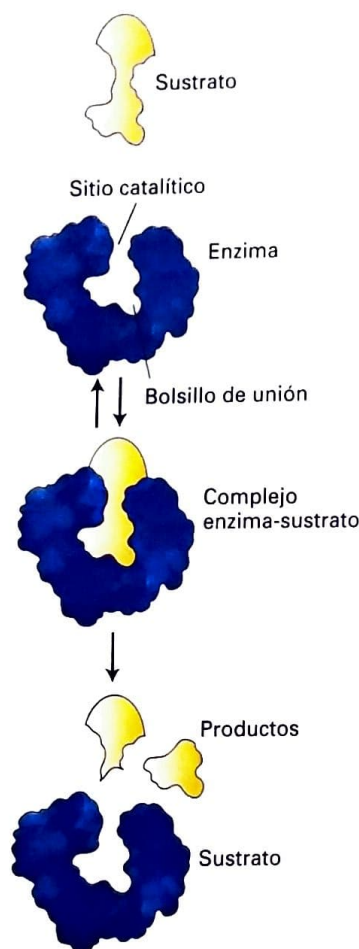
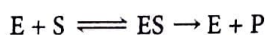


FIGURA 3-23 Modelo esquemático del mecanismo de reacción de una enzima. La cinética enzimática sugiere que las enzimas (E) se unen a las moléculas de sustrato (S) a través de un número fijo y limitado de sitios en las enzimas (los sitios activos). La especie unida se conoce como complejo enzima-sustrato (ES). El complejo ES está en equilibrio con la enzima no unida y el sustrato y es un paso intermedio en la conversión del sustrato al producto (P).

el complejo enzima-sustrato (ES). Propusieron que el complejo ES está en equilibrio con la enzima no unida y el sustrato y es un paso intermedio en la conversión finalmente irreversible del sustrato al producto (P) (Fig. 3-23):



y que la velocidad V_0 de formación del producto a una concentración dada de sustrato [S] está dada por lo que ahora se conoce como la ecuación de Michaelis-Menten:

$$V_0 = V_{\max} \frac{[S]}{[S] + K_m} \quad (3-1)$$

en la que la constante de Michaelis, K_m , una medida de la afinidad de una enzima por su sustrato, es la concentración del sustrato a la que se logra una velocidad de reacción semimáxima (es decir, $1/2 V_{\max}$ en Fig. 3-22). La K_m , de algún modo, tiene naturaleza similar, aunque no idéntica, a la constante de disociación K_d (véase el Cap. 2). Cuanto más pequeño sea el valor de K_m , más efectiva será la enzima en la síntesis de un producto a partir de soluciones diluidas de un sustrato y menor será la concentración de sustrato necesaria para alcanzar la velocidad semimáxima. Cuanto más pequeña sea la K_d , menor será la concentración de ligando necesaria para alcanzar el 50% de la unión. La concentración de las diferentes moléculas pequeñas de una célula varía ampliamente igual que los valores K_m para las diferentes enzimas que actúan en ellas. Una buena regla general es recordar que la concentración intracelular de un sustrato es aproximadamente la misma o ligeramente superior al valor de K_m de la enzima a la cual se une.

Las velocidades de reacción, a saturación del sustrato, varían enormemente entre las enzimas. El número máximo de moléculas de sustrato convertidas a producto en un sitio activo único de una enzima por segundo se llama *número de recambio*, que puede ser menor de 1 para las enzimas muy lentas. El número de recambio para la anhidrasa carbónica, una de las enzimas más rápidas, es 6×10^5 moléculas/s.

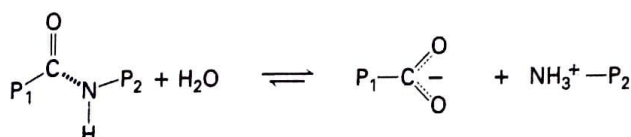
Muchas enzimas catalizan la conversión de sustratos a productos dividiendo el proceso en reacciones químicas múltiples individuales que implican complejos enzima sustratos múltiples distintos (ES, ES', ES'', etc.) generados antes de la liberación final de los productos:



Los perfiles energéticos de estas reacciones de múltiples pasos implican múltiples colinas y valles (Fig. 3-24) y se han desarrollado métodos para atrapar a los intermediarios de tales reacciones, con el fin de aprender más acerca de los detalles de cómo las enzimas catalizan reacciones.

Las proteasas de serina demuestran cómo opera el sitio activo de una enzima

Las proteasas de serina, una familia grande de enzimas que escinden proteínas, o enzimas proteolíticas, se usan en todo el mundo biológico para digerir alimentos (las enzimas pancreáticas tripsina, quimotripsina y elastasa), para controlar la coagulación sanguínea (la enzima trombina) e incluso para ayudar a los gusanos de seda a abrirse paso fuera de sus capullos (serrapeptasa). Este tipo de enzimas es útil para ilustrar el modo en que un sitio de unión enzima-sustrato y un sitio catalítico cooperan en reacciones de múltiples pasos para convertir los sustratos en productos. Aquí consideraremos de qué manera la tripsina y sus dos proteasas pancreáticas muy relacionadas evolutivamente, la quimotripsina y la elastasa, catalizan la ruptura de un enlace peptídico:



donde, en el sustrato polipeptídico, P_1 es parte de la proteína en el extremo N-terminal del enlace peptídico y P_2 es la porción hacia el extremo C-terminal. Consideramos en primer término el modo en que las

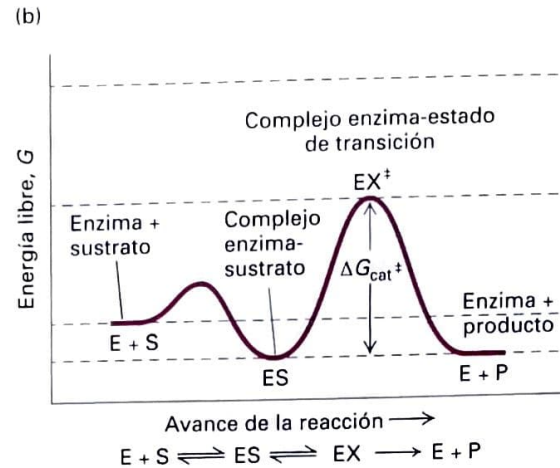
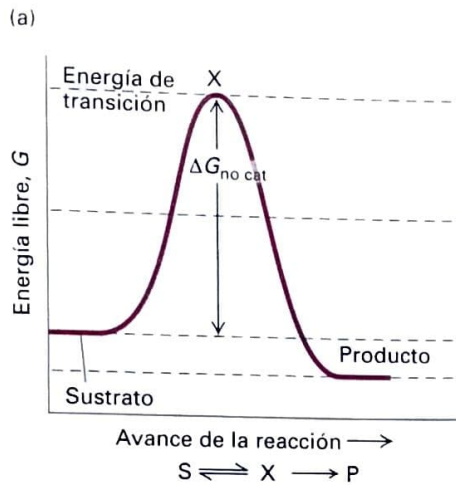
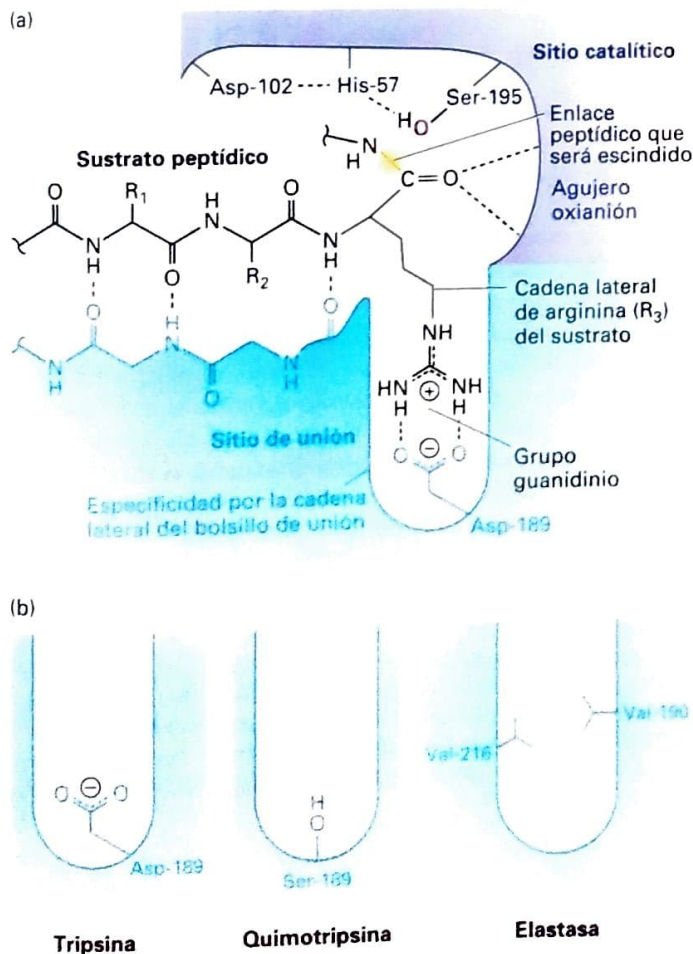


FIGURA 3-24 Perfiles de reacción de energía libre de reacciones no catalizadas y catalizadas por enzimas en múltiples pasos. (a) Perfil de reacción de energía libre de una reacción hipotética simple no catalizada que convierte el sustrato (S) al producto (P) por medio de un estado de transición de alta energía único. (b) Muchas enzimas catalizan reacciones de este tipo dividiendo el proceso en múltiples pasos diferentes, en este caso, la formación

de un complejo PS seguido de la conversión mediante un estado de transición único ($EX^\ddagger$) a la enzima libre (E) y P. La energía de activación para cada uno de estos pasos es significativamente menos que la energía de activación para la energía no catalizada, así, la enzima aumenta en forma notable la velocidad de la reacción.

proteasas de la serina se unen específicamente a sus sustratos y luego mostramos en detalle el modo en que funciona la catálisis.



La Figura 3-25a muestra cómo el polipéptido sustrato se une al sitio de unión al sustrato, en el sitio activo de la tripsina. Hay dos interacciones de unión clave. El sustrato (esqueleto de polipéptido en negro) y la enzima (esqueleto de polipéptido en azul) forman puentes de hidrógeno que se asemejan a una hoja β . En segundo término, una cadena lateral clave del sustrato, que determina qué péptido de éste será escindido, se extiende dentro del *bolsillo de unión con especificidad por la cadena lateral*, en cuya parte inferior reside la cadena lateral con carga negativa del Asp-189 de la enzima. La tripsina tiene una notable preferencia por hidrolizar sustratos en el lado carboxílico ($C=O$) de un aminoácido, con una cadena lateral larga con carga positiva (arginina o lisina) porque la cadena lateral se estabiliza en el bolsillo de unión específico de la enzima, por acción del Asp-189 de carga negativa.

Ligeras diferencias en las estructuras de bolsillos, con especificidad por lo demás similar, permiten explicar las diferentes especificidades por los sustratos de dos proteasas de serina relacionadas: la quimotripsina prefiere los grupos aromáticos grandes (como en Fen, Tir, Trp) y la elastasa prefiere las cadenas laterales cortas de Gli y Ala (Fig. 3-25b).

FIGURA 3-25 Unión del sustrato en el sitio activo de las proteasas de serina del tipo de la tripsina. (a) El sitio activo de la tripsina (molécula purpura y azul) con un sustrato unido (molécula en negro). El sustrato forma una hoja β de dos hebras con el sitio de unión y la cadena lateral de una arginina (R_3) del sustrato, en el bolsillo de unión con especificidad por la cadena lateral. Su grupo guanidinio cargado positivamente se estabiliza con la carga negativa de la Asp-189 de la cadena lateral de la enzima. Esta unión alinea el enlace peptídico de la arginina adecuadamente para la hidrólisis catalizada por la triada catalítica del sitio activo de la enzima (las cadenas laterales de la Ser-195, His-57 y Asp-102). (b) Los aminoácidos que se encuentran dentro del bolsillo de unión específico de la cadena lateral determinan su forma y carga y así, sus propiedades de unión. La tripsina acomoda la quimotripsina, las cadenas laterales cargadas positivamente de la arginina y de la lisina; las cadenas laterales hidrofóbicas grandes tales como la fenilalanina y la de la elastasa, las cadenas laterales pequeñas como la glicina y la alanina. (Parte (a) modificada de J. J. Perona y C. S. Craik, 1994, *J. Biol. Chem.* **272**, 48120-48127, 2000).

La Ser-189 neutra de la quimotripsina permite que las cadenas laterales hidrofóbicas, no cargadas, grandes, se unan en forma estable al bolsillo. La especificidad de la elastasa se ve influenciada por el reemplazo de glicinas en los costados del bolsillo de la tripsina, con las cadenas alifáticas laterales ramificadas de las valinas (Val-216 y Val-190) que obstruyen el bolsillo (Fig. 3-25b). En consecuencia, las grandes cadenas laterales en los sustratos no pueden encajar en el bolsillo de la elastasa, mientras que los sustratos con cadenas laterales cortas, como alanina o glicina en esta posición, pueden unirse bien y ser objeto de roturas posteriores.

En el sitio catalítico, las tres enzimas emplean el grupo hidroxilo de la cadena lateral de una serina en posición 195 para catalizar la hidrólisis de los enlaces peptídicos en los sustratos proteicos. Una tríada catalítica formada por las tres cadenas laterales de Ser-195, His-57 y Asp-102 participa en lo que es esencialmente una hidrólisis de dos pasos. La Figura 3-26 muestra la manera en que la tríada catalítica coopera para la rotura del enlace peptídico, con la Asp-102 y la His-57 sosteniendo el ataque del

oxígeno del hidroxilo de la Ser-195 en el carbono del carbonilo del sustrato. Este ataque inicialmente genera un estado de transición inestable, con cuatro grupos unidos a este carbono (intermediario tetraédrico). La rotura del enlace peptídico C—N libera luego una parte de la proteína-sustrato ($\text{NH}_2\text{—P}_2$), mientras que la otra parte permanece unida covalentemente a la enzima mediante un enlace éster unido al oxígeno de la serina, formando un intermediario acilo relativamente estable. El reemplazo posterior de este oxígeno por uno procedente del agua, en una reacción que involucra a otro intermediario tetraédrico inestable, lleva a la liberación del producto final ($\text{P}_1\text{—COOH}$). Los estados de transición intermedios tetraédricos se estabilizan parcialmente por la formación de puentes de hidrógeno entre los grupos amino del esqueleto de la enzima, en lo que se llama un *agujero oxianión*. La gran familia de las proteasas de serina y enzimas relacionadas con una serina en el sitio activo ilustra cómo un mecanismo de reacción eficiente se emplea reiteradamente en diferentes enzimas para catalizar reacciones similares.

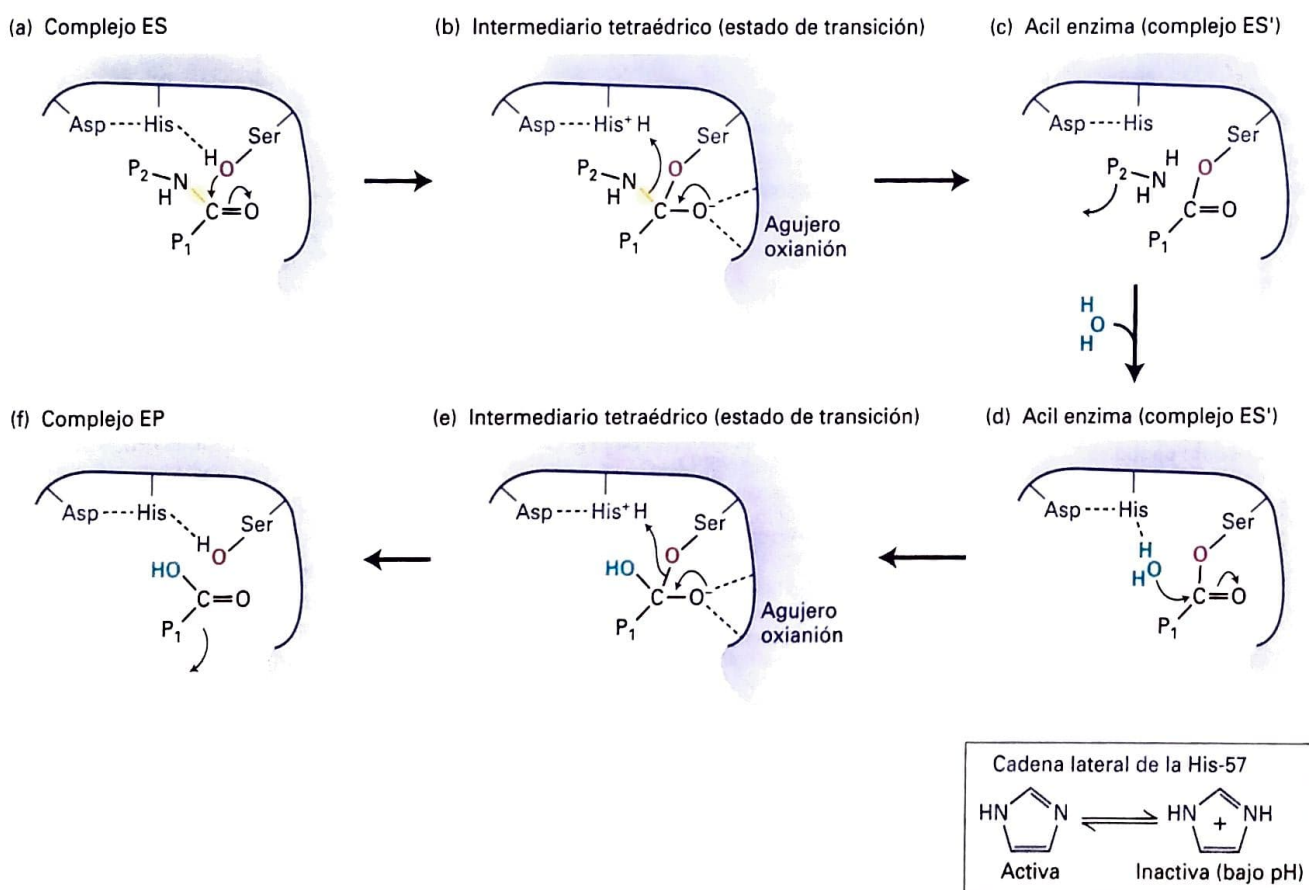


FIGURA 3-26 Mecanismos de la hidrólisis de enlaces peptídicos mediado por proteasas de serina. La tríada catalítica de Ser-195, His-57 y Asp-102 en los sitios activos de las proteasas de serina emplea un mecanismo de múltiples pasos para hidrolizar los enlaces peptídicos de las proteínas diana. (a) Después de que un sustrato polipeptídico se une al sitio activo (véase la Fig. 3-25) formando un complejo ES, el oxígeno del hidroxilo de la Ser-195 ataca al carbono del carbonilo del péptido diana del sustrato (amarillo). Los movimientos de los electrones se indican con flechas. (b) Este ataque resulta en la formación de un estado de transición llamado *intermediario tetraédrico*, en el cual la carga negativa del oxígeno del sustrato se estabiliza mediante los puentes de hidrógeno formados con el *agujero oxianión* de la enzima. (c) Los movimientos adicionales de electrones dan como resultado la ruptura del enlace peptídico,

la liberación de uno de los productos de reacción ($\text{NH}_2\text{—P}_2$) y la formación de la acil enzima (complejo ES'). (d) Luego, un oxígeno de una molécula del agua que actúa como solvente ataca el carbono del carbonilo de la acil enzima. (e) Este ataque resulta en la formación de un segundo intermediario tetraédrico. (f) Movimientos adicionales de electrones resultan en la ruptura del enlace Ser-195-sustrato (formación del complejo EP) y la liberación del producto final de reacción ($\text{P}_1\text{—COOH}$). La cadena lateral de la His-57, que se mantiene en la orientación adecuada mediante puentes de hidrógeno con la cadena lateral de la Asp-102, facilita la catálisis al retirar y donar protones durante toda la reacción (*recuadro*). Si el pH es demasiado bajo y la cadena lateral de la His-57 se protona, no puede participar en la catálisis y la enzima está inactiva.

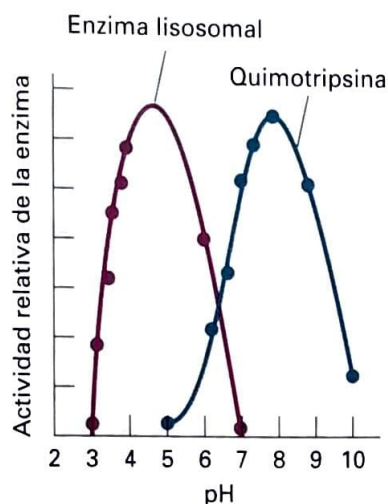


FIGURA 3-27 Dependencia de la actividad enzimática con el pH. Los grupos ionizables (titulables mediante pH) de los sitios activos o de cualquier otro lugar de las enzimas con frecuencia deben protonarse o desprotonarse para permitir que el sustrato adecuado se una u ocurra la catálisis o para permitir que la enzima adopte la conformación correcta. La medición de la actividad enzimática como función del pH puede emplearse para identificar el pK_a . Las proteasas de serina pancreáticas, como la quimotripsina (curva de la derecha), muestran actividad máxima a pH aproximadamente 8 a raíz de la titulación de la His-57 del sitio activo (requerida para la catálisis, $pK_a \sim 6,8$) y del amino terminal de la proteína (requerido para la conformación adecuada, $pK_a \sim 9$). Muchas hidrolasas lisosomales han evolucionado para mostrar un pH óptimo más bajo ($\sim 4,5$, curva de la izquierda) para adecuarse al bajo pH interno de los lisosomas, dentro de los cuales actúan. (Adaptado de P. Lozano, T. De Diego y J. L. Iborra, 1997, *Eur. J. Biochem.* **248**(1):80-85, y W. A. Judice y cols., 2004, *Eur. J. Biochem.* **271**(5):1046-1053.)

Los mecanismos de las proteasas de serina señalan varias características generales clave de la catálisis enzimática: 1) los sitios catalíticos de las enzimas han evolucionado para estabilizar la unión a un estado de transición, bajando de este modo la energía de activación y acelerando la reacción global, 2) las múltiples cadenas laterales junto con el esqueleto polipeptídico cuidadosamente organizados en tres dimensiones, trabajan en conjunto para transformar químicamente sustrato a producto con frecuencia mediante reacciones en múltiples pasos, y 3) la catálisis ácido-base mediada por una o más cadenas laterales de los aminoácidos con frecuencia es empleada por las enzimas, tal como cuando el grupo imidazol de la His-57 de las proteasas de serina actúa como base para remover el hidrógeno de los grupos hidroxilo de la Ser-195. En consecuencia, frecuentemente solo un estado de ionización particular (protonado o no protonado) de una o más cadenas laterales de los aminoácidos del sitio catalítico es compatible con la catálisis y así la actividad enzimática depende del pH.

Por ejemplo, el imidazol de la His-57 de las proteasas de la serina, cuyo pK_a es $\sim$ pH 6,8, puede ayudar al ataque hidroxílico del sustrato por la Ser-195 solo si no está protonado. Así, la actividad de la proteasa es baja a pH menor de 6,8 y la forma del perfil de la actividad de pH en el espectro de pH de 4-8 coincide con la titulación de la cadena lateral de la His-57, que está regida por la ecuación de Henderson-Hasselbalch, con una inflexión cerca de 6,8 (véanse los datos de la quimotripsina en la Fig. 3-27 y en el Cap. 2). La actividad cae a valores de pH más altos, generando una curva de campana, porque el plegamiento adecuado de

la proteína se interrumpe cuando el grupo amino del extremo amino terminal de la proteína ($pK_a \sim 9,0$) se desprotona; la conformación cerca del sitio activo cambia en consecuencia.

La sensibilidad al pH de la actividad de una enzima puede deberse a los cambios en la ionización de los grupos catalíticos, que participan directamente de la unión al sustrato o grupos que influyen en la conformación de la proteína. Las proteasas pancreáticas evolucionaron para operar en las condiciones de neutralidad o ligeramente básicas de los intestinos; así, sus pH óptimos son ~ 8 . Las proteasas y otras enzimas hidrolíticas que funcionan en condiciones ácidas deben emplear un mecanismo catalítico diferente. Tal es el caso de las enzimas del estómago (pH ~ 1) como la proteasa pepsina o aquellas que se encuentran dentro de los lisosomas (pH $\sim 4,5$), que desempeñan un papel clave en la degradación de las macromoléculas dentro de las células (véanse los datos de las enzimas lisosomales en la Fig. 3-27). En realidad, las hidrolasas lisosomales que degradan una gran variedad de biomoléculas (proteínas, lípidos, etc.) son relativamente inactivas al pH del citosol (~ 7), lo cual ayuda a proteger la célula de autodigerirse, si estas enzimas se escapan de los confines del lisosoma, limitado por una membrana.

Una característica clave de la catálisis enzimática que no se ve en las proteasas de serina, pero se encuentra en muchas otras enzimas, es la presencia de un *cofactor* o *grupo prostético*. Este grupo “cooperador” es una pequeña molécula no polipeptídica o un ion (p. ej., hierro, cinc, cobre, manganeso) que se une al sitio activo y desempeña un papel fundamental en el mecanismo de reacción. Los pequeños grupos prostéticos orgánicos de las enzimas también se llaman *coenzimas*. Parte de éstos se modifican químicamente durante la reacción y así necesitan reemplazarse o regenerarse después de cada reacción; otros no lo requieren. Ejemplos de ellos incluyen al NAD⁺ (nicotinamida adenina dinucleótido), el FAD (flavina adenina dinucleótido) (véase la Fig. 2-33) y los grupos hemo que unen oxígeno en la hemoglobina o transfieren electrones en algunos citocromos (véase la Fig. 12-14). Así, las reacciones químicas catalizadas por enzimas no están restringidas por el número limitado de tipos de aminoácidos presentes en las cadenas polipeptídicas. Muchas vitaminas –por ejemplo las vitaminas del complejo B, tiamina (B₁), riboflavina (B₂) y piridoxina (B₆), y la vitamina C– que no pueden ser sintetizadas por las células de mamífero funcionan como coenzimas o son empleadas para generarlas. Esa es la razón por la que las vitaminas deben adicionarse al medio líquido en el cual se hacen crecer las células en el laboratorio (véase el Cap. 9).

Las pequeñas moléculas que pueden unirse a los sitios activos e impedir las reacciones catalíticas se llaman *inhibidores enzimáticos*. Estos inhibidores son herramientas útiles para estudiar los papeles de las enzimas, tanto en las células como en los organismos completos. Los inhibidores que se unen directamente a los sitios de unión de las enzimas y de este modo compiten en forma directa con la capacidad normal de los sustratos para unirse, se llaman inhibidores competitivos. Alternativamente, los que interfieren con la actividad enzimática de otro modo, por ejemplo, uniéndose a algún otro sitio de la enzima y cambiando su conformación, se llaman no competitivos. Los inhibidores complementan el uso de mutaciones en los genes y una técnica llamada interferencia del RNA (iRNA) para poner a prueba la función de una enzima dentro de las células (véase el Cap. 5). Los tres enfoques se pueden usar para estudiar las funciones de macromoléculas no enzimáticas. Sin embargo, la interpretación de los resultados de los estudios con inhibidores puede ser compleja, cuando, como suele ocurrir, los inhibidores bloquean más de una proteína.



La inhibición de la actividad de las proteínas por pequeñas moléculas es la base de acción de la mayoría de los fármacos y de los agentes de la guerra biológica. La aspirina inhibe a las enzimas llamadas ciclooxigenasas, cuyos productos pueden provocar dolor. El sarin y otros gases que actúan sobre los nervios reaccionan contra los grupos hidroxilo de las serinas activas, tanto de las proteasas de serina como de la enzima relacionada, esterasa de acetilcolina, que es una enzima central en la regulación de la conducción nerviosa (véase el Cap. 22). ■

Las enzimas de una vía común con frecuencia están físicamente asociadas entre sí

Las enzimas que participan en un proceso metabólico común (p. ej., la degradación de la glucosa a piruvato durante la glucólisis, véase el Cap. 12) generalmente se localizan en el mismo compartimento celular, el citosol, en una membrana o dentro de un orgánulo en particular. Dentro de este compartimento, los productos de una reacción pueden difundir a la enzima siguiente de la vía. Sin embargo, la difusión implica movimiento al azar y puede ser un proceso relativamente lento e ineficiente para mover moléculas entre las enzimas (Fig. 3-28a). Para superar este impedimento, las células han desarrollado mecanismos para mantener a las enzimas de una misma vía próximas entre sí, en un proceso llamado acoplamiento metabólico.

En el mecanismo más simple de este tipo, los polipéptidos con diferentes actividades catalíticas se agrupan unos cerca de otros, como

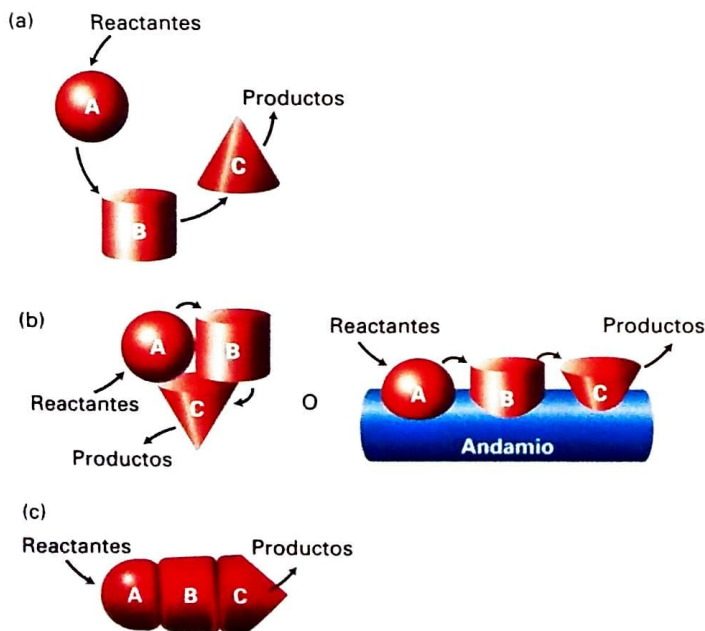


FIGURA 3-28 Ensamblaje de las enzimas en complejos multienzimáticos eficientes. En las vías de reacción hipotéticas que se ilustran aquí, los reactantes iniciales se convierten a productos finales por la acción secuencial de tres enzimas: A, B y C. (a) Cuando las enzimas están libres en solución, o aún se encuentran restringidas dentro del mismo compartimento celular, los intermediarios de la secuencia de reacción deben difundir de una enzima a la siguiente, un proceso inherentemente lento. (b) La difusión está reducida, o en gran medida se elimina, cuando las enzimas individuales se asocian en complejos de múltiples subunidades, ya sea por sí mismas o con la ayuda de una proteína andamio. (c) La integración más cercana de diferentes actividades catalíticas ocurre cuando las enzimas se fusionan a nivel genético, transformándose en dominios genéticos de una única cadena polipeptídica.

subunidades de una proteína multimérica, o se ensamblan en un “andamio” común, que los mantiene unidos (Fig. 3-28b). Esta estructura permite que los productos de una reacción sean canalizados directamente a la siguiente enzima de la vía. En algunos casos, proteínas independientes se han fusionado en los genes para crear una enzima única multidominio, multifuncional, como se describió con anterioridad en este capítulo.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 3.3

Unión de las proteínas y catálisis enzimática

- La función de una proteína depende de su habilidad de unirse a otras moléculas, conocidas como ligandos. Por ejemplo, los anticuerpos se unen a un grupo de ligandos conocidos como antígenos, y las enzimas se unen a reactantes llamados sustratos, que se convertirán en productos mediante reacciones químicas.
- La especificidad de una proteína por un ligando en particular se refiere a una unión preferencial de uno o de unos pocos ligandos muy relacionados. La afinidad de una proteína por un ligando en particular se refiere a la fuerza de la unión, habitualmente expresada por la constante de disociación K_d .
- Las proteínas son capaces de unirse a ligandos por la complementariedad molecular entre los sitios de unión al ligando y los ligandos correspondientes.
- Las enzimas son proteínas catalíticas que aceleran la velocidad de las reacciones celulares, bajando la energía de activación y estabilizando los intermediarios del estado de transición (véase la Fig. 3-20).
- Un sitio activo de una enzima que habitualmente es sólo una pequeña parte de la proteína, comprende dos partes funcionales: un sitio que se une al sustrato y un sitio catalítico. El sitio que se une al sustrato es responsable de la exquisita especificidad de las enzimas, debido a su complementariedad molecular con el sustrato y el estado de transición.
- La unión inicial de los sustratos (S) a las enzimas (E) resulta en la formación de un complejo enzima-sustrato (ES), que luego atraviesa una o más reacciones catalizadas por los grupos catalíticos presentes en el sitio activo hasta que se forman los productos (P).
- De las curvas en las que se representa la velocidad de reacción versus concentración del sustrato, pueden determinarse dos parámetros característicos de una enzima: la constante de Michaelis, K_m , una medida aproximada de la afinidad de la enzima para convertir el sustrato en producto, y la velocidad máxima V_{max} , una medida de su potencia catalítica (Fig. 3-22).
- Las velocidades de las reacciones catalizadas por las enzimas varían enormemente, y los números de recambio (el número de moléculas de sustrato que se convierten a productos en un único sitio activo, a saturación del sustrato) van de < 1 a 6×10^5 moléculas/s.
- Muchas enzimas catalizan la conversión de los sustratos a los productos dividiendo el proceso en múltiples reacciones químicas individuales, que implican múltiples complejos enzima-sustrato distintos (ES', ES'', etc.).

- Las proteasas de serina hidrolizan los enlaces peptídicos en los sustratos proteicos empleando las cadenas laterales de Ser-195, His-57 y Asp-102 como grupos catalíticos. Los aminoácidos de los cuales depende la especificidad en el bolsillo de unión del sitio de unión de las proteasas de serina son los que determinan qué residuo en el sustrato de la proteína es aquel cuyo enlace peptídico será hidrolizado y dan cuenta de las diferencias en la especificidad de la tripsina, la quimotripsina y la elastasa.

- Con frecuencia, las enzimas, emplean la catálisis ácido-base mediada por las cadenas laterales de uno o más aminoácidos, tales como los grupos imidazol en la His-57 de las proteasas de serina, para catalizar las reacciones. La dependencia del pH de la protonación de los grupos catalíticos (pK_a), con frecuencia se refleja en el perfil de tasa de pH de la actividad enzimática.

- En algunas enzimas, pequeñas moléculas no polipeptídicas o iones, llamadas *cofactores* o *grupos prostéticos*, pueden unirse al sitio activo y desempeñar un papel esencial en la catálisis enzimática. Los pequeños grupos prostéticos orgánicos presentes en las enzimas también son llamados *coenzimas*; las vitaminas que no pueden ser sintetizadas por las células de los animales superiores, funcionan como *coenzimas* o se emplean para generarlas.

- Las enzimas de una vía común se localizan dentro de compartimentos celulares específicos y pueden además estar asociadas como dominios de una proteína monomérica, subunidades de una proteína multimérica o componentes de una proteína compleja ensamblados en un andamiazo común (véase la Fig. 3-28).

3.4 Regulación de la función de las proteínas

La mayoría de los procesos celulares no son independientes entre sí ni ocurren a una velocidad constante. Las actividades de todas las proteínas y biomoléculas están reguladas para integrar sus funciones para el óptimo desempeño para la supervivencia. Por ejemplo, la actividad catalítica de las enzimas está regulada de modo tal que la cantidad de producto de reacción es la suficiente para satisfacer los requerimientos de la célula. Como resultado de ello, las concentraciones de los sustratos y los productos en el estado estacionario variarán dependiendo de las condiciones celulares. La regulación de las proteínas no enzimáticas –la apertura o cierre de los canales de la membrana o el ensamblaje de un complejo macromolecular, por ejemplo– también es esencial.

En general, hay tres formas de regular la actividad enzimática. En primer lugar, las células pueden aumentar o disminuir el nivel de una proteína en el estado estacionario al alterar su velocidad de síntesis, su velocidad de degradación, o ambas. En segundo término, las células pueden cambiar la actividad intrínseca, de un modo independiente de la cantidad de la proteína. Por medio de interacciones covalentes y no covalentes, pueden cambiar la afinidad por la unión al sustrato o el tiempo en que la proteína se encuentra en la conformación activa por oposición a la forma inactiva. En tercer lugar, puede haber un cambio en la localización o la concentración de la proteína dentro de la célula, de la diana de la actividad proteica (p. ej., un sustrato enzimático) o de alguna otra molécula requerida para la actividad de la

proteína (p. ej., un cofactor enzimático). Los tres tipos de regulación desempeñan papeles y funciones esenciales en las células vivas. En esta sección analizaremos primero los mecanismos para la regulación de la cantidad de una proteína y luego pasaremos a las interacciones covalentes y no covalentes que regulan la actividad de la proteína.

La síntesis y degradación regulada de las proteínas es una propiedad fundamental de las células

La velocidad de síntesis de las proteínas está determinada por la velocidad a la cual el DNA se convierte a mRNA (transcripción), la cantidad de mRNA activo en la célula en el estado estacionario y la velocidad a la cual el mRNA se convierte a proteínas recién sintetizadas (traducción). Estas vías importantes se describen en detalle en el Capítulo 4.

El espectro de vida de las proteínas intracelulares varía desde unos pocos minutos, para las ciclinas de la mitosis, que ayudan a regular el paso a través de la etapa de la división celular de este proceso (véase Cap. 19), hasta toda la vida de un organismo, para las proteínas del cristalino ocular. El espectro vital de una proteína está controlado, principalmente, por la degradación regulada de las proteínas.

Hay dos papeles especialmente importantes para la degradación de las proteínas. En primer lugar, la degradación elimina las proteínas que son potencialmente tóxicas, están inadecuadamente plegadas o ensambladas o están dañadas –lo cual incluye a los productos de los genes mutados y las proteínas dañadas por los metabolitos químicamente activos de las células o el estrés (p. ej., el choque térmico)–. A pesar de la existencia del plegamiento proteico mediado por chaperonas, algunas proteínas recién sintetizadas se degradan rápidamente porque están plegadas de modo incorrecto. Esto puede ocurrir por una falla en la participación de las chaperonas necesarias en el momento adecuado para guiar su plegamiento o por su ensamblaje defectuoso en complejos. La mayoría del resto de las proteínas se degradan con mayor lentitud; la degradación es de alrededor 1-2% por hora, en las células de mamífero. En segundo término, la destrucción controlada de proteínas, por lo demás normales, proporciona un mecanismo poderoso para mantener los niveles adecuados de estas moléculas y de sus actividades y para permitir cambios rápidos de sus niveles y ayudar a las células a responder a las condiciones cambiantes.

Las células eucariontes tienen varias vías para la degradación de las proteínas. Una de las principales es la degradación mediante las enzimas de los lisosomas, que son orgánulos limitados por membrana, cuyo interior ácido ($pH \sim 4,5$) está lleno de enzimas hidrolíticas del huésped. La degradación en el interior de los lisosomas está dirigida principalmente contra los orgánulos envejecidos o dañados de la célula –mediante un proceso conocido como autofagia– (véase el Cap. 14) y hacia las proteínas extracelulares captadas por la célula. Los lisosomas serán analizados extensamente en capítulos posteriores. Aquí nos centraremos en otra vía importante: la degradación de las proteínas en el citoplasma por los proteasomas, que puede constituir hasta el 90% de la degradación proteica en las células de los mamíferos.

El proteasoma es una máquina molecular usada para la degradación de las proteínas

Los **proteasomas** son máquinas macromoleculares muy grandes que se usan para degradar proteínas e influyen muchas funciones celulares

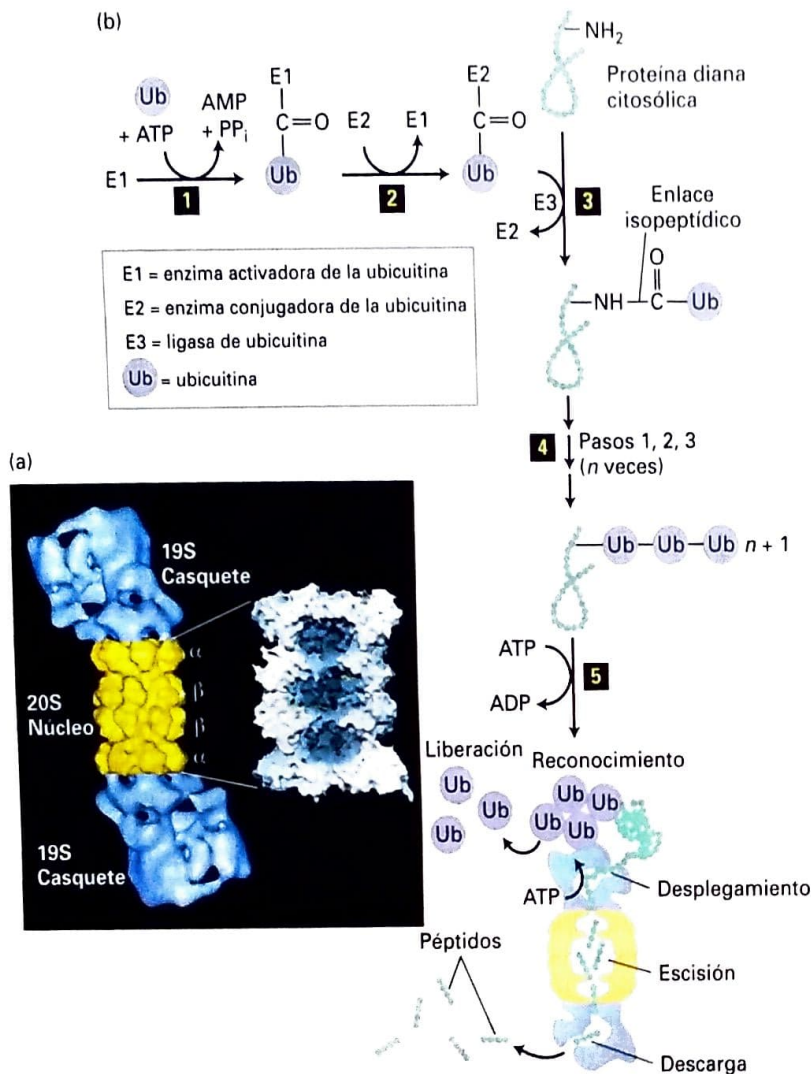


FIGURA 3-29 Proteólisis mediada por ubiquitina y proteasomas. (a) *Izquierda:* el proteosoma 26S tiene una estructura cilíndrica con un casquete 19S (azul) en cada extremo de un núcleo 20S, que consiste en cuatro anillos heptaméricos apilados (~110 Å de diámetro × 160 Å de largo), cada uno de los cuales contiene o bien subunidades α (anillos externos) o bien subunidades β (anillos internos) (amarillo). *Derecha:* corte transversal del núcleo 20S que muestra las cámaras internas. La proteólisis de las proteínas marcadas por la ubiquitina tiene lugar dentro de la cámara interna del núcleo formado por los anillos β. (b) Las proteínas son marcadas para la degradación proteasómica mediante poliubiquitinación. La enzima E1 se activa por la unión de una molécula de ubiquitina (Ub) (paso 1) y luego transfiere su molécula Ub a un residuo de cisteína presente en E2 (paso 2). La ligasa de ubiquitina (E3) transfiere la molécula de Ub presente en la cadena lateral -NH₂ de una lisina de la E2 en una proteína marcada, formando un enlace isopeptídico (paso 3). Se añaden moléculas adicionales de Ub a la proteína marcada, modificada por la Ub por medio de enlaces isopeptídicos a la Ub previamente añadida por repetición de los pasos 1, 3, formando una cadena de poliubiquitina (paso 4). La proteína marcada poliubiquitinada es reconocida por el casquete del proteosoma que emplea desubiquitininas para retirar los grupos Ub y la hidrólisis de ATP para llevar a cabo el desplegamiento y la transferencia de la proteína desdoblada dentro de la cámara de proteólisis de la zona central, a partir de la cual luego se liberan fragmentos de digestión del péptido más corto (paso 5). (Parte [a] de W. Baumeister y cols., 1998, *Cell* **98** 357, cortesía de W. Baumeister y modificada de M. Bochtler y cols., 1999, *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **28** 295-317.)

diferentes, incluidos el ciclo celular (véase el Cap. 19), la transcripción, la reparación del DNA (véase el Cap. 4), la muerte celular programada o **apoptosis** (véase el Cap. 21), el reconocimiento y respuesta a las infecciones por organismos extraños (véase el Cap. 23) y la eliminación de proteínas plegadas de modo incorrecto. En una célula de mamífero típica hay aproximadamente 30 000 proteasomas.

Los proteasomas consisten en ~ 50 subunidades y tienen una masa de 2-2,4 × 10⁶ Da. Tienen una zona central catalítica, en forma de barril, llamada *proteasoma 20S* (en la que S es una unidad Svedberg sobre la base de las propiedades de sedimentación de la partícula y es proporcional a su tamaño), que tiene aproximadamente 14,8 nm de altura y 11,3 nm de diámetro. Unidos a los extremos de este núcleo se encuentran uno o dos complejos llamados casquetes 19S (Fig. 3-29a) que regulan la actividad catalítica de la zona central 20S. Cuando este núcleo 20S y uno de los casquetes, o ambos, se combinan, se conoce como el complejo 26S, si bien el que contiene ambos casquetes tiene tamaño mayor (30S). Un casquete 19S tiene entre 16 y 18 subunidades proteicas, 6 de las cuales pueden hidrolizar ATP (es decir, son ATPa-

sas del tipo AAA) con el fin de proporcionar la energía necesaria para desplegar los sustratos proteicos y transferir selectivamente la energía de ellos a la cámara interna del núcleo catalítico del proteasoma. Los estudios genéticos hechos en levaduras han mostrado que las células no pueden sobrevivir sin proteasomas funcionales, lo que da cuenta de su importancia. Más aún, la actividad adecuada de los proteasomas es de importancia tal que las células gastarían hasta el 30% de la energía necesaria en sintetizar una proteína para degradarla en un proteasoma.

El núcleo catalítico 20S de un proteasoma está formado por dos anillos internos cada uno de los cuales consta de siete subunidades β, con tres sitios activos proteolíticos por anillo, que delimitan la cámara interna de ~ 1,7 nm de diámetro, con forma de barril, y dos anillos externos cada uno con siete subunidades α, que controlan el acceso del sustrato (Fig. 3-29a). Los proteasomas pueden degradar la mayoría de las proteínas por completo, a raíz de que los tres sitios activos en cada anillo de subunidades β pueden separar residuos hidrofóbicos, ácidos o básicos. Los sustratos polipeptídicos deben entrar a la cámara a través de una abertura regulada de ~ 1,3 nm de diámetro, que se encuentra en el cen-

no de los anillos de subunidades α , más externos. En el proteasoma 26S, la apertura de este orificio, que es estrecho y con frecuencia solo permite la entrada de proteínas no plegadas, está controlada por las ATPasas presentes en el casquete 19S, que también participan en la unión y el desdoblamiento selectivo del sustrato (Fig. 3-29b, *abajo a la derecha*). Los productos peptídicos cortos de la digestión proteasómica (2–24 residuos de longitud) salen de la cámara y son adicionalmente degradados con rapidez por las peptidasas lisosomales del citosol, convirtiéndose finalmente en aminoácidos individuales (“libres”). Un investigador ha bromeado diciendo que los proteasomas son las “salas de ejecución celulares” en las cuales las proteínas “mueren por miles de cortes”.



Los inhibidores de la función de los proteasomas pueden emplearse terapéuticamente. Dada la importancia global de los proteasomas para las células, su inhibición completa y permanente provoca la muerte celular. Sin embargo, su inhibición parcial durante intervalos breves se introdujo como un enfoque para la quimioterapia del cáncer. Para sobrevivir y crecer, las células necesitan normalmente la actividad intensa de una proteína reguladora llamada $NF_{\kappa}B$ (véase el Cap. 16) así como de otras proteínas similares “pro supervivencia”. A su vez, la $NF_{\kappa}B$ puede operar completamente y promover la supervivencia solo cuando su inhibidor, el $I_{\kappa}B$, está separado y es degradado por los proteasomas (véase el Cap. 16). La inhibición parcial de la actividad de los proteasomas por una molécula pequeña de un fármaco inhibidor da como resultado el aumento de los niveles de $I_{\kappa}B$ y, en consecuencia, la disminución de la actividad de la $NF_{\kappa}B$ (es decir, la pérdida de su actividad pro supervivencia). En consecuencia, las células mueren por apoptosis. Dado que algunos tipos de células tumorales son más sensibles a la eliminación por los inhibidores de los proteasomas que las células normales, la administración *controlada* de los inhibidores de los proteasomas a niveles que matan las células cancerosas pero no las normales, mostró ser una terapia efectiva para al menos un tipo de cáncer letal, el mieloma múltiple. ■

La ubiquitina marca a las proteínas citosólicas para su degradación en los proteasomas

Si los proteasomas degradan rápidamente solo aquellas proteínas que tienen defectos o están programadas para ser eliminadas, deben poder distinguir entre las proteínas que necesitan degradarse y las que no lo requieren. Las células marcan las proteínas que deberían ser degradadas, uniendo covalentemente a ellas una cadena lineal de múltiples copias de un polipéptido de 76 residuos llamado **ubiquitina**, que está muy conservado desde las levaduras hasta los seres humanos. Esta “cola de poliubiquitina” sirve como un “beso de la muerte” celular que marca a las proteínas para su destrucción en los proteasomas. La adición de ubiquitina (Fig. 3-29b) implica tres pasos distintos:

1. La activación de la *enzima activadora de la ubiquitina (E1)* por la adición de una molécula de ubiquitina, reacción que requiere ATP.
2. La transferencia de esta molécula de ubiquitina a un residuo de cisteína en la *enzima que conjuga ubiquitina (E2)*.
3. La formación de un enlace covalente entre el grupo carboxilo de la glicina C-terminal 76 de la ubiquitina unida a la E2 y el grupo amino de la cadena lateral de un residuo de lisina en la proteína diana, reacción

catalizada por la *ligasa ubiquitina-proteína (E3)*. Este tipo de enlace se llama *enlace isopeptídico* porque une covalentemente un grupo amino de una cadena lateral, más que un grupo amino α , al grupo carboxilo. Las reacciones posteriores de las ligasas unen covalentemente la glicina C-terminal a una ubiquitina adicional por medio de un enlace isopeptídico a la cadena lateral de la lisina 48, de la ubiquitina adicionada previamente, para generar una cadena de poliubiquitina unida en forma covalente a la proteína efectora.

Después de la adición de al menos cuatro ubiquitinas a la cadena de poliubiquitina, el casquete regulador 19S del proteasoma 26S (en ocasiones con la ayuda de proteínas accesorias) reconoce las proteínas marcadas con la poliubiquitina y las despliega y transporta al interior del proteasoma para su degradación (véase la Fig. 3-29b). A medida que el sustrato poliubiquitinado se despliega y pasa a la parte central del proteasoma, enzimas llamadas desubiquitinasas (Dubs) hidrolizan los enlaces entre las ubiquitinas individuales y entre la proteína efectora y la ubiquitina, reciclando las ubiquitinas para ciclos adicionales de modificación de proteínas (véase la Fig. 3-29b). El análisis de las secuencias del genoma humano indica la presencia de ~ 90 Dubs, de los cuales aproximadamente el 80% emplea cisteína en una triada catalítica similar a las proteasas de serina descritas previamente. En algunas Dubs, el cinc es un participante clave de las reacciones catalíticas.

Especificidad de la degradación El marcado de proteínas específicas para la degradación proteasómica se logra principalmente por medio de la especificidad de sustrato de la ligasa E3. Como un testimonio de su importancia, hay más de 600 genes de ligasa de ubiquitina predichos en el genoma humano. Las muchas ligasas E3 de las células de los mamíferos aseguran que pueda modificarse, cuando fuera necesario, la amplia variedad de proteínas que requerirán ser poliubiquitinadas. Algunas ligasas E3 están unidas a chaperonas que reconocen proteínas desplegadas o mal plegadas; por ejemplo, la ligasa E3 CHIP es una co-chaperona para la Hsp70. Estas y otras proteínas (co chaperonas, factores escolta, adaptadores) pueden mediar la poliubiquitinación catalizada por la ligasa E3 de estas proteínas disfuncionales, que no pueden volver a plegarse en forma adecuada rápidamente, y su entrega a los proteasomas para la degradación. En estos casos, el sistema proteasoma-ubiquitinación-chaperona opera concertadamente para el control de calidad de las proteínas.

Además del control de calidad, el sistema proteasoma-ubiquitina puede emplearse para regular la actividad de importantes proteínas celulares. Ejemplo de ello es la degradación regulada de proteínas llamadas **ciclinas**, que controlan el ciclo celular (véase el Cap. 19). Las ciclinas contienen la secuencia interna Arg-X-X-Leu-Gli-X-Ile-Gli-Asp/Asn (X puede ser cualquier aminoácido), reconocida por complejos enzimáticos ubiquitinantes específicos. En un momento específico del ciclo celular, cada ciclina es fosforilada por una ciclina cinasa. Se piensa que esta fosforilación provoca un cambio de conformación que expone la secuencia de reconocimiento a las enzimas ubiquitinantes, lo que conduce a la poliubiquitinación y la degradación proteasómica.

Otras funciones de la ubiquitina y de las moléculas relacionadas con la ubiquitina Hay varios parientes cercanos de la ubiquitina que emplean mecanismos similares dependientes de E1, E2 y E3 para la activación y transferencia a sustratos aceptores. Estas modificaciones

ubiquitinoideos controlan procesos tan diversos como la importación nuclear regulada por el modificador ubiquitinoide Sumo y la autofagia regulada por el regulador ubiquitinoide Atg8/LC3 (véase el Cap. 14). La unión de la ubiquitina a una proteína efectora puede emplearse para propósitos distintos de marcar la proteína para su degradación, como veremos más adelante en este capítulo, y algunos de éstos implican enlaces poliubiquitina distintos de los que se realizan a través de la Lis48.

Tal como ocurre para la adición de ubiquitina, la desubiquitinación está involucrada en un proceso distinto de la degradación de proteínas mediada por proteasomas. Los métodos de espectroscopia de masas basados en la "proteómica" a gran escala que se describen más adelante en este capítulo, junto con enfoques computacionales sofisticados, han sugerido que Dubs, que con frecuencia se unen en complejos multiproteicos, están comprometidos en un espectro extraordinariamente amplio de procesos celulares. Éstos varían desde la división celular y el control del ciclo celular (véase el Cap. 19), al transporte a través de las membranas (véase el Cap. 14) pasando por las vías de señalización celular (véanse los Caps. 15 y 16).

Los enlaces no covalentes permiten la regulación alostérica o cooperativa de las proteínas

Además de regular la cantidad de una proteína, las células también pueden regular la actividad intrínseca de ella. Uno de los mecanismos más importantes para regular la función proteica es mediante las interacciones alostéricas. En el sentido más general, **alosterismo** (del griego "otra forma") se refiere a cualquier cambio de la estructura terciaria o cuaternaria de una proteína, o de ambas, inducido por el enlace no covalente de un ligando. Cuando un ligando se une a un sitio (A) de una proteína e induce a un cambio de conformación y un cambio de actividad asociado de un sitio diferente (B), el ligando se llama *efector alostérico* de la proteína, mientras que el sitio (A) se llama *sitio de unión alostérico* y la proteína se llama *proteína alostérica*. Por definición, las proteínas alostéricas tienen múltiples sitios de unión, al menos uno para el efector alostérico y al menos uno para otras moléculas con las cuales interactúa la proteína. El cambio alostérico de actividad puede ser positivo o negativo; es decir, puede inducir un aumento o una disminución de la actividad de la proteína. **Alosterismo negativo** con frecuencia implica al producto final de una vía bioquímica de múltiples pasos, que se une a una enzima y reduce su actividad, la cual es catalizadora de un paso temprano, controlador de la velocidad para esa vía. De este modo, se evita la síntesis excesiva del producto. Este tipo de regulación de una vía metabólica también se llama *inhibición por producto final* o *inhibición por retroalimentación*. La regulación alostérica es particularmente prevalente en enzimas multiméricas y otras proteínas, en las que los cambios de conformación en una subunidad se transmiten a la subunidad adyacente.

Cooperatividad es un término utilizado con frecuencia como sinónimo de alosterismo, y habitualmente se refiere a la influencia (positiva o negativa) que la unión de un ligando a un sitio tiene sobre la unión a otra molécula del mismo tipo de ligando en un sitio diferente. La hemoglobina representa un ejemplo clásico de unión cooperativa positiva, dado que la unión de un ligando único, el oxígeno molecular (O_2), aumenta la afinidad de la unión de la siguiente molécula de oxígeno. Cada una de las 4 subunidades de la hemoglobina contiene una molécula hemo. Los grupos hemo son los componentes de la hemoglobina que unen oxígeno (véase la Fig. 3-13). La unión del oxígeno a la molécula hemo en una de las 4 subunidades de la hemoglobina induce

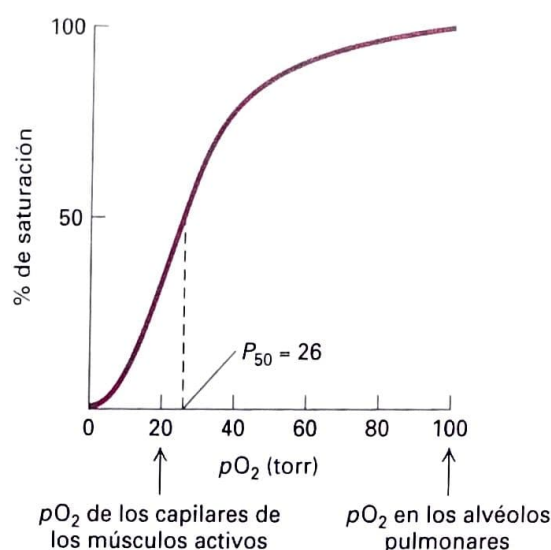


FIGURA EXPERIMENTAL 3-30 La hemoglobina une oxígeno cooperativamente.

Cada proteína de hemoglobina tetramérica tiene cuatro sitios de unión al oxígeno; a saturación, todos los sitios están cargados con oxígeno. La concentración de oxígeno en los tejidos comúnmente se mide como la presión parcial (pO_2). La P_{50} es la pO_2 a la cual se encuentran ocupados la mitad de los sitios de unión de oxígeno, a una concentración de hemoglobina dada; en cierta medida, es análoga a la K_m para una reacción enzimática. El gran cambio en la cantidad de oxígeno unido, en un pequeño espectro de valores de pO_2 , permite la descarga eficiente de oxígeno en los tejidos periféricos tales como el músculo. La forma sigmoidea de una curva de saturación porcentual versus concentración de ligando indica unión cooperativa, en la cual la unión de una molécula de oxígeno influye alostéricamente en la unión de moléculas de oxígeno adicionales. En ausencia de unión cooperativa, la curva de unión es una hipérbola, semejante a las curvas de la Figura 3-22. (Adaptado de L. Stryer, 1995, *Biochemistry*, 4th ed., W. H. Freeman and Company)

un cambio de conformación local, cuyo efecto se disemina a las otras subunidades, bajando la K_d (aumentando la afinidad) para la unión de moléculas de oxígeno adicionales a los hemo remanentes, lo cual da una curva de unión sigmoidea para el oxígeno (Fig. 3-30). Dada la forma sigmoidea de la curva de saturación del oxígeno, solo se requiere un incremento de cuatro veces en la concentración del oxígeno para que la saturación porcentual de los sitios de unión del oxígeno de la hemoglobina cambie de 10 a 90%. Por el contrario, si no hay cooperatividad y la forma de la curva es la típica del tipo Michaelis-Menten, o unión no cooperativa, se requeriría un incremento de 81 veces en la concentración del oxígeno para llevar a cabo el mismo incremento en la carga de sus sitios de unión en la hemoglobina.

Esta cooperatividad permite que la hemoglobina capte oxígeno en forma muy eficiente en los pulmones, donde la concentración de oxígeno es alta, y la descargue en los tejidos donde la concentración es baja. Así, la cooperatividad amplifica la sensibilidad de un sistema a cambios de concentración en su ligando, lo que proporciona, en muchos casos, una ventaja evolutiva selectiva.

La unión no covalente de calcio y el GTP se emplean ampliamente como interruptores alostéricos para controlar la actividad de las proteínas

A diferencia del oxígeno que provoca cambios alostéricos graduales en la actividad de la hemoglobina, algunos otros efectores alostéricos

actúan como interruptores, encendiendo o apagando la actividad de muchas proteínas distintas, al unirse a ellas en forma no covalente. Dos interruptores alostéricos importantes que aparecerán en muchas ocasiones en este libro, especialmente en el contexto de las vías de señalización celular (véanse los Caps. 15 y 16), son el Ca^{2+} y el GTP.

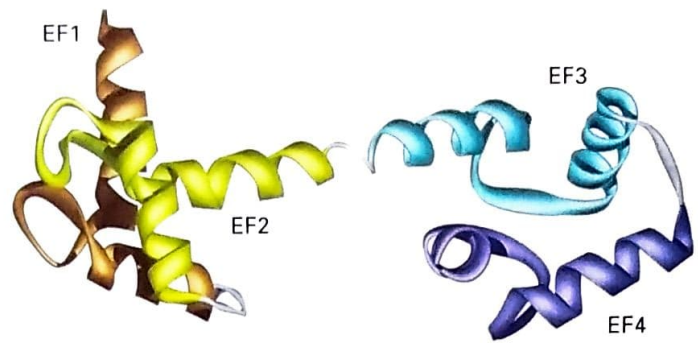
Encendido por Ca^{2+} /calmodulina La concentración de Ca^{2+} libre en el citosol (no unido a moléculas distintas del agua) se mantiene muy baja ($\sim 10^{-7}$ M) por acción de proteínas de transporte especializadas de las membranas, que continuamente bombean el exceso de Ca^{2+} hacia el exterior del citosol. Sin embargo, como aprenderemos en el Capítulo 11, la concentración citosólica de Ca^{2+} puede aumentar de 10 a 100 veces cuando se abren los canales de la membrana de la superficie celular permeables al Ca^{2+} y permiten que el Ca^{2+} extracelular fluya al interior de la célula; este incremento en el calcio citosólico es detectado por proteínas especializadas que unen Ca^{2+} , que alteran la conducta celular activando o desactivando otras proteínas. La importancia del Ca^{2+} extracelular para la actividad celular fue documentada inicialmente por S. Ringer en 1883, cuando descubrió que los corazones de rata aislados, suspendidos en una solución de NaCl hecha con agua corriente “dura” (rica en Ca^{2+}) de Londres, se contraían maravillosamente, mientras que latían escasamente y se detenían con rapidez si se empleaba agua destilada.

Muchas de las proteínas que unen Ca^{2+} lo hacen empleando el motivo estructural mano EF-hélice-bucle-hélice analizado previamente (véase la Fig. 3-9b). Una proteína mano EF bien estudiada, la calmodulina, se encuentra en todas las células eucariontes y puede existir como proteína monomérica individual o como subunidad de una proteína multimérica. Una molécula en forma de mancuerna, la **calmodulina**, contiene 4 manos EF que unen Ca^{2+} , con valores de $K_d \sim 10^{-6}$ M. La unión de Ca^{2+} a la calmodulina provoca un cambio de conformación que permite que la Ca^{2+} /calmodulina se una a secuencias conservadas de varias proteínas efectoras (Fig. 3-31), lo que hace que éstas se activen o desactiven. La calmodulina y proteínas similares del tipo mano EF funcionan de esta manera como *proteínas interruptoras*, que actúan concertadamente con los cambios en los niveles de Ca^{2+} para modular la actividad de otras proteínas.

Cambios mediados por las proteínas que unen nucleótidos de guanina Otro grupo de proteínas interruptoras intracelulares constituye la **superfamilia de las GTPasas**. Como su nombre sugiere, estas proteínas son enzimas, GTPasas, que pueden hidrolizar GTP (guanosina-trifosfato) a GDP (guanosina-difosfato). Incluyen la proteína monomérica Ras, cuya estructura se muestra en la Figura 3-8 con el GPD unido, que se ve en azul, y la subunidad G_α de las proteínas triméricas G, ambas analizadas extensamente en los Capítulos 15 y 16. Tanto Ras como G_α pueden unirse a la membrana plasmática, funcionar en la señalización celular y desempeñar un papel clave en la proliferación y diferenciación celular. Otros miembros de la superfamilia de las GTPasas participan en la síntesis proteica, el transporte de proteínas entre el núcleo y el citoplasma, la formación de vesículas recubiertas y su fusión con las membranas efectoras y en los reordenamientos del citoesqueleto de actina. La proteína chaperona Hsp70, que mencionamos previamente, es un ejemplo de interruptor ATP/ADP, similar en muchos aspectos al interruptor GTP/GDP.

Todas las GTPasas que actúan como proteínas interruptoras existen en dos formas o conformaciones (Fig. 3-32): 1) una forma activa (“encendida”) que une GTP y puede influenciar la actividad de las proteínas efectoras específicas a las cuales se une, y 2) una forma inactiva (“apagada”) que une GDP. El interruptor pasa a encendido, es decir, la con-

(a) Calmodulina sin calcio



(b) Ca^{2+} /calmodulina unida a un péptido diana

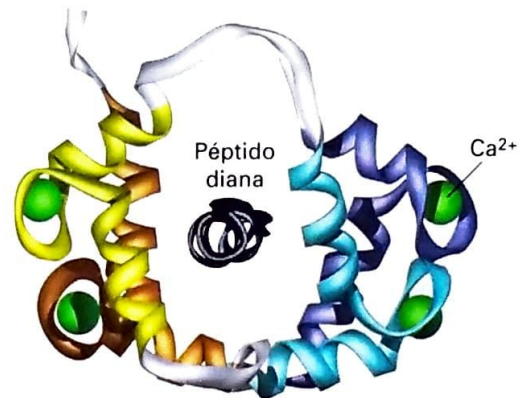
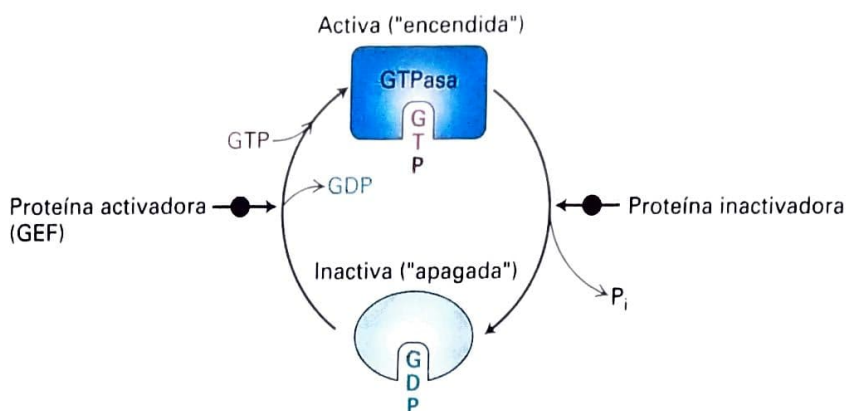


FIGURA 3-31 Cambios conformacionales inducidos por la unión de Ca^{2+} a la calmodulina. La calmodulina es una proteína citosólica ampliamente distribuida, que contiene cuatro sitios de unión al Ca^{2+} , uno en cada una de sus manos EF. Cada mano EF tiene un motivo hélice-bucle-hélice. A concentraciones citosólicas de Ca^{2+} por encima de 5×10^{-7} M, la unión del Ca^{2+} a la calmodulina cambia la conformación de la proteína a la forma de cuernos, no unida (a) a una en la cual las cadenas laterales hidrofóbicas quedan más expuestas al solvente. La Ca^{2+} -calmodulina puede envolverla y exponer las hélices a varias proteínas diana (b), alterando así su actividad.

formación de la proteína cambia de inactiva a activa, cuando una molécula de GTP reemplaza al GDP unido en la conformación inactiva. El interruptor pasa a posición apagado cuando la actividad relativamente lenta de GTPasa de la proteína hidroliza el GTP unido, convirtiéndolo a GDP y haciendo que la conformación cambie a la forma inactiva. El tiempo que cualquier forma de interruptor de GTPasa permanezca en la forma activa, que une GTP, dependerá del tiempo durante el cual el GTP permanezca unido antes de convertirse en GDP. Este lapso dependerá de la tasa de actividad de la GTPasa. Así, la actividad de la GTPasa actúa como un temporizador para controlar este interruptor. Las células contienen una variedad de proteínas que pueden modificar la tasa basal (intrínseca) de actividad de la GTPasa de cualquier interruptor GTPasa dado y, de este modo, controlar durante cuánto tiempo el interruptor permanecerá encendido. Las células también tienen proteínas específicas cuya función es regular la conversión de las GTPasas inactivas a activas –es decir, encender el interruptor– mediando el reemplazo del GDP unido con un GTP. Éstos son llamados factores de intercambio de GTP o GEF. Examinamos el papel de varias proteínas interruptoras GTPasa en la regulación de la señalización intercelular, y de otros procesos, en varios capítulos posteriores.

FIGURA 3-32 El interruptor de GTPasa. Las GTPasas son enzimas que se unen al GTP y lo hidrolizan a GDP. Cuando se unen al GTP, las GTPasas adoptan su conformación activa o "encendida" y pueden interactuar con las proteínas diana para regular sus actividades; cuando el GTP unido se hidroliza a GDP por la actividad de GTPasa intrínseca de la proteína, la GTPasa con el GDP unido asume una conformación inactiva o "apagada". La GTPasa interruptora puede ser encendida nuevamente cuando otra proteína llamada GEF (factor de intercambio del guanina nucleótido) media el reemplazo del GDP unido con una molécula de GTP del líquido que la rodea. La unión de la forma activa de las GTPasas a sus efectores es una forma de regulación no covalente. Varias proteínas pueden influenciar las tasas de hidrólisis de GTP (es decir, proteínas inactivadoras) e intercambiar GDP por GTP (GEF).



La fosforilación y la desfosforilación regulan en forma covalente la actividad de las proteínas

Además de explotar los reguladores no covalentes descritos más arriba, las células pueden emplear modificaciones covalentes para regular la actividad intrínseca de una proteína. Uno de los mecanismos covalentes más comunes para regular la actividad proteica es la **fosforilación**, la adición reversible de grupos fosfato a grupos hidroxilo de las cadenas laterales de los residuos de serina, treonina o tirosina. La fosforilación está catalizada por enzimas llamadas proteínas **quinasas**, mientras que la eliminación de los fosfatos, conocida como desfosforilación, es catalizada por **fosfatasa**s. Las actividades opuestas de las quinasas y las fosfatasas proporcionan a las células un "interruptor" que puede encender o apagar la función de varias proteínas (Fig. 3-33).

En algunas ocasiones, los sitios de fosforilación están enmascarados transitoriamente por la modificación covalente reversible, con el azúcar N-acetilglucosamina como medio adicional de regulación.

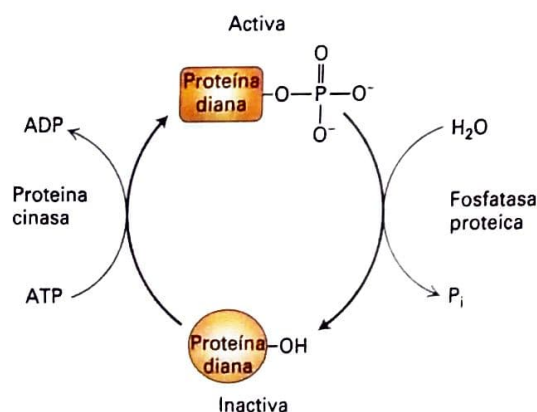


FIGURA 3-33 Regulación de la actividad proteica por fosforilación y desfosforilación. La fosforilación y desfosforilación cíclica de una proteína es un mecanismo celular común para regular la actividad proteica. En este ejemplo, la proteína diana está activa (parte superior) cuando está fosforilada, e inactiva (parte inferior) cuando está desfosforilada; algunas proteínas tienen la respuesta opuesta a la fosforilación.

La fosforilación cambia la carga de una proteína y puede conducir a un cambio de conformación que puede alterar significativamente la unión del ligando u otras características de la proteína, lo que provoca un aumento o disminución de su actividad. Además, varios dominios conservados de las proteínas se unen específicamente a péptidos fosforilados. Así, la fosforilación puede mediar la formación de complejos proteicos que pueden generar o extinguir una gran diversidad de actividades celulares, que se analizarán en muchos capítulos posteriores.

Casi el 3% de todas las proteínas de las levaduras son proteínas-quinasas o fosfatasas, lo que da cuenta de la importancia de las reacciones de fosforilación y desfosforilación, aun en células simples. Todas las clases de proteínas—incluidas las proteínas estructurales, las de andamiaje, las enzimas, los canales de membrana y las moléculas de señalización—tienen miembros regulados por modificaciones quinasa/fosfatasa. Diferentes proteínas quinasas y fosfatasas son específicas para diferentes proteínas efectores, y así pueden regular distintas vías celulares, según se analizará en capítulos posteriores. Algunas quinasas tienen muchos efectores y, por lo tanto, una única quinasa puede servir para integrar las actividades de muchos efectores en forma simultánea. Con frecuencia, el efector de la quinasa (y de la fosfatasa) es otra quinasa o fosfatasa, lo cual crea un efecto cascada. Hay muchos ejemplos de estas cascadas de quinasas que permiten la amplificación de una señal y muchos niveles de control de sintonización (véanse los Caps. 15 y 16).

La ubiquitinación y la desubiquitinación regulan en forma covalente la actividad de las proteínas

Tanto la ubiquitina como las proteínas ubiquitinoides (de las cuales hay más de una docena en los seres humanos) pueden unirse en forma covalente a una proteína efectora, de forma regulada, de modo análogo a la fosforilación. Las desubiquitininas, pueden revertir la adición de ubiquitina en forma análoga a la acción de las fosfatasas. Estas modificaciones de la ubiquitina son estructuralmente mucho más complejas que la relativamente simple fosforilación. Sin embargo, y por lo tanto, pueden mediar muchas interacciones diferentes entre la proteína ubiquitinada y otras proteínas celulares. La adición de ubiquitina puede implicar la unión de una única ubiquitina a una proteína (**monoadición de ubiquitina**), la adición de múltiples moléculas individuales de ubiquitina en diferentes sitios en una proteína efectora (**multiadición de ubiquitina**) o la adición de una cadena polimérica a una proteína (**poliadición de ubiquitina**). Una fuente adicional de variación es que los diferentes

La rotura o fragmentación proteolítica activa irreversiblemente algunas proteínas o las inactiva

A diferencia de la fosforilación y la adición de ubiquitina, que son reversibles, la activación o inactivación de la función proteica por rotura o fragmentación proteolítica es un mecanismo irreversible de regulación de la actividad proteica. Por ejemplo, muchas hormonas polipeptídicas como la insulina se sintetizan como precursores más largos y, antes de la secreción desde la célula, parte de sus enlaces peptídicos deben hidrolizarse para que se plieguen adecuadamente. En algunos casos, un precursor único largo polipeptídico, una *prohormona*, puede fragmentarse a varias hormonas activas distintas. Para evitar que las proteasas de serina pancreática digieran inadecuadamente proteínas antes de que lleguen al intestino delgado, se sintetizan como *zimógenos*, enzimas precursoras inactivas. La rotura de un enlace peptídico cerca del extremo N-terminal del tripsinógeno (el zimógeno de tripsina), por una proteasa altamente específica del intestino delgado, genera un nuevo residuo N-terminal (Ile-16) cuyos grupos amino pueden formar un enlace iónico con la cadena lateral del ácido carboxílico de un ácido aspártico interno. Esto provoca un cambio de conformación que abre el sitio de unión al sustrato, activando la enzima. La tripsina activa, luego puede activar al tripsinógeno, el quimotripsinógeno y otros zimógenos. Cascadas de proteasas semejantes pero más elaboradas (una proteasa que activa precursores inactivos de otras) que pueden amplificar una señal inicial, desempeñan funciones importantes en varios sistemas, tales como la cascada de coagulación de la sangre y el sistema del complemento (véase el Cap. 23). La importancia de regular cuidadosamente estos sistemas queda clara—la coagulación inapropiada puede provocar coágulos fatales en el sistema circulatorio mientras que la coagulación insuficiente llevaría a hemorragias sin control—.

Un tipo raro e inusual de procesamiento proteolítico, llamado *autocorte y empalme de proteínas* ocurre en las bacterias y algunos eucariontes. Este proceso es análogo a la edición de una película. Un segmento interno de un polipéptido se retira y los extremos de los polipéptidos se vuelven a unir (se ligan). A diferencia de lo que ocurre con otras formas de procesamiento proteolítico, el autocorte y empalme de las proteínas es un proceso autocatalítico que avanza por sí mismo, sin la participación de otras enzimas. El péptido escindido parece autoeliminarse de la proteína mediante un mecanismo semejante al que se emplea en el procesamiento de ciertas moléculas de RNA (véase el Cap. 8). En las células de los vertebrados, el procesamiento de algunas proteínas incluye la autosegmentación, pero el paso de unión posterior no existe. Una proteína de este tipo es la Hedgehog, una molécula de señalización unida a la membrana que resulta crítica para una diversidad de procesos del desarrollo (véase el Cap. 16).

La regulación de orden superior incluye el control de la localización y concentración de las proteínas

Todos los mecanismos de regulación descritos hasta aquí afectan a una proteína localmente en su sitio de acción, activándola o desactivándola. Sin embargo, el normal funcionamiento de una célula requiere además la segregación de las proteínas a compartimentos específicos como las mitocondrias, el núcleo y los lisosomas. Con respecto a las enzimas, la compartimentalización no solo proporciona una oportunidad de controlar la llegada de un sustrato o la salida de un producto, sino que permite además que reacciones que compiten entre sí tengan lugar simultáneamente en distintas partes de la célula. Describimos los mecanismos que emplean las células para dirigir varias proteínas a diferentes compartimentos en los Capítulos 13 y 14.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 3.3

Regulación de la función de las proteínas

- Las proteínas pueden estar reguladas a nivel de la síntesis proteica, de la degradación o de la actividad intrínseca de las proteínas, por medio de interacciones no covalentes o covalentes.
- El espectro vital de las proteínas intracelulares está determinado en gran medida por su susceptibilidad a la degradación proteolítica.
- Muchas proteínas están marcadas para ser destruidas con una etiqueta poliubiquitina por acción de las ligasas de ubiquitina, y luego se degradan dentro de los proteasomas, grandes complejos cilíndricos con múltiples sitios activos de proteasa en sus cámaras interiores (véase la Fig. 3-29).
- La adición de ubiquitina a las proteínas es reversible, debido a la actividad de las enzimas desubiquitinantes.
- En el alosterismo, la unión no covalente de una molécula de ligando, el efector alostérico, induce un cambio de conformación que altera la actividad de una proteína o su afinidad por otros ligandos. El efector alostérico puede ser de la misma estructura o de estructura distinta a las de los otros ligandos cuya unión afecta. El efector alostérico puede ser activador o inhibidor.
- En las proteínas multiméricas como la hemoglobina, que unen múltiples moléculas de ligando idénticas (p. ej., oxígeno), la unión de una molécula de este tipo puede aumentar o disminuir la afinidad o disminuir la dificultad de unión por las moléculas de ligando adicionales. Este tipo de alosterismo se conoce como cooperatividad (véase la Fig. 3-30).
- Varios mecanismos alostéricos actúan como interruptores, encendiendo o apagando la actividad de las proteínas en forma reversible.
- Hay dos clases de proteínas intracelulares interruptoras que actúan sobre una variedad de procesos celulares: 1) las proteínas que unen Ca^{2+} (p. ej., calmodulina) y 2) los miembros de la superfamilia de la GTPasa (p. ej., Ras), que ciclan entre las formas activas unidas a GTP e inactivas unidas a GDP (véase la Fig. 3-32).
- La fosforilación y desfosforilación de los grupos hidroxilo de las cadenas laterales de los residuos de serina, treonina o tirosina, por acción de las proteincinasas y las fosfatasas proporciona una regulación reversible de tipo encendido/apagado en numerosas proteínas (Fig. 3-33).
- Las variaciones en la naturaleza de la unión covalente de la ubiquitina a las proteínas (monoubiquitinación, multiubiquitinación y poliubiquitinación que implican una diversidad de enlaces entre los monómeros de ubiquitina) están involucradas en una amplia variedad de funciones celulares distintas de la degradación mediada por proteasomas, como los cambios en la localización o actividad de las proteínas (véase la Fig. 3-34).
- Muchos tipos de regulación covalente y no covalente son reversibles, pero algunas formas de regulación como la escisión proteolítica, son irreversibles.
- La regulación de orden superior incluye la compartimentación de las proteínas y el control de su concentración.

3.5 Purificación, detección y caracterización de proteínas

Una proteína con frecuencia debe purificarse antes de que puedan estudiarse con detalle su estructura y mecanismo de acción. Sin embargo, dado que las proteínas varían en forma, tamaño, estado de oligomerización, carga y solubilidad en agua, no hay un único método que pueda utilizarse para aislar todas las proteínas. Aislar una proteína en particular, de las aproximadamente 10 000 distintas en un tipo celular particular, es una tarea desalentadora, que requiere métodos para separar las proteínas y para detectar la presencia de proteínas específicas.

Cualquier molécula, sea proteína, hidrato de carbono o ácido nucleico, puede ser separada o *resuelta* de otras moléculas, sobre la base de sus diferencias en una o más características físicas o químicas. Cuanto más grandes y más numerosas sean las diferencias entre dos proteínas, más sencilla y eficiente será su separación. Las tres características más extensamente usadas para la separación de proteínas son el *tamaño*, definido como la longitud o la masa, la carga eléctrica neta y la *afinidad de unión* por ligandos específicos. En esta sección trataremos brevemente varias técnicas importantes para separar proteínas, técnicas que también resultan de utilidad para separar los ácidos nucleicos y otras biomoléculas (los métodos especializados para remover proteínas de la membrana se describen en el Capítulo 10, después de haber analizado las propiedades únicas de estas moléculas). Consideraremos luego el uso de compuestos radiactivos, para seguir la huella de la actividad biológica. Finalmente, trataremos sobre varias técnicas para caracterizar la masa, la secuencia y la estructura tridimensional de una proteína.

La centrifugación puede separar las partículas y moléculas que difieren en masa o densidad

El primer paso en el esquema de purificación de una proteína típica es la centrifugación. El principio sobre el que se fundamenta la centrifugación es que dos partículas en suspensión (células, fragmentos celulares, orgánulos o moléculas), con diferentes masas o densidades, se depositarán en el fondo de un tubo a diferentes velocidades. Recuerde que la masa es el peso de una muestra (medida en daltons o unidades de peso molecular), mientras que la densidad es el cociente de su masa con respecto al volumen (se expresa con frecuencia como gramos/litro, a raíz de los métodos empleados para medir la densidad). Las proteínas varían en gran medida en masa pero no en densidad. A menos que una proteína tenga un lípido o un hidrato de carbono unido, su densidad no variará más del 15% con relación a 1,37 g/cm³, la densidad promedio de las proteínas. Las moléculas más pesadas o más densas se depositan o sedimentan más rápidamente que las moléculas más ligeras o menos densas.

Una centrífuga acelera la sedimentación, sometiendo a las partículas suspendidas a fuerzas centrífugas que alcanzan 1 000 000 de veces la fuerza de la gravedad, *g*, que puede sedimentar partículas tan pequeñas como 10 kDa. Las ultracentrífugas modernas logran estas fuerzas alcanzando velocidades de 150 000 revoluciones por minuto (rpm) o superiores. Sin embargo, las partículas pequeñas con masas de 5 kDa o inferiores no sedimentarán uniformemente, aun a velocidades de rotación notablemente elevadas. Los extraordinarios logros técnicos de las ultracentrífugas modernas pueden apreciarse considerando que pueden hacer girar un rotor de varios kilos (aproximadamente el tamaño de una pelota de fútbol americano) con tubos cargados de muestras, a velocidades de hasta 2.500 revoluciones por segundo.

La centrifugación se usa con dos objetivos básicos: 1) como técnica de preparación para separar un tipo de material de otros, 2) como técnica analítica para medir las propiedades físicas (p. ej., peso molecular, densidad, forma y constante de unión en equilibrio de las macromoléculas). La constante de sedimentación, *s*, de una proteína es una medida de su velocidad de sedimentación. La constante de sedimentación habitualmente se expresa en *svedbergs* (S), de los cuales un complejo proteico grande tiene entre 3 y 5S, un proteasoma 26S y un ribosoma eucariótico 80S.

Centrifugación diferencial El paso inicial más común en la purificación proteica de células o tejidos consiste en la separación de las proteínas hidrosolubles del material insoluble, mediante la *centrifugación diferencial*. Una mezcla inicial, por lo común un homogeneizado celular (células rotas en forma mecánica), se vierte a un tubo y se centrifuga a una velocidad de rotor tal que, y durante un período suficiente como para que, los orgánulos, como núcleos y grandes células que no se hayan roto, o fragmentos celulares grandes, se acumulen formando una pella en la parte inferior; las proteínas solubles quedan en el sobrenadante (Fig. 3-35a). El sobrenadante se vierte, y ya sea éste o la pella, pueden purificarse adicionalmente para separar las muchas proteínas distintas que contienen.

Centrifugación zonal por velocidad De acuerdo con las diferencias en su masa, las proteínas hidrosolubles pueden separarse mediante centrifugación en una solución de densidad creciente, conocida como *gradiente de densidad*. Para formar gradientes de densidad, comúnmente se usa una solución de sacarosa concentrada. Cuando una mezcla proteica se deposita en la parte superior de un gradiente de sacarosa, en un tubo, y se somete a centrifugación, cada proteína de la mezcla migra hacia la parte inferior del tubo a una velocidad controlada por factores que afectan la constante de sedimentación. Todas las proteínas comienzan en una zona delgada en la parte superior del tubo y se separan en bandas (de hecho, discos) de proteínas de masas distintas. En esta técnica de separación, llamada *centrifugación zonal por velocidad*, las muestras se centrifugan lo suficiente como para separar las moléculas de interés en bandas individuales (Fig. 3-35b). Si una muestra se centrifuga muy poco tiempo, las diferentes moléculas proteicas no se separarán lo suficiente. Si se centrifuga mucho más de lo necesario, todas las proteínas terminarán en una pella en la parte inferior del tubo.

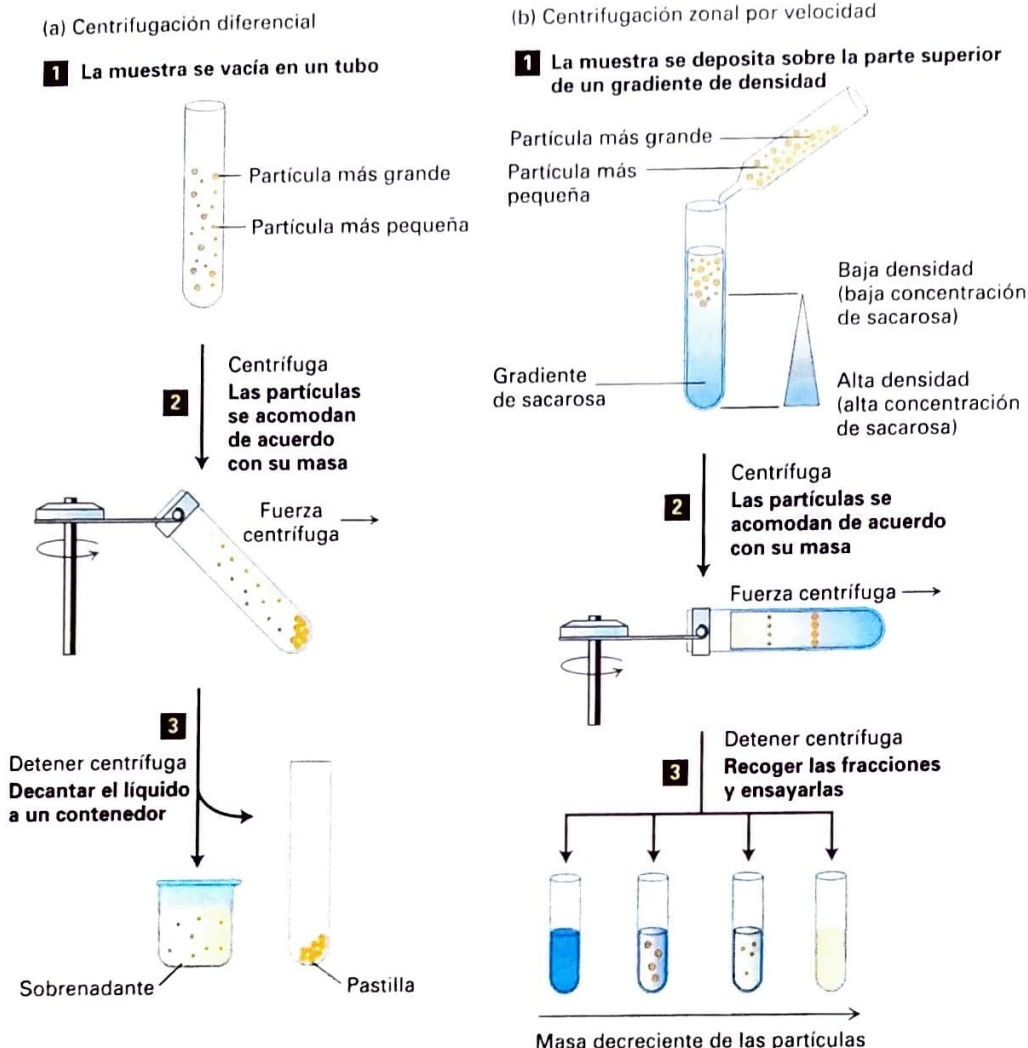
Si bien la velocidad de sedimentación se ve fuertemente influenciada por la masa de las partículas, la centrifugación zonal por velocidad en raras ocasiones resulta efectiva para determinar los pesos moleculares precisos, dado que las variaciones en la forma también afectan la velocidad de sedimentación. Los efectos exactos de la forma son difíciles de evaluar, en especial para las proteínas u otras moléculas como las de ácidos nucleicos monocatenarios, que pueden adquirir muchas formas complejas. Sin embargo, la centrifugación zonal por velocidad mostró ser un método práctico para separar muchos tipos diferentes de polímeros y partículas. Una segunda técnica con gradiente de densidad, llamada *centrifugación en gradiente de densidad al equilibrio*, se emplea principalmente para separar DNA, lipoproteínas que llevan lípidos a través del sistema circulatorio u orgánulos (véase la Fig. 9-35).

La electroforesis separa las moléculas sobre la base de su cociente carga a masa

La electroforesis es una técnica empleada para separar moléculas de una mezcla, por la influencia de un campo eléctrico aplicado, y es una

FIGURA EXPERIMENTAL 3-35 Técnicas de centrifugación que separan partículas que difieren en masa o densidad. (a) En la centrifugación diferencial, un homogenado celular u otra mezcla es centrifugado durante suficiente tiempo como para que sedimenten las partículas más grandes (p. ej., los orgánulos celulares, las células), que se recogen como una pastilla en la parte inferior del tubo (paso 2).

Las partículas más pequeñas (p. ej., las proteínas solubles, los ácidos nucleicos) permanecen en el sobrenadante líquido, que puede ser transferido a otro tubo (paso 3). (b) En la centrifugación zonal por velocidad, se centrifuga una mezcla (paso 1) el tiempo suficiente como para separar las moléculas que difieren en masa pero pueden ser similares en forma y densidad (p. ej., proteínas globulares, moléculas de RNA) en zonas diferentes dentro de un gradiente de densidad, formado comúnmente por una solución de sacarosa concentrada. Se remueven las fracciones desde la parte inferior del tubo y se someten a comprobación (se ensayan).



de las técnicas utilizadas con mayor frecuencia para estudiar las proteínas y los ácidos nucleicos. Las moléculas disueltas en un campo eléctrico se mueven o migran a una velocidad determinada por su cociente carga:masa y las propiedades físicas del medio a través del cual migran. Por ejemplo, si dos moléculas tienen la misma masa y forma, la que tenga mayor carga neta se moverá más rápido hacia un electrodo de polaridad opuesta.

Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS Dado que muchas proteínas o ácidos nucleicos de diferente tamaño y forma tienen cocientes casi idénticos carga:masa, la electroforesis de estas macromoléculas en solución resulta en escasa o ninguna separación de las moléculas de diferente longitud. Sin embargo, la separación exitosa de las proteínas y los ácidos nucleicos puede lograrse por electroforesis en varios geles (suspensiones acuosas semisólidas, semejante a la gelatina solidificada que se encuentra en los postres) más que en una solución líquida. La separación electroforética de las proteínas se lleva a cabo comúnmente en geles de poliacrilamida. Cuando una mezcla de proteínas se coloca en un gel y se aplica una corriente eléctrica, las proteínas más pequeñas migran más rápido a través del gel que las proteínas de mayor tamaño, porque éste actúa como un cedazo en el que las especies más pequeñas

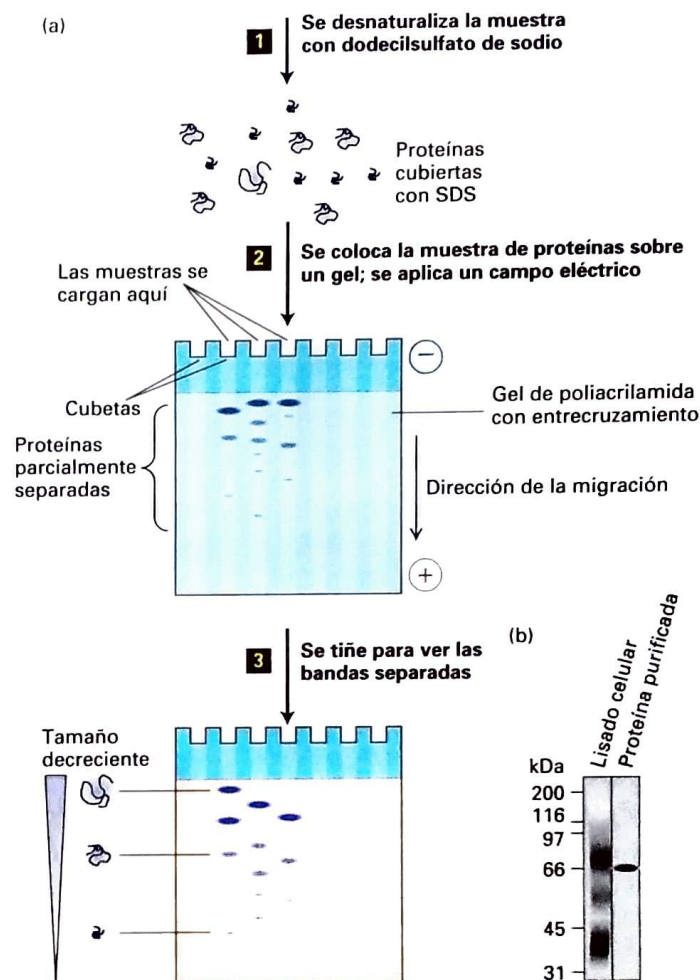
pueden maniobrar más rápidamente a través de los poros del gel que las especies de mayor tamaño. La forma de una molécula también puede influir en su velocidad de migración (las moléculas asimétricas grandes migran más lentamente que las esféricas de la misma masa).

Los geles se ponen a moldear en bloques planos relativamente delgados, entre un par de placas de vidrio, polimerizando una solución de monómeros de acrilamida en cadenas de poliacrilamida y entrecruzando simultáneamente las cadenas en una matriz semisólida. El tamaño de los poros de un gel puede variarse ajustando las concentraciones de poliacrilamida y el reactivo de entrecruzamiento. La velocidad a la cual se mueve una proteína a través de un gel está influenciada por el tamaño del poro de un gel y la fuerza del campo eléctrico. Con el adecuado ajuste de estos parámetros pueden ser resueltas (separadas entre sí) las proteínas de una amplia variedad de tamaños, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE).

En la técnica más poderosa para resolver las mezclas proteicas, las proteínas se exponen al detergente iónico SDS (dodecilsulfato de sodio) antes de la electroforesis en gel y durante esta (Fig. 3-36). El SDS desnatura las proteínas, en parte porque se une a las cadenas laterales hidrofóbicas, desestabilizando las interacciones hidrofóbicas del núcleo de una proteína, lo que contribuye a su conformación estable.

FIGURA EXPERIMENTAL 3-36 La electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) separa las proteínas primariamente de acuerdo con su masa. (a) El tratamiento inicial con SDS, un detergente con carga negativa,

disocia las proteínas multiméricas y desnaturaliza todas las cadenas polipeptídicas (paso 1). Durante la electroforesis, los complejos SDS-proteína migran a través del gel de poliacrilamida (paso 2). Los complejos pequeños son capaces de moverse a través de los poros más rápido que los de mayor tamaño. Así, las proteínas se separan en bandas de acuerdo con sus tamaños a medida que migran. Las bandas de proteínas separadas se observan al ser teñidas con un colorante (paso 3). (b) Ejemplo de la separación en SDS-PAGE de todas las proteínas en un lisado de células enteras (células solubilizadas en detergente): (izquierda) las numerosas proteínas teñidas separadas aparecen casi como un continuo; (derecha) una proteína purificada del lisado mediante un único paso de cromatografía de afinidad con anticuerpo. Las proteínas se visualizaron con tinción mediante un colorante de plata. (Parte (b) modificada de B. Liu y M. Krieger, 2002, *J. Biol. Chem.* **277**(37):34125-34135.)



(El tratamiento con SDS habitualmente se combina con calor, con frecuencia en presencia de agentes reductores, que rompen los puentes disulfuro). En estas condiciones, las proteínas multiméricas se disocian en sus subunidades, y normalmente la cantidad de SDS que se une a la proteína es proporcional a la longitud de la cadena polipeptídica y relativamente independiente de las secuencias. Dos proteínas de tamaño similar unirán la misma cantidad absoluta de SDS, mientras que una proteína con el doble de tamaño unirá el doble de SDS. La desnaturalización de una mezcla de proteínas complejas con el SDS, en combinación con el calor, con frecuencia fuerza a cada cadena polipeptídica a una conformación extendida e imparte a cada una de las proteínas de la mezcla un cociente, masa/carga constante, porque el dodecilsulfato tiene carga negativa. A medida que las proteínas unidas al SDS avanzan a través del gel de poliacrilamida, se separan de acuerdo con el tamaño, por la acción de cedazo del gel. El tratamiento con SDS elimina de este modo, el efecto de las diferencias de forma en las estructuras nativas; por lo tanto, la longitud de la cadena que se corresponde con la masa es el principal determinante de la velocidad de migración de las proteínas en la *electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE-SDS)*. Aun las cadenas en la *electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE-SDS)*. Aun las cadenas que difieren en peso molecular por menos del 10% pueden ser resueltas mediante esta técnica. Más aún, puede estimarse el peso molecular de una proteína al comparar la distancia a la que migra a través del gel, con las distancias a las que migran las proteínas de peso molecular conocido (hay una relación aproximadamente lineal entre la distancia de migración y el log del peso molecular). Las proteínas que están en el interior de los geles pueden ser extraídas para análisis ulteriores (p. ej., identificación por métodos descritos más adelante).

Electroforesis bidimensional en gel La electroforesis de todas las proteínas celulares por PAGE-SDS puede separar proteínas con diferencias relativamente grandes de masa, pero no puede resolver con facilidad proteínas que tengan masas similares (p. ej., una proteína de 41 kDa versus una proteína de 42 kDa). Para separar proteínas de masas similares deben explotarse otras características físicas. Más comúnmente esta característica es la carga eléctrica, que está determinada por el pH y por el número relativo de grupos cargados en forma positiva y

negativa, que a su vez depende del pK_a de los grupos ionizables (véase el Cap. 2). Es improbable que dos proteínas no relacionadas, con masas similares, tengan cargas netas idénticas por su secuencia, y así, el número de residuos ácidos y básicos es diferente.

En la electroforesis bidimensional, las proteínas se separan secuencialmente, en primer término por su carga y luego por sus masas (Fig. 3-37a). En el primer paso, una célula o un extracto tisular se desnaturaliza por completo por altas concentraciones de urea (8 M) (y en algunas ocasiones SDS) y luego se coloca una capa sobre una tira de gel que contiene urea, que elimina cualquier SDS unido, y un gradiente continuo de pH. El gradiente de pH está formado por anfólitos, una mezcla de pequeñas moléculas polianiónicas y policationicas que están integradas dentro del gel. Cuando se aplica un campo eléctrico al gel, los anfólitos migran, de modo tal que los que tienen cargas negativas en exceso migran hacia el ánodo, donde establecen un pH ácido (muchos protones), mientras que los anfólitos con exceso de cargas positivas migran hacia el cátodo, donde establecen un pH alcalino. La elección cuidadosa de la mezcla de anfólitos y la preparación del gel permiten la construcción de gradientes de pH estables en cualquier espectro entre pH 3 y pH 10. Una proteína cargada ubicada en un extre-

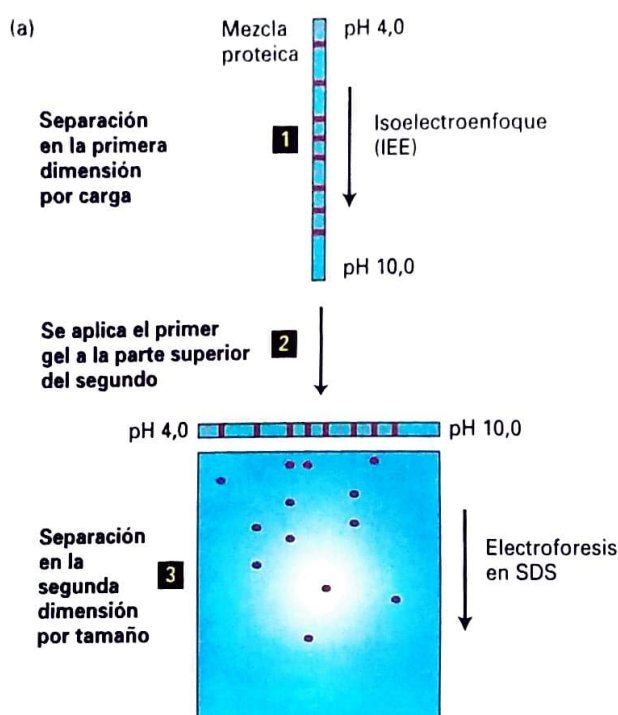


FIGURA EXPERIMENTAL 3-37 La electroforesis bidimensional en gel se para proteínas sobre la base de su carga y de su masa. (a) En esta técnica, las proteínas se separan en primer término en bandas, sobre la base de sus cargas mediante isoelectroenfoque (paso 1). La tira de gel resultante se aplica a un gel de poliacrilamida-SDS (paso 2), y las proteínas se separan en manchas

de acuerdo con su masa (paso 3). (b) En este gel bidimensional de un extracto proteico de células cultivadas, cada mancha representa un único polipéptido. Los polipéptidos pueden detectarse con colorantes, como aquí, o mediante otras técnicas como la autorradiografía. Cada polipéptido se caracteriza por su punto isoelectrico (pI) y su peso molecular. (Parte (b) cortesía de J. Celis.)

mo de un gel de este tipo migrará a través de un gradiente hasta que alcance su **punto isoelectrico (pI)**, pH al cual la carga neta de la proteína es cero. Sin carga neta la proteína no migrará por influencia del campo eléctrico. Esta técnica, llamada **isoelectroenfoque (IEE)**, puede separar proteínas que difieren solo en una unidad de carga. Las proteínas que han sido separadas en un gel mediante IEE pueden ser separadas en una segunda dimensión mediante sus pesos moleculares. Para lograr esta separación, la banda del gel de IEE se coloca a lo largo en un borde externo de un gel de poliacrilamida plano (bidimensional o bloque), en esta ocasión saturado con SDS, para conferir a cada proteína separada un cociente más o menos constante masa:carga. Cuando se aplica un campo eléctrico, las proteínas migrarán desde el gel de IEE al bloque de gel de SDS y luego se separarán de acuerdo con sus masas.

La separación secuencial de proteínas por carga y masa puede lograr una excelente separación de las proteínas celulares (Fig. 3-37b). Por ejemplo, los geles bidimensionales han sido muy útiles para comparar los proteomas en células no diferenciadas y diferenciadas, o en células normales y cancerosas, porque pueden distinguirse más de 1 000 proteínas como manchas individuales al mismo tiempo. Lamentablemente, las proteínas de la membrana se separan relativamente poco empleando esta técnica. Se han desarrollado métodos sofisticados, que permiten comparar patrones complejos de proteínas en los geles bidimensionales de muestras relacionadas pero distintas (p. ej., tejido de un individuo normal versus un mutante) con el fin de permitir la identificación de diferencias en los tipos

o cantidades de las proteínas de las muestras (véase la Sección 3.6 sobre proteómica, más adelante). Los métodos de espectrometría de masas, sofisticados, que se describen a continuación se usan con frecuencia en lugar de la electroforesis en gel bidimensional para identificar los componentes proteicos de una muestra compleja.

La cromatografía líquida resuelve proteínas de acuerdo con su masa, carga o capacidad de unión

Una tercera técnica común para separar mezclas de proteínas o fragmentos de ellas, así como de otras moléculas, está basada en el principio de que las moléculas disueltas en una solución pueden interactuar en forma diferencial (unirse y disociarse) de una superficie sólida particular, dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de la molécula y de la superficie. Si se permite que la solución fluya sobre la superficie, las moléculas que interactúan con frecuencia con ésta pasarán más tiempo unidas a la superficie y, por lo tanto, fluirán sobre ella más lentamente que las que interactúan de modo poco frecuente. En esta técnica, llamada **cromatografía líquida (CL)**, la muestra se coloca en la parte superior de una columna llena con bolitas esféricas densamente empaquetadas, que se mantienen dentro de un cilindro de vidrio o de plástico. La muestra fluye luego hacia la parte inferior de la columna, habitualmente impulsada por fuerzas gravitacionales o hidrostáticas, sola o con la ayuda de una bomba, y se recolectan pequeñas alícuotas de líquido que salen de la columna en forma secuencial, llamadas **fraccio-**

nes, para el análisis posterior en busca de la presencia de las proteínas de interés. La naturaleza de las bolitas de la columna determina si la separación de las proteínas depende de diferencias en la masa, la carga o la afinidad de unión.

Cromatografía por filtración en gel Las proteínas que difieren en masa pueden separarse en una columna compuesta por esferas porosas hechas de poliacrilamida, dextrán (un polisacárido bacteriano) o agarosa (un derivado de las algas) —una técnica llamada cromatografía por filtración en gel—. Si bien las proteínas fluyen rodeando las cuentas esféricas en la cromatografía por filtración en gel, pasan cierto tiempo dentro de grandes huecos que están en la superficie de las esferas. Dado que las proteínas más pequeñas pueden penetrar en estas depresiones más rápidamente que las de mayor tamaño, éstas viajan por la columna de filtración en gel con mayor lentitud que las proteínas más grandes (Fig. 3-38a). (Por el contrario, las proteínas migran *a través* de los poros en un gel electroforético, de tal modo que las más pequeñas se mueven más rápido que las más grandes). El volumen total de líquido necesario para eluir (o separar y eliminar) una proteína de una columna de filtración en gel depende de su masa: cuanto menor sea la masa, más tiempo permanecerá atrapada sobre las cuentas y mayor será el volumen de elución. Empleando proteínas de masa conocida como estándares para calibrar la columna, el volumen de elución puede emplearse para estimar la masa de una proteína en una mezcla. La forma de una proteína, como así su masa pueden ejercer influencia en el volumen de elución.

Cromatografía de intercambio iónico En la cromatografía de intercambio iónico, un segundo tipo de cromatografía líquida, las proteínas se separan de acuerdo con las diferencias en su carga. Esta técnica emplea esferas especialmente modificadas, cuyas superficies están cubiertas por grupos amino o carboxilo, de modo tal que tienen carga positiva (NH_3^+) o carga negativa (COO^-) a pH neutro.

Las proteínas de una mezcla llevan varias cargas netas a cualquier pH dado. Cuando una solución de una mezcla de proteínas fluye a través de una columna de esferas con carga positiva, solo las que tienen carga neta negativa (proteínas ácidas) se adhieren a las cuentas; las proteínas neutras y las que tienen carga positiva (básicas), fluyen sin ningún impedimento a través de la columna (Fig. 3-38b). Las proteínas ácidas luego se eluyen de la columna selectivamente, haciendo pasar una solución salina de concentración creciente (un gradiente salino) a través de la columna. A bajas concentraciones salinas, las moléculas proteicas y las cuentas se atraen por sus cargas opuestas. A mayores concentraciones salinas, los iones negativos de la sal se unen a las esferas con carga positiva, desplazando a las proteínas cargadas negativamente. En un gradiente de concentraciones crecientes de sal, las proteínas débilmente unidas, aquellas con carga relativamente baja, eluyen primero, y las muy cargadas eluyen al final. De forma semejante, puede emplearse una columna con cargas negativas para retener y fraccionar proteínas básicas (con carga positiva).

Cromatografía de afinidad La capacidad de las proteínas de unirse en forma específica a otras moléculas es la base de la cromatografía de afinidad. En esta técnica, el ligando u otras moléculas que se adhieren a la proteína de interés se unen covalentemente a las esferas empleadas para formar la columna. Los ligandos pueden ser sustratos enzimáticos, inhibidores o sus análogos, u otras moléculas pequeñas que se unen a proteínas específicas. En una forma ampliamente usada de esta técnica —la *cromatografía de afinidad con anticuerpos* o la *cromatografía de*

inmunofinidad—, la molécula unida es un anticuerpo específico para la proteína de interés (Fig. 3-38c). (Analizamos los anticuerpos como herramientas para estudiar las proteínas más adelante; véase también el Capítulo 23, que describe la forma en que se sintetizan los anticuerpos).

Una columna de afinidad, en principio, retendrá solo aquellas proteínas que unen la molécula adherida a las esferas; las proteínas restantes, independientemente de sus cargas o masas, atravesarán la columna porque no se unen. Sin embargo, si una proteína retenida, a su vez, se une a otras moléculas formando un complejo, todo el complejo quedará retenido sobre la columna. La proteínas unidas a la columna de afinidad luego se eluyen añadiendo un exceso de una forma soluble del ligando, exponiendo los materiales unidos a detergentes o cambiando la concentración salina o el pH, de modo tal que se evite la unión a la molécula presente en la columna. La capacidad de esta técnica para separar proteínas particulares depende de la selección de compañeros de unión adecuados que se ligen más estrechamente a la proteína de interés que a otras proteínas.

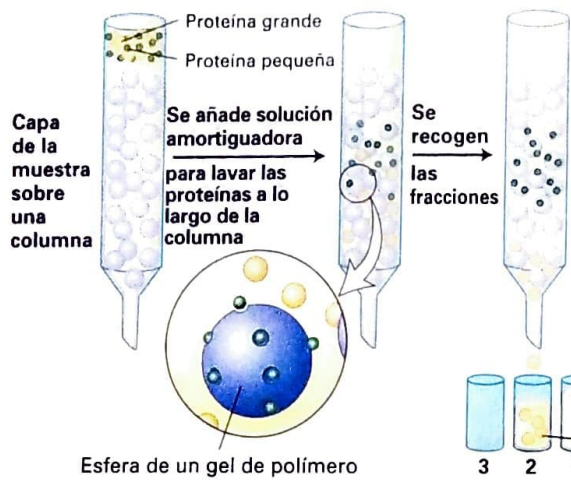
Los ensayos con enzimas y anticuerpos específicos pueden detectar proteínas individuales

La purificación de una proteína, o de cualquier otra molécula de interés, requiere un ensayo específico capaz de detectar la presencia de la molécula diana a medida que se la separa de otras moléculas (p. ej., en una columna o fracciones de un gradiente de densidad o bandas o manchas en los geles). Un ensayo saca partido de algunas características muy distintivas de una proteína: su capacidad de unirse a un ligando específico, de catalizar una reacción particular o de ser reconocida por un anticuerpo específico. Un ensayo también debe ser simple y rápido, para reducir al mínimo la posibilidad de error y de que las proteínas de interés se desnaturalicen o degraden mientras se realiza la determinación. El objetivo de cualquier esquema de purificación es aislar cantidades suficientes de una proteína dada para estudiarla; de este modo, un ensayo útil debe ser además lo suficientemente sensible como para emplear solo una cantidad pequeña del material disponible. Muchos de los ensayos comunes para proteínas requieren solo 10^{-9} a 10^{-12} g de material.

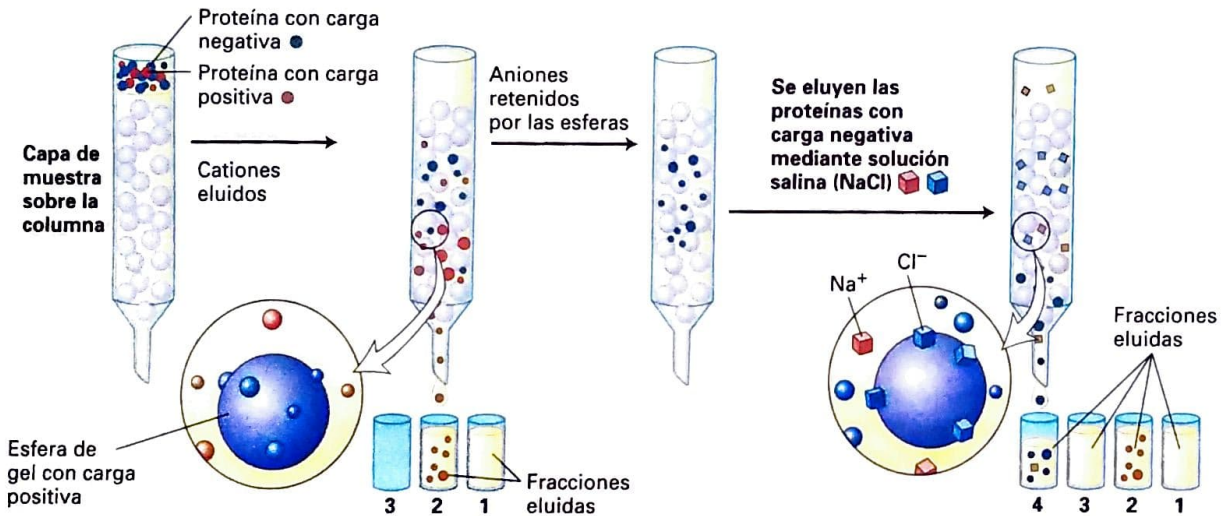
Reacciones enzimáticas cromogénicas y emisoras de luz Muchos ensayos están diseñados para detectar algún aspecto funcional de una proteína. Por ejemplo, las pruebas de actividad enzimática se basan en la capacidad de detectar la desaparición del sustrato o la formación de producto. Algunas pruebas enzimáticas utilizan sustratos cromogénicos, que cambian de color durante la reacción. (Algunos sustratos son cromogénicos por naturaleza; si no lo son, pueden unirse a una molécula que lo sea.) Debido a la especificidad de una enzima por su sustrato, solo las muestras que contengan a la enzima cambiarán de color en presencia de un sustrato cromogénico; la velocidad de la reacción constituye una medida de la cantidad de enzima presente. Las enzimas que catalizan reacciones cromogénicas, también se pueden fusionar o unir químicamente a un anticuerpo, y usarse para “informar” de la presencia o localización de un antígeno al cual se une el anticuerpo (véase más abajo).

Pruebas con anticuerpos Como se mencionó previamente, los anticuerpos tienen la característica distintiva de unirse en forma estrecha y específica a los antígenos. En consecuencia, pueden generarse preparados de anticuerpos que reconocen a un antígeno proteico de interés y emplearlos para detectar la presencia de la proteína, ya sea en una mezcla compleja de otras proteínas (tal como encontrar una

(a) Cromatografía por filtración en gel



(b) Cromatografía de intercambio iónico



(c) Cromatografía de afinidad con anticuerpos

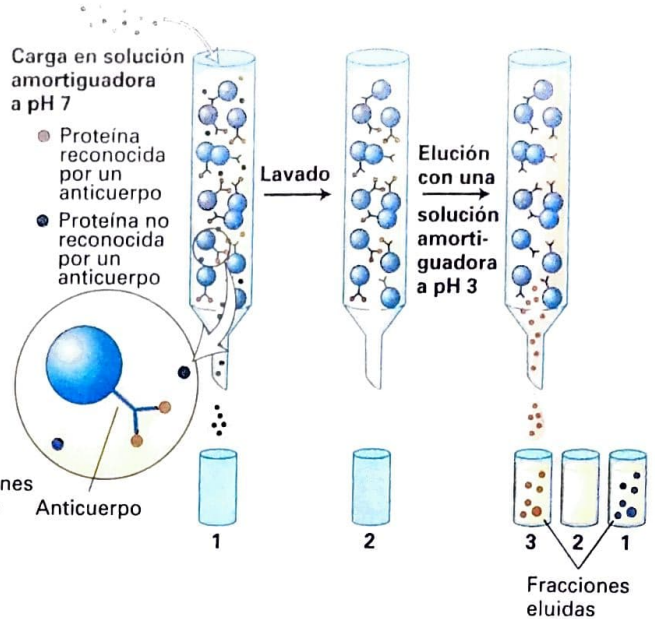


FIGURA EXPERIMENTAL 3-38 Tres técnicas de cromatografía líquida usadas comúnmente separan las proteínas sobre la base de su masa, carga o afinidad por un compañero de unión específico. (a) La cromatografía por filtración en gel separa las proteínas que difieren en tamaño. Una mezcla de proteínas se coloca cuidadosamente formando una capa sobre la parte superior de un cilindro empaquetado con esferas porosas. Las proteínas más pequeñas viajan a través de la columna más lentamente que las más grandes. Así, diferentes proteínas surgen del flujo de elución en la parte inferior de la columna en diferentes momentos (diferentes volúmenes de elución), que pueden ser recogidas en diferentes tubos, llamados *fracciones*.

(b) La cromatografía de intercambio iónico separa proteínas que difieren en carga neta, en columnas empaquetadas con esferas especiales que llevan una carga positiva (que se muestra aquí) o una carga negativa. Las proteínas que tienen la misma carga neta que las esferas son rechazadas y fluyen a través de la columna,

mientras que las que tienen la carga opuesta se unen a las cuentas más o menos estrechamente, dependiendo de sus estructuras. Las proteínas unidas –en este caso las cargadas negativamente– se eluyen posteriormente al hacer pasar un gradiente salino (habitualmente de NaCl o KCl) a través de la columna. A medida que los iones se unen a las esferas, desplazan a las proteínas (las que están unidas más fuertemente requieren una concentración de sal más elevada para ser liberadas). (c) En la cromatografía de afinidad con anticuerpos se hace pasar una mezcla de proteínas a través de una columna empaquetada con esferas, a las cuales se ha unido en forma covalente un anticuerpo específico. Solamente la proteína con alta afinidad por el anticuerpo queda retenida en la columna; todas las proteínas que no se unen fluyen a través de ella. Después de lavar la columna, la proteína unida se eluye con una solución ácida o alguna otra solución que rompe los complejos antígeno-anticuerpo; la proteína liberada fluye luego al exterior de la columna y se la colecta.

aguja en un pajar) o en un preparado parcialmente purificado de una cierta proteína. En general, una molécula de anticuerpo se une fuertemente solo a una pequeña parte de la molécula contra la cual está

dirigido (antígeno), que muestra complementariedad molecular con el anticuerpo. Esta región del antígeno que se une al anticuerpo se llama *epítipo afín* 100

acoplamiento epitopo. Así, la presencia del antígeno que afin un epitopo puede visualizarse marcando el anticuerpo con una enzima, una molécula fluorescente o isótopos radiactivos. Por ejemplo, la luciferasa, una enzima presente en las luciérnagas y algunas bacterias, puede unirse a un anticuerpo. En presencia de ATP y el sustrato luciferina, la luciferasa cataliza una reacción de emisión de luz. En cualquier caso, después de que el anticuerpo se une a la proteína de interés (el antígeno) y el anticuerpo no unido se lava, se añaden los sustratos de la enzima unida y se registra la aparición de color o la emisión de luz. La intensidad es proporcional a la cantidad de anticuerpo unido a la enzima y, por lo tanto, de antígeno de la muestra. Una variación de esta técnica, de particular utilidad para detectar proteínas específicas en las células vivas, emplea la proteína *fluorescente verde* (PFV), una proteína fluorescente natural presente en las medusas (véase la Fig. 9-15). Alternativamente, después de que el primer anticuerpo que no está marcado se une a su proteína diana, un segundo anticuerpo marcado, que puede reconocer al primero, se usa para unirse al complejo del primer anticuerpo con su antígeno diana. Esta combinación de dos anticuerpos permite una sensibilidad muy alta en la detección de la proteína diana, porque el segundo anticuerpo marcado, con frecuencia, es una mezcla de anticuerpos que se unen a múltiples sitios del primer anticuerpo. Es importante recordar que un anticuerpo se une a su epitopo afin —o lo reconoce— sobre un antígeno diana. Si ese epitopo está alterado, por ejemplo porque está parcialmente desplegado, o por modificaciones postraduccionales o porque está boqueado cuando la proteína antigénica está unida a alguna otra molécula, la capacidad de unión del anticuerpo puede estar reducida o haberse perdido por completo. Así, la ausencia de unión al anticuerpo no implica necesariamente que no hay antígeno presente en la muestra, sino solo que el epitopo no está presente o accesible para la unión.

Para generar los anticuerpos, la proteína intacta o un fragmento de ella se inyecta a un animal (por lo general un conejo, ratón o cabra). En ocasiones, un péptido sintético corto (de 10-15 residuos) basado en la secuencia de la proteína se emplea como antígeno para inducir la formación del anticuerpo. Un péptido sintético acoplado a un acarreador proteico grande puede inducir al animal a producir anticuerpos que se unan a esa parte (el epitopo) de la proteína natural de tamaño completo. La unión en forma biosintética o química del epitopo a una proteína no relacionada se llama etiquetado de epitopo. Como veremos a lo largo de este libro, los anticuerpos generados empleando epitopos peptídicos o proteínas intactas son reactivos muy versátiles para el aislamiento, detección y caracterización de las proteínas.

Detección de las proteínas en los geles Las proteínas embebidas en un gel unidimensional o bidimensional habitualmente son invisibles. Los dos enfoques generales para la detección de las proteínas en los geles son etiquetar o teñir las proteínas cuando aún se encuentran dentro del gel, o transferirlas electroforéticamente a una membrana de nitrocelulosa o difluoruro de polivinilideno, y luego detectarlas. Las proteínas dentro de los geles por lo general se tiñen con un colorante orgánico o a base de plata, ambos detectados con luz visible normal o con un colorante fluorescente que requiere un equipo de detección especializado. El azul de Coomassie es el colorante orgánico usado con mayor frecuencia, típicamente empleado para detectar ~ 1 000 ng de proteína, con un límite de detección inferior de ~ 4-10 ng. La tinción con plata o la fluorescente son más sensibles (límite inferior ~ 1 ng). El azul de Coomassie y otros colorantes pueden emplearse también para ver proteínas después de transferirlas a las membranas; sin embargo, el

método más común para ver proteínas en estas membranas es la inmunotransferencia (immunoblotting), también llamada Western blotting.

La **inmunotransferencia** o **immunoblotting** combina el poder de resolución de la electroforesis en gel y la especificidad de los anticuerpos. Este procedimiento de múltiples pasos se usa comúnmente para separar las proteínas e identificar luego una proteína específica de interés. Como se muestra en la Figura 3-39, en este método se emplean dos anticuerpos diferentes, uno específico para la proteína deseada y un segundo que se une al primero y está ligado a una enzima o a otra molécula que permite la detección del primer anticuerpo (y así de la proteína de interés a la cual se une). Las enzimas a las cuales se une el segundo anticuerpo pueden generar un producto coloreado visible, mediante un proceso llamado *quimioluminiscencia*, consistente en producir luz que puede ser rápidamente registrada por una película o por un detector sensible. Los dos anticuerpos diferentes, en ocasiones llamado “sándwich”, se emplean para amplificar la señal y mejorar la sensibilidad. Si no hay anticuerpo disponible, pero está disponible el gen que codifica para la proteína, y puede emplearse para expresarla, los métodos de DNA recombinante (véase el Cap. 5) pueden incorporar un pequeño epitopo peptídico (marcado del epitopo) en la secuencia normal de la proteína, que puede ser detectada por un anticuerpo comercialmente disponible contra ese epitopo.

Los radioisótopos son herramientas indispensables para detectar moléculas biológicas

Un método sensible para detectar una proteína u otra molécula biológica consiste en detectar la radiactividad emitida por radioisótopos introducidos en la molécula. Al menos un átomo de la molécula radiomarcada está presente en forma radiactiva llamado radioisótopo.

Radioisótopos útiles en la investigación biológica Cientos de moléculas biológicas, (p. ej., aminoácidos, nucleósidos y numerosos intermediarios metabólicos) marcados con varios radioisótopos se encuentran disponibles comercialmente. Estos preparados varían considerablemente en su actividad específica, que es la cantidad de radiactividad por unidad de material medida en desintegraciones por minuto (dpm), por milimol. La *actividad específica* de un compuesto marcado depende de la probabilidad de decaimiento del radioisótopo, determinada por su *semivida* o *vida media*, que es el tiempo requerido para que la mitad de los átomos sufran decaimiento radiactivo. En general, cuanto más corta sea la vida media de un radioisótopo, mayor será su actividad específica (Cuadro 3-1).

La actividad específica de un compuesto marcado deberá ser lo suficientemente alta como para que una cantidad adecuada de radiactividad se incorpore a las moléculas que deben ser detectadas con precisión. Por ejemplo, la metionina y la cisteína marcadas con azufre-35 (^{35}S) se usan ampliamente para marcar biosintéticamente proteínas celulares, porque hay disponibles preparados comerciales de estos aminoácidos con altas actividades específicas ($> 10^{15}$ dpm/mmol). De forma similar, los preparados de precursores de ácidos nucleicos marcados con ^3H tienen actividades específicas mucho mayores que las correspondientes a los preparados marcados con ^{14}C . En la mayoría de los experimentos se prefiere a los primeros porque permiten que el RNA o el DNA se marquen adecuadamente después de un período breve de incorporación, o requieren una muestra celular de menor tamaño. Hay varios compuestos que contienen fósforo en los cuales el átomo de fósforo está marcado con el radioisótopo fósforo-32. Dada su alta actividad es-

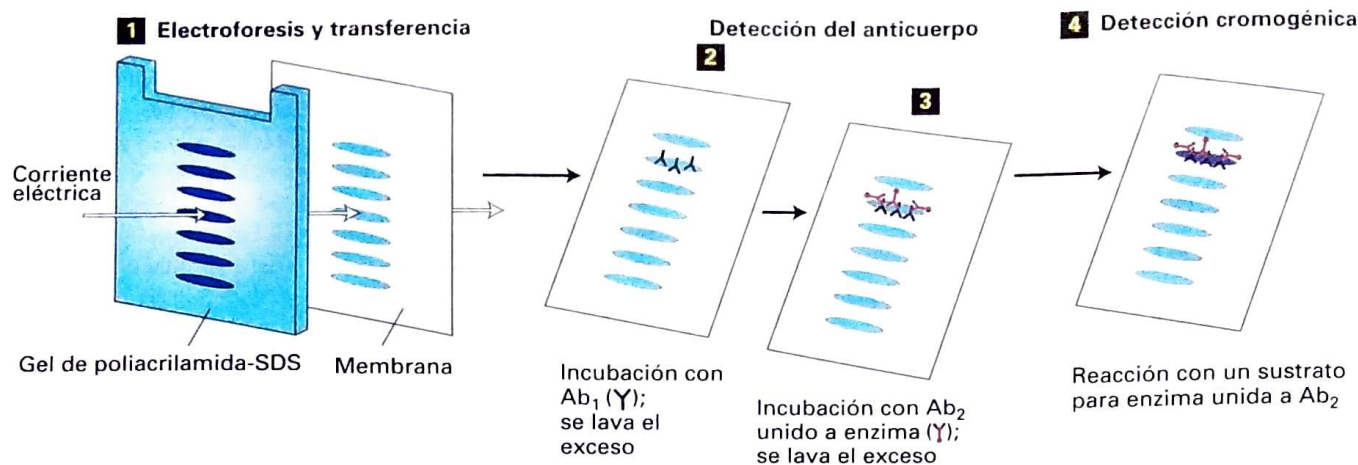


FIGURA EXPERIMENTAL 3-39 El Western blotting (inmunoblotting) combina varias técnicas para resolver y detectar una proteína específica.

Paso **1**: después de que una mezcla proteica ha sido sometida a electroforesis a través de un gel con SDS, las bandas separadas (o manchas para un gel bidimensional) se transfieren (se hacen *blotting*) del gel a una membrana porosa de la cual no se separan fácilmente. Paso **2**: la membrana se sumerge en una solución de anticuerpo (Ab_1) específico para la proteína aislada y se lo incubaba durante un momento. Sólo la banda unida a la membrana que contiene esta proteína se une al anticuerpo, formando una capa de moléculas de anticuerpo (cuya posición no puede verse en este punto). Luego, la membrana se lava

para retirar el anticuerpo no unido (Ab_1). Paso **3**: la membrana se incubaba con un segundo anticuerpo (Ab_2) que reconoce específicamente al primer anticuerpo (Ab_1) y se une a él. Este segundo anticuerpo se une en forma covalente a una enzima (p. ej., fosfatasa alcalina, que puede catalizar una reacción cromogénica), un radioisótopo o alguna otra sustancia cuya presencia pueda detectarse con alta sensibilidad. Paso **4**: finalmente, se detecta la localización y cantidad del Ab_2 unido (p. ej., por un precipitado morado oscuro a partir de una reacción cromogénica) que permite que la movilidad electroforética (y por lo tanto la masa) de la proteína sea determinada, como también su cantidad (de acuerdo con la intensidad de la banda).

pecífica, los nucleótidos marcados con ^{32}P se usan rutinariamente para marcar ácidos nucleicos en sistemas libres de células.

Los compuestos marcados en los cuales el radioisótopo reemplaza los átomos presentes normalmente en la molécula, tienen virtualmente las mismas propiedades químicas que los compuestos correspondientes no marcados. Las enzimas, por ejemplo, en general, no pueden distinguir entre los compuestos marcados de este modo y los sustratos no marcados. La presencia de estos átomos radiactivos está indicada con el isótopo entre paréntesis (sin guion) como prefijo (p. ej., [3H]leucina). Por el contrario, el marcaje de casi todas las biomoléculas (p. ej., pro-

teínas o ácidos nucleicos) con el radioisótopo yodo-125 (^{125}I) requiere la adición covalente de ^{125}I a una molécula que normalmente no tiene yodo como parte de su estructura. Dado que este proceso de marcaje modifica la estructura química, la actividad biológica de la molécula marcada puede diferir, en cierta medida, de la forma no marcada. La presencia de tales átomos radiactivos está indicada con el isótopo como prefijo mediante un guion (no un paréntesis), (p. ej., ^{125}I -tripsina). Los métodos estándar para el marcaje de proteínas con ^{125}I resultan en la unión covalente del ^{125}I principalmente a los anillos aromáticos de las cadenas laterales de la tirosina (monoyodotirosina y diyodotirosina). Los isótopos no radiactivos se usan cada vez con mayor frecuencia en la biología celular, especialmente en estudios de resonancia magnética nuclear y en aplicaciones de espectroscopia de masas, como se explicará más adelante.

Cuadro 3-1 Radioisótopos usados con frecuencia en la investigación biológica

Isótopo	Vida media
Fósforo-32	14,3 días
Yodo-125	60,4 días
Azufre-35	87,5 días
Tritio (hidrógeno-3)	12,4 años
Carbono-14	5 730,4 años

Experimentos de marcaje y detección de moléculas radiomarcadas Si los compuestos marcados se detectan por **autorradiografía**, un ensayo visual semicuantitativo, o si la radiactividad se mide mediante un “contador” adecuado, un ensayo altamente cuantitativo, que puede determinar la cantidad de material radiomarcado de una muestra, dependerá de la naturaleza del experimento. En algunos experimentos se emplean ambos tipos de detección.

En un uso de la autorradiografía, un tejido, célula o constituyente celular se marca con una molécula radiactiva, el material radiactivo no asociado se lava y la estructura de la muestra se estabiliza mediante un

entrecruzamiento químico de las macromoléculas de la muestra ("fijación") o congelándola. Luego, se superpone a la muestra una emulsión fotográfica sensible a la radiación. Se revela la emulsión y aparecen pequeños granos de plata, cuya distribución corresponde a la del material radiactivo, y habitualmente se detecta mediante un microscopio. Los estudios radioautográficos de células completas fueron cruciales para determinar los sitios intracelulares en los cuales se sintetizan varias macromoléculas, y los movimientos posteriores de estas macromoléculas en el interior de las células. Varias técnicas que emplean microscopía fluorescente, y que describimos en el Capítulo 9, han suplantado en gran medida a la radioautografía en los estudios de este tipo. Sin embargo, la radioautografía, en ocasiones, se emplea en varios ensayos para detectar secuencias de DNA o RNA aisladas, específicas, en localizaciones particulares de los tejidos (véase el Cap. 5), mediante una técnica conocida como hibridización *in situ*.

Las mediciones cuantitativas de la cantidad de radiactividad en un material marcado se realizan con varios instrumentos distintos. Un detector Geiger mide los iones producidos en un gas, por las partículas β o rayos γ emitidos por un radioisótopo. Estos instrumentos son, básicamente, dispositivos manuales empleados para controlar la radiactividad en el laboratorio, para proteger a los investigadores del exceso de exposición. En un contador de centelleo, una muestra radiomarcada se mezcla con un compuesto fluorescente líquido que emite un destello de luz cuando absorbe la energía de las partículas β o de los rayos γ liberados en el decaimiento del radioisótopo; un fototubo del instrumento detecta las cuentas de estos destellos de luz. Las imágenes fosforadas se usan para detectar la radiactividad empleando un detector bidimensional, que almacena datos digitales acerca del número de decaimientos en desintegraciones por minuto por píxeles en el área de superficie. Estos instrumentos, que pueden pensarse como un tipo de película electrónica reutilizable, se emplean generalmente para cuantificar moléculas radiactivas separadas por electroforesis en gel y están reemplazando a las emulsiones fotográficas para este propósito.

La combinación de marcación y técnicas bioquímicas y de métodos de detección cuantitativa y visual, con frecuencia se emplea en los experimentos de marcación. Por ejemplo, para identificar a las proteínas principales sintetizadas por un tipo celular particular, una muestra de células se incuba con un aminoácido radiactivo (p. ej., [^{35}S]metionina) durante unos pocos minutos, tiempo durante el cual el aminoácido marcado entra a las células y se mezcla con el conjunto celular de aminoácidos no marcados y parte del aminoácido marcado se incorpora biosintéticamente a la proteína recién sintetizada. Luego, el aminoácido radiactivo no incorporado se lava, eliminándose de las células. Estas células se cosechan, la mezcla de proteínas celulares se extrae de ellas (p. ej., mediante una solución detergente) y luego se separa mediante cualquiera de los métodos usados frecuentemente para resolver mezclas de proteínas complejas en componentes individuales. La electroforesis en gel, en combinación con la radioautografía o un análisis de imágenes fosforadas, es con frecuencia el método elegido. Las bandas radiactivas del gel corresponden a las proteínas recién sintetizadas, que tienen incorporado al aminoácido radiactivo. Para detectar la proteína específica de interés, más que la totalidad de las proteínas radiomarcadas biosintéticamente, puede emplearse un anticuerpo específico contra la proteína de interés, para precipitarla separándola del resto de las proteínas presentes en la muestra (inmunoprecipitación). Luego, el precipitado se solubiliza en condiciones desnaturalizantes, por ejemplo en una solución amortiguadora que contenga SDS, para separar el anticuerpo de la proteína, y la muestra se analiza mediante PAGE-SDS

seguido de radioautografía. En este tipo de experimento, un compuesto fluorescente activado por la radiación ("centellador") puede infundirse al gel al terminar la separación electroforética, de tal modo que la luz emitida pueda emplearse para detectar la presencia de la proteína marcada, ya sea empleando una película o un detector electrónico bidimensional. Este método es de particular utilidad para los emisores débiles tales como el ^3H .

Los experimentos de **pulso** y **caza** son de particular utilidad para trazar los cambios en la localización intracelular de las proteínas o la modificación en la localización de una proteína o de un metabolito en el tiempo. En este protocolo experimental, una muestra celular se expone a un compuesto radiomarcado que puede ser incorporado o unido de otro modo a una molécula celular de interés —el "pulso"— durante un período breve. El pulso termina cuando las moléculas radiactivas no incorporadas se lavan y las células se exponen a un gran exceso de compuesto idéntico pero no marcado, para diluir la radiactividad de cualquier compuesto radiactivo remanente pero no incorporado. Este procedimiento evita la incorporación adicional de cantidades significativas de marca radiactiva después del período de "pulso", e inicia el período de "caza" (Fig. 3-40). Las muestras tomadas periódicamente durante el período de caza se ensayan para determinar la localización o la forma química de la marca radiactiva en función del tiempo. Con frecuencia, los experimentos de pulso y caza en los cuales la proteína se detecta por radioautografía después de la inmunoprecipitación y el SDS-PAGE, se emplean para seguir la velocidad de síntesis, modificación y degradación de las proteínas, añadiendo aminoácidos precursores radiactivos durante el pulso y detectando luego las cantidades y características de las proteínas radiactivas durante la caza. De este modo, pueden observarse las modificaciones postsintéticas de la proteína que cambian su movilidad electroforética y la velocidad de degradación de una proteína específica que se detecta a medida que la señal se pierde al aumentar el tiempo de caza. Un uso clásico de la técnica de pulso y caza fue el de los estudios empleados para elucidar la vía atravesada por las proteínas secretadas, desde su sitio de síntesis en el retículo endoplasmático hasta la superficie de las células (véase el Cap. 14).

La espectrometría de masas puede determinar la masa y secuencia de las proteínas

La espectrometría de masas (EM) es una técnica poderosa para caracterizar a las proteínas, en especial para determinar la masa de una proteína o fragmentos de ella. Con información de este tipo en mano, también es posible determinar parte de la secuencia de una proteína o toda ella. Este método permite una determinación directa muy precisa del cociente masa (m) de una molécula cargada (ion molecular) con relación a su carga (z), o m/z . Se usan luego técnicas para deducir la masa absoluta del ion molecular. Hay cuatro características clave de todos los espectrómetros de masas. La primera es una fuente iónica, desde la cual la carga, por lo general en forma de protones, se transfiere al péptido o a las moléculas de proteína. La formación de estos iones ocurre en presencia de un campo eléctrico alto, que luego dirige los iones moleculares cargados al segundo componente clave, el analizador de masas. El analizador de masas, que siempre está en una cámara de alto vacío, separa físicamente los iones de acuerdo con sus diferentes cocientes masa a carga (m/z). Los iones separados de acuerdo con su masa, luego se dirigen para impactar en un detector, el tercer componente clave, que proporciona una medida de la abundancia relativa de cada uno de los iones de la

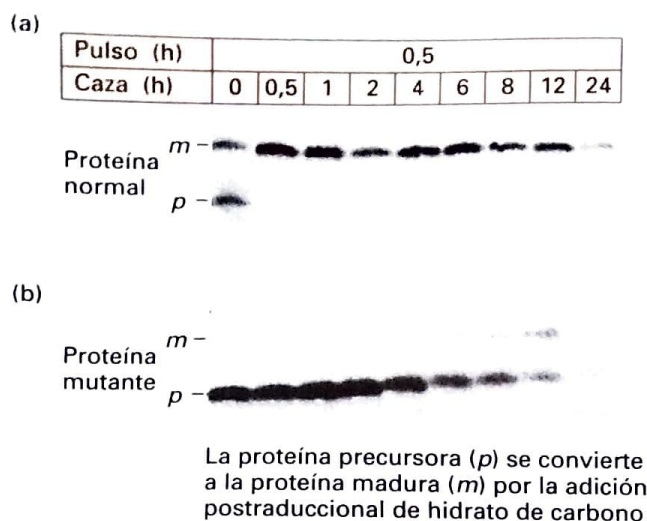


FIGURA EXPERIMENTAL 3-40 Los experimentos de pulso y caza pueden seguir la huella de la vía de la modificación de las proteínas o de su movimiento dentro de las células.

(a) Para seguir el destino de una proteína específica recién sintetizada en una célula, estas se incubaron con [^{35}S] metionina durante 0,5 h (el pulso) para marcar todas las proteínas recién sintetizadas, y luego se lavó el aminoácido radioactivo no incorporado. Las células se incubaron adicionalmente (la caza) durante tiempos variables hasta 24 horas y se sometió a las muestras de cada uno de los tiempos de caza a la inmunoprecipitación para aislar una proteína específica (aquí el receptor de lipoproteínas de baja densidad). El SDS-PAGE de los inmunoprecipitados seguido de autorradiografía permitió la visualización de la proteína específica que inicialmente se sintetiza como un pequeño precursor (*p*) y luego se modifica rápidamente a una forma madura más grande (*m*) por la adición de hidratos de carbono. Aproximadamente la mitad de la proteína marcada se convirtió de *p* a *m* durante el pulso; el resto se convirtió después de 0,5 h de caza. La proteína permanece estable durante 6-8 horas antes de comenzar a degradarse (indicado por una reducción en la intensidad de la banda). (b) El mismo experimento se llevó a cabo en células en las cuales se sintetiza una forma mutante de la proteína. La forma mutante *p* no puede convertirse adecuadamente a la forma *m* y se degrada con mayor rapidez que la proteína normal. (Adaptado de K. F. Kozarsky, H. A. Brush y M. Krieger, 1986, *J. Cell. Biol.* **102**(5):1567-1575.)

muestra. El cuarto componente esencial es un sistema de datos computadorizado, que se emplea para calibrar el instrumento; adquiere, almacena y procesa los datos resultantes y con frecuencia dirige el instrumento en forma automática, para reunir tipos específicos de datos adicionales de la muestra sobre la base de las observaciones iniciales. Este tipo de retroalimentación automatizada se emplea para métodos de secuenciación de péptidos con EM en tándem de péptidos (EM/EM), que se describen más adelante.

Los dos métodos usados con mayor frecuencia para generar iones de proteínas y fragmentos proteicos son (1) la desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI) y (2) el aerosol de electrones (electrospray) (AE). En la MALDI (Fig. 3-41), el péptido o la proteína de la muestra se mezclan con un ácido orgánico de bajo peso molecular que absorba la UV (la matriz) y luego se secan en un metal efector. La energía de un láser se ioniza y vaporiza la muestra produciendo iones moleculares de carga única, a partir de las moléculas constituyentes. En el AE (Fig. 3-42a) la muestra de péptidos o proteínas de la solución

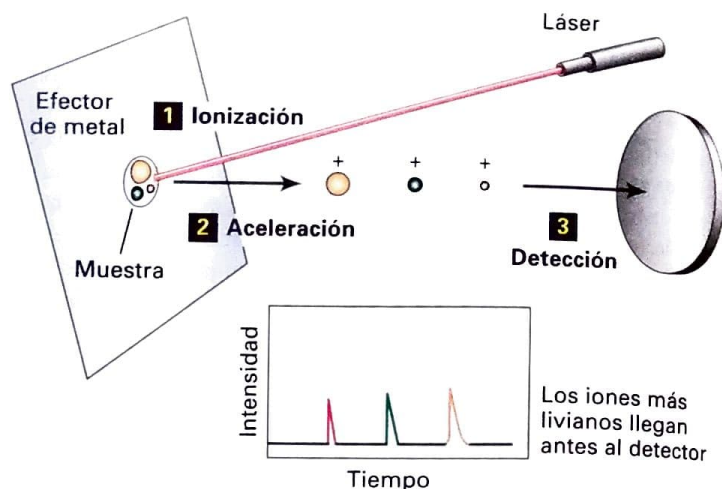


FIGURA EXPERIMENTAL 3-41 La masa molecular puede determinarse mediante la espectrometría de masas por desorción/ionización láser asistida por matriz con tiempo de vuelo (MALDI-TOF).

En el espectrómetro MALDI-TOF, los pulsos de luz de un láser ionizan una mezcla de proteínas o de péptidos, que se absorbe sobre un efector metálico (paso 1). Un campo eléctrico acelera los iones de la muestra hacia el detector (pasos 2 y 3). El tiempo hasta el detector es proporcional a la raíz cuadrada del cociente masa a carga (m/z). Para los iones con la misma carga, los más pequeños se moverán más rápido (un tiempo más corto hasta el detector). El peso molecular se calcula utilizando el tiempo de vuelo de un estándar.

se convierte en un rocío fino de gotitas diminutas, formando un aerosol a través de un capilar estrecho a presión atmosférica. Las gotitas se forman en presencia de un campo eléctrico alto, lo que las vuelve altamente cargadas. Las gotitas se evaporan en su corto vuelo (mm) hasta la entrada del analizador del espectrómetro de masas, formando múltiples iones cargados a partir de los péptidos y las proteínas. Los iones gaseosos se muestrean en la región del analizador del EM donde luego se aceleran por acción de campos eléctricos y se separan mediante el analizador de masas sobre la base de su m/z .

Los dos analizadores de masas usados con mayor frecuencia son los instrumentos de tiempo de vuelo (TOF) y las trampas iónicas. Los instrumentos TOF explotan el hecho de que el tiempo que le toma a un ion atravesar la longitud del analizador antes de alcanzar el detector es proporcional a la raíz cuadrada del m/z (los iones más pequeños se mueven más rápido que los de mayor tamaño con igual carga; véase Fig. 3-41). En los analizadores de trampa iónica se usan campos eléctricos ajustables para capturar o "atrapar" iones con una m/z específica y para hacer pasar en forma secuencial los iones atrapados en el exterior del analizador, hacia el detector (véase la Fig. 3-42a). Al variar los campos eléctricos, los iones con un amplio espectro de valores m/z pueden ser examinados uno a la vez, produciendo un espectro de masas, que es un gráfico de m/z (eje x) versus la abundancia relativa (eje y) (Fig. 3-42b, panel superior).

En los instrumentos en tándem o EM/EM, cualquier ion parental en el espectro de masa original (Fig. 3-42b, panel superior) puede ser seleccionado por su masa, fraccionado en iones más pequeños por colisión con el gas inerte y luego puede medirse el m/z y la abundancia

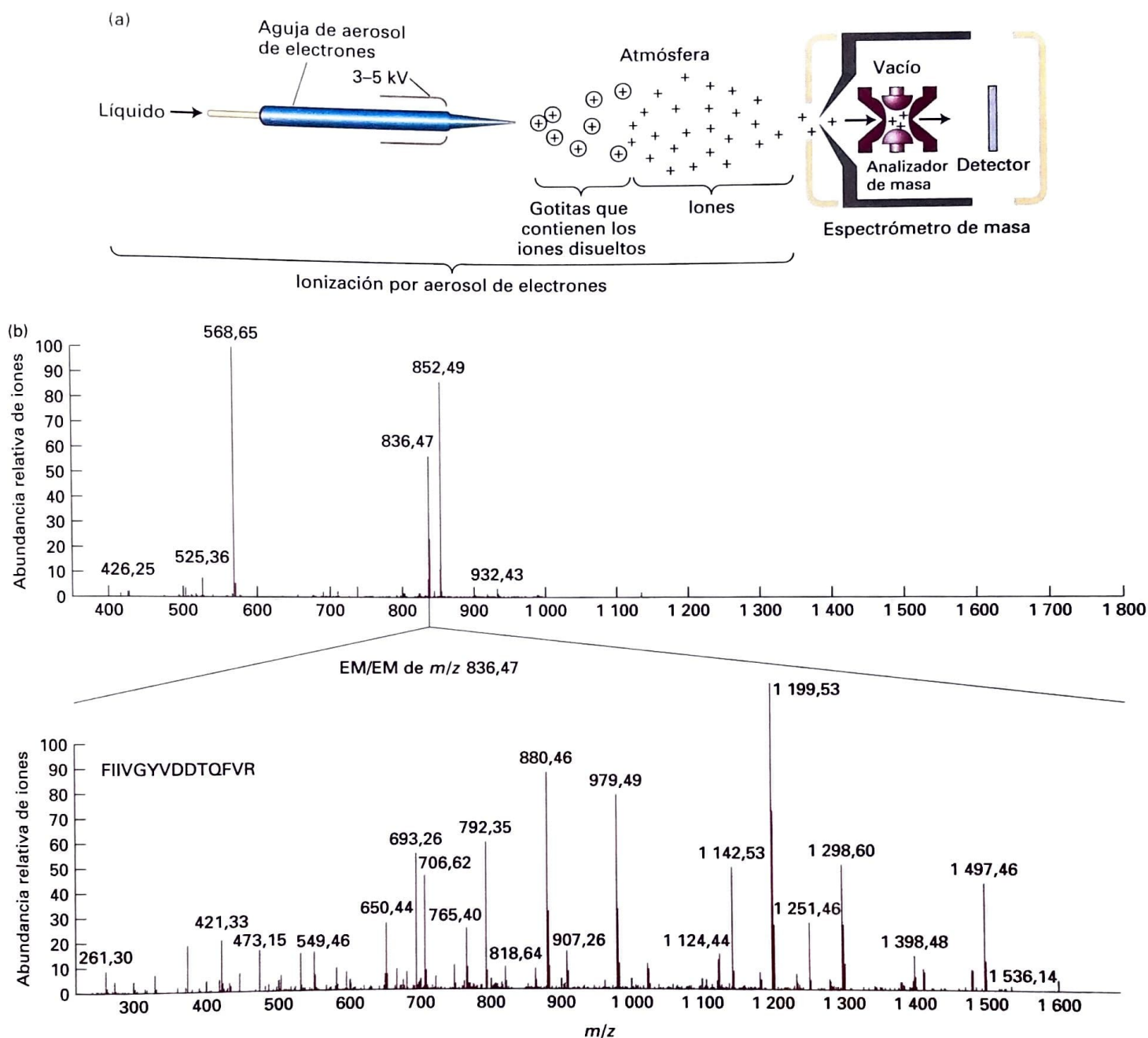


FIGURA EXPERIMENTAL 3-42 La masa molecular de las proteínas y los péptidos pueden determinarse por ionización de un aerosol de electrones en un espectrómetro de masas con trampa iónica.

(a) La ionización del aerosol de electrones (AE) convierte a las proteínas y los péptidos de una solución en iones gaseosos muy cargados al hacer pasar la solución a través de una aguja (formando las gotitas) que tiene un alto voltaje a través de ella (cargando las gotitas). Al evaporar el solvente, se producen iones gaseosos que entran a un espectrómetro de masas. Los iones se analizan mediante un analizador de masas con una trampa iónica, que luego dirige los iones hacia el detector. (b) *Panel superior*: espectro másico de una mezcla de tres péptidos mayores y varios péptidos menores presentada según la abundancia relativa de los iones que impactan en el detector (eje y) como función del cociente masa a carga (m/z) (eje x). *Panel inferior*: en un instrumento EM/EM como

la trampa iónica que se muestra en la parte (a), un ion peptídico específico puede seleccionarse para ser fragmentado en iones más pequeños que luego se analizan y se detectan. El espectro EM/EM (llamado también espectro iónico del producto) proporciona información estructural detallada acerca del ion parental, lo que incluye la información de secuencia de los péptidos. Aquí, el ion con una m/z de 836,47 se seleccionó y se fragmentó y se midió el espectro másico m/z de los iones producto. Nótese que ya no hay un ion con una m/z de 836,47 porque éste se fragmentó. A partir de los diferentes tamaños de los iones producto, los valores conocidos de los fragmentos aminoácidos individuales m/z , la comprensión de los enlaces peptídicos que con frecuencia se escinden en estos experimentos y la información de las bases de datos, puede deducirse la secuencia del péptido, FIIVGYVDDTQFVR. (Parte [a] basada sobre una figura de S. Carr; parte [b], datos no publicados de S. Carr.)

relativa de los iones fragmentados resultantes (Fig. 3-42b, *panel inferior*), todo dentro de la misma máquina en aproximadamente 0,1 s por ion parental seleccionado. Este segundo ciclo de fragmentación y análisis permite que sean determinadas las secuencias de péptidos cortos (menores de 25 aminoácidos), porque la fragmentación por colisión ocurre principalmente en los enlaces peptídicos, de modo tal que las diferencias de masa entre los iones corresponden a las masas dentro de las cadenas de los aminoácidos individuales, lo cual permite deducir la secuencia, en conjunto con la información sobre la secuencia en la base de datos (Fig. 3-42b, *panel inferior*).

La espectrometría de masas es muy sensible, capaz de detectar hasta 1×10^{-16} moles (100 atomoles) de un péptido o 10×10^{-15} moles (10 femtomoles) de una proteína de PM 200 000. Los errores de precisión en la medición de la masa dependen del analizador de masas específico empleado, pero por lo general son $\sim 0,01\%$ para los péptidos y $\sim 0,05\text{--}0,1\%$ para las proteínas. Como se describirá en la Sección 3.6, más adelante, es posible usar la EM para analizar mezclas complejas de proteínas y proteínas purificadas. Por lo común, las muestras de proteínas son digeridas por proteasas y los productos de la digestión peptídica se someten a análisis. Una aplicación muy poderosa de la EM consiste en tomar una mezcla compleja de proteínas de una muestra biológica, digerirla con tripsina u otras proteasas, separar parcialmente los componentes empleando cromatografía líquida (CL) y luego transferir la solución que fluye de la columna de cromatografía directamente a un espectrómetro de masas AE en tándem. Esta técnica, llamada *CL-EM/EM*, permite el análisis casi continuo de una mezcla muy compleja de proteínas.

Las abundancias de los iones, determinadas por espectrometría de masas en cualquier muestra dada, son valores relativos y no absolutos. Por lo tanto, si uno desea emplear la EM para comparar las cantidades de una proteína particular en dos muestras diferentes (p. ej., de un organismo normal con respecto a un organismo mutante) es necesario tener un estándar interno en las muestras, cuyas cantidades no difieran entre las dos muestras. Entonces, se determinan las cantidades de la proteína de interés con relación a las del estándar de cada muestra. Esto permite comparaciones de los niveles de proteínas entre las muestras, cuantitativamente precisas. Un enfoque alternativo implica la comparación simultánea de las cantidades de proteínas de dos células diferentes o muestras de tejidos que se encuentran mezcladas. Para hacer esto, los investigadores incuban primero una de las muestras con aminoácidos que contengan átomos del isótopo “pesado”. Estos se incorporan por biosíntesis en todas las proteínas de la muestra. Las proteínas de las dos muestras se mezclan luego y se analizan por espectrometría de masas. Las proteínas y péptidos derivados de la muestra “pesada” pueden distinguirse en el espectrómetro de masas de los de la otra, la muestra “liviana”, por sus masas más pesadas. Así, puede hacerse una comparación directa de las cantidades relativas de cada proteína en cada muestra. Cuando las muestras son células cultivadas en el laboratorio, el método se llama marcación isotópica estable con aminoácidos en el cultivo celular (SILAC).

La estructura primaria de una proteína puede determinarse con métodos químicos y a partir de secuencias génicas

El método clásico para la determinación de la secuencia de aminoácidos de una proteína es la degradación de Edman. En este procedimiento, se marca el grupo amino libre del aminoácido N-terminal de un polipéptido y el aminoácido marcado luego se escinde del polipép-

tido y se lo identifica mediante cromatografía líquida de alta presión. El polipéptido queda entonces con un residuo menos y tiene un nuevo aminoácido en el extremo N-terminal. Se repite el ciclo acortando el polipéptido hasta que se hayan identificado todos los residuos.

Antes de 1985, los biólogos usaban el procedimiento químico de Edman frecuentemente para determinar las secuencias proteicas. Sin embargo, en la actualidad con frecuencia las secuencias completas de las proteínas se determinan principalmente analizando las secuencias del genoma. Ya se han secuenciado los genomas completos de varios organismos, y las bases de datos de las secuencias genómicas de los seres humanos y de numerosos organismos modelo se están expandiendo con rapidez. Como se analizará en el Capítulo 5, las secuencias de las proteínas pueden deducirse de las secuencias de DNA que se predice que codificarán proteínas.

Un poderoso enfoque para determinar la estructura primaria de una proteína aislada combina la EM y el empleo de bases de datos de secuencias. En primer término, el péptido “huella digital másica” de la proteína, se obtiene mediante EM. La *huella digital de la masa del péptido* es el listado de los pesos moleculares de los péptidos generados por la digestión de la proteína con una proteasa específica como la tripsina. Los pesos moleculares de la proteína parental y de sus fragmentos proteolíticos se emplean luego para buscar en las bases de datos genómicas cualquier proteína de tamaño similar, con mapas másicos de péptidos similares o idénticos. La espectrometría de masas puede emplearse también para secuenciar directamente péptidos, empleando EM/EM como se describió más arriba.

La conformación de las proteínas se determina mediante métodos físicos sofisticados

En este capítulo hemos enfatizado que la función proteica depende de la estructura de las proteínas. Así, para entender con exactitud de qué manera funciona una proteína, debe determinarse su estructura tridimensional. La determinación de la conformación de una proteína requiere métodos físicos sofisticados y análisis complejos de los datos experimentales. Describiremos brevemente tres métodos empleados para generar modelos tridimensionales de las proteínas.

Cristalografía de rayos X El uso de la **cristalografía de rayos X** para determinar las estructuras tridimensionales de las proteínas fue un desarrollo de Max Perutz y John Kendrew en la década de 1950. En esta técnica, haces de rayos X pasan a través de un cristal de proteína, en el que millones de moléculas de proteínas están alineadas con precisión en una disposición cristalina rígida. Las longitudes de onda de los rayos X tienen aproximadamente 0,1–0,2 nm, lo suficientemente cortas como para determinar las posiciones de los átomos individuales en la proteína. Los electrones de los átomos del cristal dispersan los rayos X, lo que produce un patrón de difracción de manchas individuales, cuando se las intercepta en una película fotográfica o un detector electrónico (Fig. 3-43). Los patrones de este tipo son sumamente complejos —compuestos por hasta 25 000 manchas de difracción o reflexiones cuyas intensidades medidas varían dependiendo de la distribución de los electrones, la que a su vez está determinada por la estructura atómica y la conformación tridimensional de la proteína. Deben hacerse cálculos elaborados y modificaciones de la proteína (como la unión de metales pesados) para interpretar el patrón de difracción, y calcular la distribución de los electrones (llamado el *mapa de densidad electrónica*). Con el mapa de densidad electrónica tridimensional en mano, es

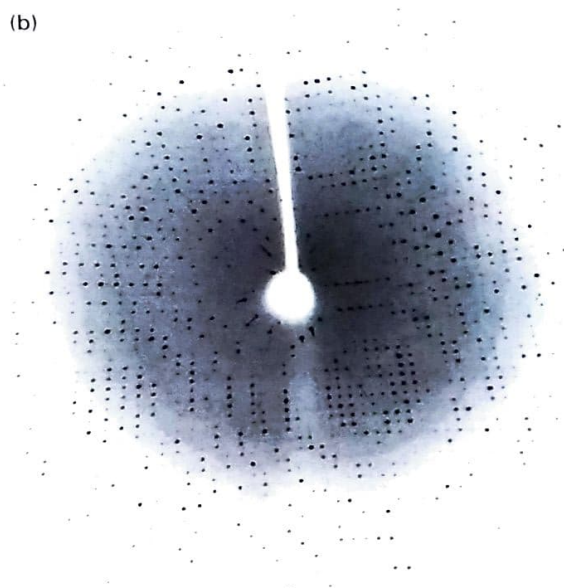
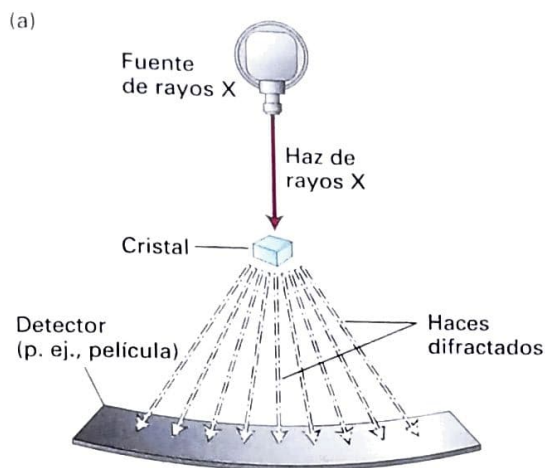


FIGURA EXPERIMENTAL 3-43 La cristalografía de rayos X proporciona datos de difracción a partir de los cuales puede determinarse la estructura tridimensional de una proteína. (a) Componentes básicos de una determinación cristalográfica de rayos X. Cuando un haz estrecho de rayos X impacta sobre un cristal, parte de él lo atraviesa y el resto se dispersa (difracta) en varias direcciones. La intensidad de las ondas difractadas, que forman disposiciones periódicas de manchas de difracción, se registra en una película sensible a los rayos X, o con un detector electrónico de estado sólido. (b) Patrón de difracción de los rayos X para un cristal de proteína, recogido en un detector de estado sólido. A partir de análisis complejos de los patrones de manchas como éste, puede determinarse la localización de los átomos de una proteína. (Parte [a] adaptada de L. Stryer, 1995, *Biochemistry*, 4th ed., W. H. Freeman and Company, p. 64; parte [b] cortesía de J. Berger.)

posible entonces “adecuar” un modelo molecular de la proteína para que encaje en la densidad electrónica, y estos modelos son los que uno ve en los distintos diagramas de proteínas de este libro (p. ej., la Fig. 3-8). El proceso es análogo al de la reconstrucción de la forma precisa de una roca, a partir de las ondas que crea cuando cae en un estanque.

Si bien en ocasiones las estructuras de parte de la proteína no pueden definirse con claridad, al emplear la cristalografía de rayos X los investigadores determinan en forma sistemática las estructuras de tipos representativos de la mayoría de las proteínas. Hasta la fecha se han establecido, mediante el uso de cristalografía de rayos X, las estructuras tridimensionales de más de 18 000 proteínas. Estas estructuras pueden encontrarse en el Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>), cada uno con su propia entrada PDB.

Microscopia crioelectrónica Si bien algunas proteínas cristalizan fácilmente, obteniéndose cristales de otras —particularmente las proteínas con múltiples subunidades grandes y las asociadas con las membranas— se requiere un esfuerzo que requiere tiempo y, con frecuencia, encontrar las condiciones adecuadas es un método de ensayo y error, asistido por robótica, en el caso de que sea posible para todas las proteínas. (Desarrollar cristales adecuados para los estudios estructurales es tanto un arte como una ciencia). Hay varias formas de determinar las estructuras de las proteínas difíciles de cristalizar. Una de ellas es la microscopia crioelectrónica. En esta técnica, una muestra proteica se congela rápidamente en helio líquido para preservar su estructura y examinarla luego en el estado congelado, hidratado, en un microscopio crioelectrónico. Se toman fotografías de la proteína en varios ángulos y se graban en una película empleando una baja dosis de electrones para evitar el daño inducido por radiación a la estructura. Sofisticados programas de computación analizan las imágenes y reconstruyen la estructura de la proteína en las tres dimensiones. Recientes avances en la microscopia crioelectrónica permiten a los investigadores generar modelos moleculares que pueden ayudar a comprender cómo funcionan las proteínas. El empleo de la microscopia crioelectrónica y de otros tipos de microscopia electrónica para ver las estructuras celulares se analiza en el Capítulo 9.

Espectroscopia por RMN Las estructuras tridimensionales de las proteínas pequeñas, que contienen hasta 200 aminoácidos, pueden estudiarse rutinariamente con la resonancia magnética nuclear (RMN). Enfoques especializados pueden emplearse para extender el espectro de tamaños a proteínas algo mayores. En esta técnica, una solución proteica concentrada se coloca en un campo magnético y se miden los efectos de diferentes radiofrecuencias en los estados de spin nucleares de átomos distintos. El estado de spin de cualquier átomo se ve afectado por los átomos vecinos de residuos adyacentes, de modo tal que los residuos ubicados en la vecindad tienen mayor influencia que los distantes. De acuerdo con la magnitud del efecto, puede calcularse la distancia entre los residuos mediante un proceso semejante a la triangulación; luego, estas distancias se emplean para generar un modelo de la estructura tridimensional de la proteína. Una distinción importante entre la cristalografía de rayos X y la espectroscopia de RMN es que el primer método determina en forma directa las ubicaciones de los átomos, mientras que el último determina en forma directa las distancias entre ellos.

Si bien la RMN no requiere la cristalización de una proteína, una ventaja definitiva, esta técnica se limita a proteínas más pequeñas que unos 20 kDa. Sin embargo, el análisis mediante RMN puede proporcionar información acerca de la capacidad de una proteína de adoptar un conjunto de conformaciones muy relacionadas, aunque no exactamente idénticas, y de moverse entre estas conformaciones (dinámica proteica). Esta es una característica común de las proteínas que no son estructu-

ras absolutamente rígidas, sino que pueden “respirar” o mostrar ligeras variaciones en las posiciones relativas de sus átomos constituyentes. En algunos casos, estas variaciones pueden tener importancia funcional, por ejemplo en el modo en que las proteínas se unen entre sí. El análisis estructural de la RMN ha sido de particular utilidad en el estudio de los dominios proteicos aislados, que con frecuencia pueden obtenerse como estructuras estables y tienden a ser lo suficientemente pequeños como para emplear esta técnica. Hasta la fecha hay más de 5 000 estructuras proteicas determinadas mediante RMN disponibles en el Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>).

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 3.5

Purificación, detección y caracterización de proteínas

- Las proteínas pueden separarse de otros componentes celulares y entre sí sobre la base de diferencias en sus propiedades físicas y químicas.
- Se emplean distintos ensayos para detectar y cuantificar a las proteínas. Algunos emplean una reacción lumínica para generar una señal detectable rápidamente. Otros ensayos producen una señal coloreada amplificada con enzimas y sustratos cromogénicos.
- La centrifugación separa las proteínas sobre la base de sus velocidades de sedimentación que se ven afectadas por sus masas y sus formas (véase la Fig. 3-35).
- La electroforesis separa las proteínas sobre la base de sus velocidades de movimiento en un campo eléctrico aplicado. La electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS) puede resolver cadenas polipeptídicas que difieran en un 10% o menos en su peso molecular (véase la Fig. 3-36). La electroforesis en gel bidimensional proporciona resolución adicional al separar las proteínas, primero por su carga (primera dimensión) y luego por su masa (segunda dimensión).
- La cromatografía líquida separa las proteínas sobre la base de sus velocidades de movimiento a través de una columna en la que se encuentran perlas esféricas empaquetadas. Las proteínas que difieren en masa se resuelven filtrándolas en columnas de gel; las que difieren en carga, en columnas de intercambio iónico; las que difieren en propiedades de unión al ligando, en columnas de afinidad que incluyen a la cromatografía de afinidad basada en anticuerpos (véase la Fig. 3-38).
- Los anticuerpos son reactivos poderosos usados para detectar, cuantificar y aislar proteínas.
- El inmunoblotting, llamado también *Western blotting*, es un método empleado con frecuencia para estudiar proteínas específicas, que explota la alta especificidad y sensibilidad de la detección proteica por los anticuerpos y la alta resolución para separar proteínas del PAGE-SDS (véase la Fig. 3-39).
- Los isótopos, tanto los radiactivos como los no radiactivos “pesados” o “livianos”, desempeñan un papel central en el estudio de las proteínas y

de otras biomoléculas. Pueden ser incorporados a las moléculas sin cambiar la composición química de éstas o como etiquetas añadidas. Pueden emplearse para ayudar a detectar la síntesis, localización, procesamiento y estabilidad de las proteínas.

- La radioautografía es una técnica semicuantitativa empleada para detectar moléculas marcadas radioactivamente en células, tejidos o geles de electroforesis.
- La marcación por pulso y caza puede determinar el destino intracelular de las proteínas y de otros metabolitos (véase la Fig. 3-40).
- La espectrometría de masas es un método muy sensible y de alta precisión empleado para detectar, identificar y caracterizar proteínas y péptidos.
- Las estructuras tridimensionales de las proteínas se obtienen por cristalografía de rayos X, microscopía crioelectrónica y espectroscopia RMN. La cristalografía de rayos X proporciona las estructuras más detalladas pero requiere la cristalización de las proteínas. La microscopía crioelectrónica es más útil para los complejos proteicos grandes que son difíciles de cristalizar. Sólo las proteínas relativamente pequeñas son susceptibles del análisis por RMN.

3.6 Proteómica

Durante la mayor parte del siglo XX, el estudio de las proteínas quedó restringido principalmente al análisis de las proteínas individuales. Por ejemplo, uno estudiaría una enzima determinando su actividad enzimática (sustratos, productos, velocidad de la reacción, requerimiento de cofactores, pH, etc.), su estructura y su mecanismo de acción. En algunos casos, también pueden estudiarse las relaciones entre unas pocas enzimas que participan en una vía metabólica. En una escala más amplia, la localización y actividad de una enzima podría examinarse en el contexto de una célula o un tejido. Los efectos de las mutaciones, enfermedades o drogas sobre la expresión y actividad de la enzima también pueden ser sujeto de investigación. Este enfoque multifacético proporcionó mayores conocimientos acerca del funcionamiento y los mecanismos de acción de proteínas individuales o de un número relativamente pequeño de proteínas que interactuaban. Sin embargo, este enfoque de estudiar las proteínas una a la vez no proporciona rápidamente un cuadro global de lo que está ocurriendo en el proteoma de una célula, un tejido o un organismo completo.

La proteómica es el estudio de todas las proteínas de un sistema biológico o un subconjunto grande de ellas

La aparición de la genómica (secuenciación del DNA genómico y las tecnologías asociadas como el análisis simultáneo de los niveles de todos los mRNA de las células y de los tejidos) mostró claramente que un enfoque global o sistémico a la biología proporcionaría conocimientos únicos y de alto valor. Muchos científicos reconocieron que un análisis global de las proteínas de los sistemas biológicos tenía el potencial de contribuciones igualmente valiosas para nuestro entendimiento. Así,

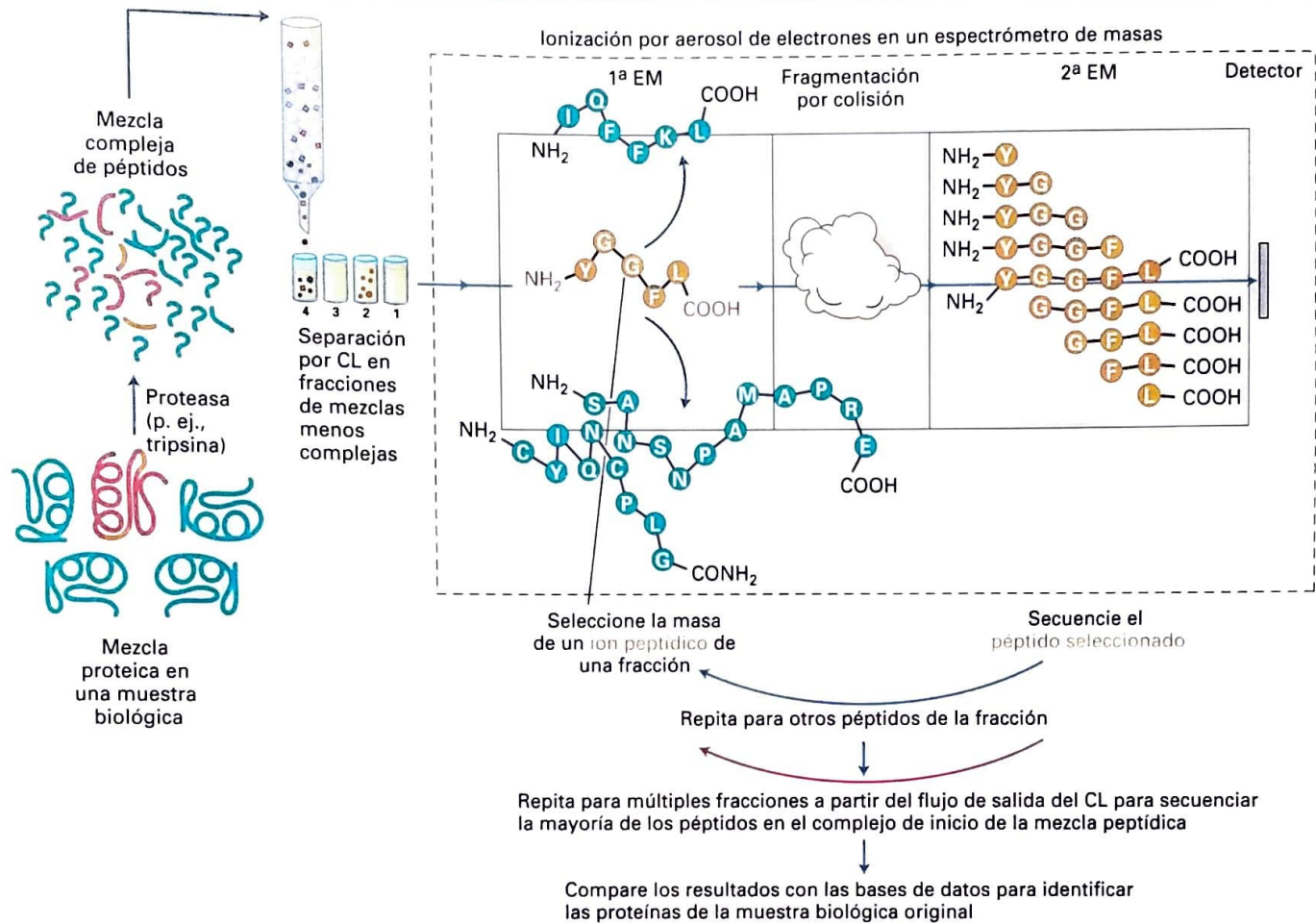


FIGURA EXPERIMENTAL 3-44 La CL-EM/EM se emplea para identificar las proteínas de una muestra biológica compleja. Una mezcla compleja de proteínas presente en una muestra biológica (p. ej., un preparado aislado de orgánulos de Golgi) se digiere con una proteasa; la mezcla de péptidos resultantes se fracciona mediante cromatografía líquida (CL) a fracciones múltiples menos complejas, que se inyectan en forma lenta pero continua mediante

ionización por aerosol de electrones a un espectrómetro de masas en tándem. Luego, las fracciones se someten secuencialmente a ciclos múltiples de EM/EM hasta que se determinan las masas y secuencias de muchos de los péptidos y se emplean para identificar las proteínas de la muestra biológica original mediante la comparación con bases de datos de proteínas. (Basada en una figura proporcionada por S. Carr.)

nació un campo nuevo: la **proteómica**. La proteómica es el estudio sistemático de las cantidades, modificaciones, interacciones, localización y funciones de todas las proteínas o de un subconjunto de ellas en un organismo completo, tejido, a nivel celular o subcelular.

Un conjunto de preguntas generales se plantean en los estudios de la proteómica:

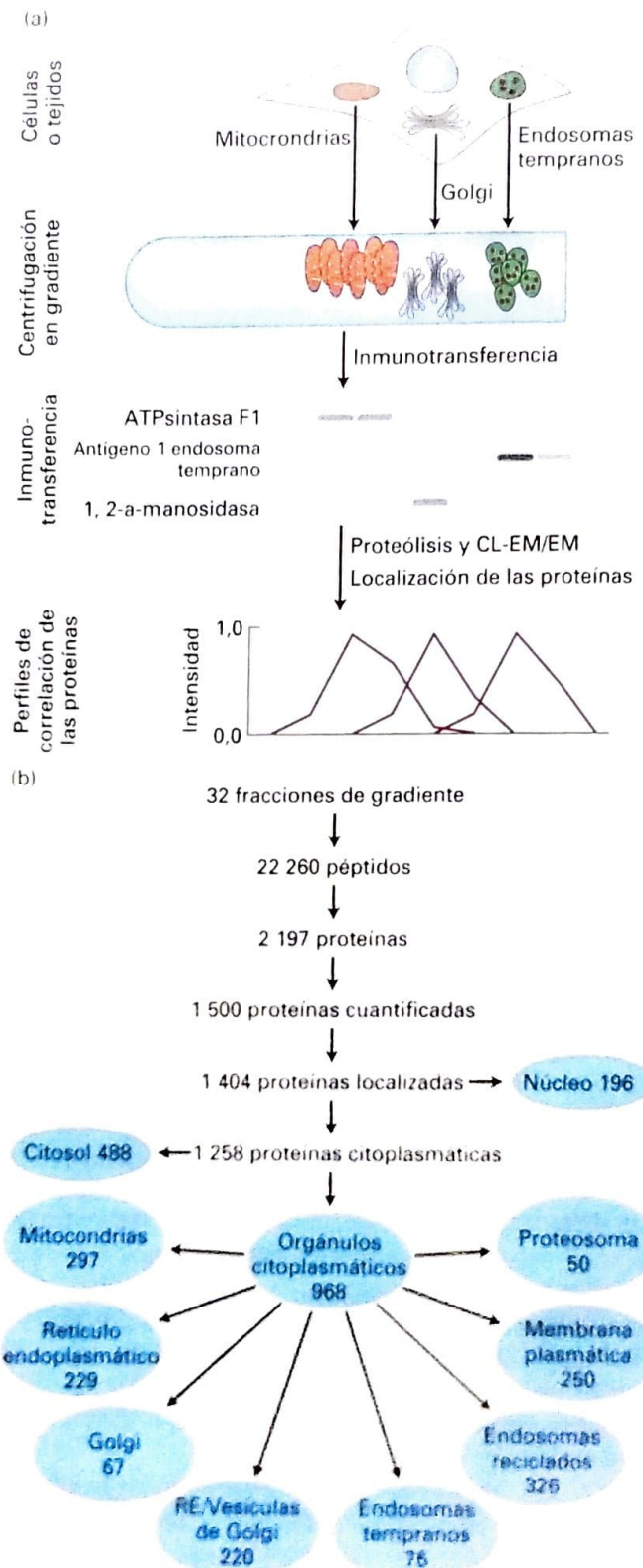
- En una muestra dada (organismo completo, tejido, célula, compartimento subcelular), ¿qué fracción del proteoma completo se expresa (es decir, qué proteínas están presentes)?
- De esas proteínas presentes en la muestra, ¿cuál es su abundancia relativa?
- ¿Cuáles son las cantidades relativas de las formas cortadas y pegadas en forma alternativa y modificadas químicamente (p. ej., fosforiladas, metiladas y aciladas con grasas) de las proteínas?

• ¿Qué proteínas están presentes en los grandes complejos multiproteicos y cuáles en cada complejo? ¿Cuáles son las funciones en estos complejos y cómo interactúan?

• Cuando el estado de una célula cambia (p. ej., velocidad de crecimiento, estadio del ciclo celular, diferenciación, nivel de estrés), ¿las proteínas de las células o la forma secretada de ellas cambia de un modo característico (del modo de una *huella digital*)? ¿Qué proteínas cambian y cómo (cantidades relativas, modificaciones, formas alternativas de corte y empalme, etc.)? (Esta es una forma de *perfil de expresión proteico* que complementa el *perfil transcripcional (mRNA)* analizado en el Capítulo 7).

• ¿Pueden los cambios del tipo de la huella digital emplearse para propósitos diagnósticos? Por ejemplo, ¿ciertos cánceres o cardiopatías provocan cambios característicos en las proteínas de la sangre? ¿Puede la huella digital proteómica ayudar a determinar si un determinado cán-

FIGURA EXPERIMENTAL 3-45 La centrifugación en gradiente de densidad y la CL-EM/EM deben emplearse para identificar muchas de las proteínas de los orgánulos. (a) Las células del tejido hepático se rompieron en forma mecánica para que liberaran los orgánulos y estos se separaron parcialmente mediante centrifugación en gradiente de densidad. Las localizaciones de los orgánulos –que se esparcieron a través del gradiente y, en cierta medida, se superpusieron entre sí– se determinaron empleando inmunoblotting con anticuerpos que reconocían proteínas específicas de los orgánulos, identificadas previamente. Fracciones del gradiente se sometieron a proteólisis y a CL-EM/EM para identificar los péptidos, y así las proteínas, de cada fracción. Las comparaciones con las localizaciones de los orgánulos del gradiente (llamadas perfiles de correlación proteicos) permitieron la asignación de muchas proteínas individuales a uno o más orgánulos (identificación del proteoma del orgánulo). (b) La separación jerárquica de los datos derivados de los procedimientos de la parte (a). Nótese que no todas las proteínas identificadas pudieron asignarse a los orgánulos y algunas se asignaron a más de uno. (Tomado de L. J. Foster y cols., 2008, *Cell* 125(1):187-199.)



cer es resistente o sensible a una droga quimioterapéutica en particular? Las huellas digitales de la proteómica también pueden ser el punto de partida para estudios de los mecanismos subyacentes al cambio de estado. Las proteínas (y otras biomoléculas) que muestran cambios que son diagnósticos de un estado particular se llaman *biomarcadores*.

• Los cambios en el proteoma, ¿pueden ayudar a definir dianas para las drogas o sugerir mecanismos por los cuales esa droga puede inducir efectos colaterales tóxicos? Si así fuera, sería posible diseñar por ingeniería versiones modificadas de la droga con menos efectos colaterales.

Estas son solo unas pocas preguntas que pueden ser respondidas usando la proteómica. Los métodos empleados para responder estas preguntas son tan diversos como las preguntas en sí y su número está creciendo con rapidez.

Las técnicas avanzadas de espectrometría de masas son críticas para el análisis proteómico

Los avances en las tecnologías de la proteómica (p. ej., la espectrometría de masas) afectan profundamente los tipos de preguntas que pueden estudiarse en la práctica. Durante muchos años, la electroforesis en gel bidimensional ha permitido a los investigadores separar, mostrar y caracterizar una mezcla compleja de proteínas (véase la Fig. 3-37). Las manchas en un gel bidimensional pueden cortarse, las proteínas fragmentarse por proteólisis (p. ej., mediante digestión con tripsina) y los fragmentos identificarse por EM. Como alternativa a este método bidimensional en gel, está la CL-EM/EM de alto rendimiento. La Figura 3-44 resume el enfoque general de la CL-EM/EM, en la cual una mezcla compleja de proteínas se digiere con una proteasa; la miriada de péptidos resultantes se fracciona mediante CL en múltiples fracciones menos complejas que, en forma lenta pero continuada, se inyectan mediante ionización de un aerosol de electrones a un espectrómetro de masas en tándem. Luego, las fracciones se someten en forma secuencial a ciclos múltiples de EM/EM hasta que se determinan las secuencias de muchos de los péptidos y se emplean para identificar, a partir de bases de datos, las proteínas de la muestra biológica original.

Un ejemplo del uso de la CL-EM/EM para identificar muchas de las proteínas de cada orgánulo se ve en la Figura 3-45. Las células del hígado murino (de ratón) se rompieron mecánicamente para que liberaran los orgánulos y estos se separaron parcialmente con centri-

fugación en gradiente de densidad. La localización de los orgánulos en el gradiente se determinó empleando inmunoblotting con anticuerpos que reconocieron proteínas previamente identificadas, específicas de ciertos orgánulos. Las fracciones del gradiente se sometieron a CL-EM/EM para identificar las proteínas de cada fracción y se comparó la distribución en el gradiente de las muchas proteínas individuales con las

distribuciones de los orgánulos. Esto permitió la asignación de muchas proteínas individuales a uno o más orgánulos (perfil proteoma, proteoma de los orgánulos). Más recientemente, se han empleado métodos que combinan la purificación del orgánulo, la EM, la localización bioquímica y los ordenadores para mostrar que al menos 1 000 proteínas diferentes se localizan en las mitocondrias de los seres humanos y de los ratones.

Los métodos de la proteómica combinados con los de la genética molecular actualmente se están empleando para identificar todos los complejos proteicos de una célula eucariótica, la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Aproximadamente se han identificado 500 complejos con un promedio de 4,9 proteínas distintas por complejo, y estas, a su vez, están implicadas en al menos 400 interacciones complejo-complejo. Estos estudios proteómicos sistemáticos están proporcionando nuevos conocimientos acerca de la organización de las proteínas dentro de las células y del modo en que las proteínas trabajan en conjunto para permitir que las células vivan y funcionen.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 3.6

Proteómica

- La proteómica es el estudio sistemático de las cantidades (y cambios en las cantidades), modificaciones, interacciones, localización y funciones de todas las proteínas o subconjuntos de ellas de los sistemas biológicos en el organismo completo, los tejidos, a nivel celular y a nivel subcelular.
- La proteómica proporciona conocimientos acerca de la organización fundamental de las proteínas dentro de las células y del modo en que esta organización se ve afectada por el estado de las células (p. ej., la diferenciación en distintos tipos celulares, la respuesta al estrés, la enfermedad y las drogas).
- Se emplea una gran variedad de métodos para los análisis proteómicos, que incluyen la electroforesis en gel bidimensional, la centrifugación en gradiente de densidad y la espectroscopia de masas (MALDI-TOF y CL-EM/EM).
- La proteómica ha ayudado a comenzar en la identificación de los proteomas de los orgánulos ("perfil proteómico de los orgánulos") y la organización de las proteínas individuales dentro de los complejos multiproteicos que interactúan en una intrincada red para dar sustento a la vida y la función de las células (véase la Fig. 3-45).

Perspectivas

La notable expansión del poder de los ordenadores se encuentra en el núcleo de los avances que determinan las estructuras tridimensionales de las proteínas. Por ejemplo, los ordenadores en tubos de vacío que permiten ejecutar programas en tarjetas perforadas se emplearon para resolver las estructuras de las primeras proteínas sobre la base de la cristalografía de rayos X, un proceso que en ese momento llevó años pero que ahora puede ser realizado en cuestión de días y, en algunos casos, de horas. En el futuro, los investigadores se proponen predecir

las estructuras de las proteínas empleando solo las secuencias de los aminoácidos deducidas a partir de las secuencias génicas. Este problema informático requiere superordenadores o grandes conjuntos de ordenadores que operen de manera sincrónica. En la actualidad, solo pueden predecirse las estructuras de dominios muy pequeños que contengan hasta 100 residuos y con baja resolución. Sin embargo, los permanentes desarrollos en la informática y los modelos de plegamiento de proteínas combinados con los esfuerzos a gran escala para resolver las estructuras de todos los motivos estructurales proteicos, mediante cristalografía de rayos X, permitirán predecir las estructuras de proteínas más grandes. Con una base de datos en expansión exponencial de motivos estructurales, dominios y proteínas definidas los científicos serán capaces de identificar los motivos de una proteína desconocida, hacer coincidir el motivo con la secuencia y emplearlo para predecir la estructura tridimensional de la proteína completa.

Nuevos enfoques combinados también ayudarán para determinar estructuras en alta resolución de las máquinas moleculares. Si bien estos ensamblajes macromoleculares muy grandes habitualmente son difíciles de cristalizar y, por lo tanto, de resolver mediante cristalografía de rayos X, pueden obtenerse imágenes en un microscopio crioelectrónico a temperaturas del helio líquido y a alta energía de los electrones. A partir de millones de "partículas" individuales, cada una de las cuales representa una vista al azar del complejo proteico, puede construirse la estructura tridimensional. Dado que las subunidades del complejo pueden ya resolverse cristalográficamente, se podrá generar una estructura compuesta que consista en las estructuras que formen las subunidades derivadas de los rayos X para encajar con el modelo derivado de la EM.

Los métodos para la rápida determinación de la estructura combinados con la identificación de nuevos sustratos e inhibidores ayudarán a la determinación de las estructuras de complejos enzima-sustrato y los estados de transición y, de este modo, ayudarán a proporcionar información detallada con respecto a los mecanismos de la catálisis enzimática. Las proteínas de membrana, dado el ambiente especializado en el cual residen y sus características de solubilidad, siguen constituyendo un desafío, si bien el progreso en esta área está acelerándose.

Aunque nuestra comprensión de la estructura y actividad de las chaperonas continúa avanzando en forma exponencial, aún continúa siendo un misterio un número de interrogantes críticos. No comprendemos con precisión de qué manera las células distinguen entre una proteína no plegada, una plegada en forma incorrecta y una correctamente plegada. Claramente, la exposición de las cadenas hidrofóbicas laterales desempeña un papel pero, ¿cuáles son los otros determinantes de este proceso de reconocimiento clave? ¿De qué manera se toma la decisión para pasar de intentar volver a plegar una proteína a decidir degradarla?

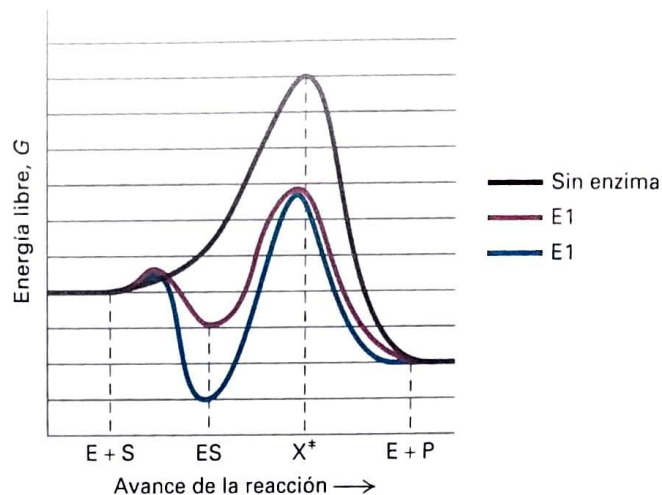
El rápido desarrollo de nuevas tecnologías puede esperarse que resuelva parte de los problemas aún notables de la proteómica. Está resultando posible identificar y caracterizar proteínas intactas de hasta 30-70 kDa en mezclas complejas usando técnicas de EM sin digerir primero las muestras a péptidos, un método llamado enfoque "arriba-abajo", en contraste a iniciar con fragmentos de la proteína (enfoque "abajo-arriba"). Un problema actual en el análisis proteómico de mezclas complejas es que resulta difícil detectar e identificar fragmentos proteicos de muestras cuyas concentraciones en la muestra difieran en más de mil veces: algunas muestras, como las de plasma sanguíneo, contienen proteínas cuyas concentraciones varían en una escala de 1 011 veces. El análisis rutinario de las muestras con concentraciones tan diversas mejoraría notablemente el valor mecánico y diagnóstico de la proteómica del plasma sanguíneo.

Palabras clave

hélice α 62	cromatología líquida 96
energía de activación 78	motivo 65
sitio activo 79	enlace peptídico 61
alosterismo 88	fosforilación 90
filamento amiloide 76	polipéptido 62
radioautografía 100	estructura primaria 62
hoja β 62	proteasoma 85
giro β 62	proteína 62
chaperona 72	proteoma 60
conformación 59	proteómica 106
cooperatividad 88	estructura cuaternaria 68
dominio 67	centrifugación zonal por velocidad 93
electroforesis 94	estructura secundaria 62
enzima 78	estructura terciaria 64
homología 69	ubiquitina 87
cinasa 90	$V_{\max}$ 79
K_m 80	western blotting 99
ligando 19	cristalografía de rayos X 104

Revisión de los conceptos

1. La estructura tridimensional de una proteína está determinada por sus *estructuras primaria, secundaria y terciaria*. Defina estructuras primaria, secundaria y terciaria. ¿Cuáles son algunas de las estructuras secundarias comunes? ¿Cuáles son las fuerzas que mantienen juntas las estructuras secundaria y terciaria?
2. El plegamiento adecuado de las proteínas es esencial para su actividad biológica. En general, la conformación funcional de una proteína es la conformación con la menor energía. Esto significa que si una proteína no plegada alcanza el equilibrio, debería ensamblarse automáticamente a su estado nativo plegado funcional. ¿Entonces por qué hay necesidad de las chaperonas moleculares y de las chaperoninas en las células? ¿Qué papel diferente desempeñan las chaperonas y las chaperoninas moleculares en el plegamiento de las proteínas?
3. Las enzimas catalizan las reacciones químicas. ¿Qué constituye el sitio activo de una enzima? ¿Qué son los números de recambio (kcat), la constante de Michaelis (K_m) y la velocidad máxima ($V_{\max}$) de una enzima? La kcat para la anhidrasa carbónica es 5×10^5 moléculas/s. Esta es una "constante de velocidad" pero no una "velocidad". ¿Cuál es la diferencia? ¿Por qué concentración multiplicaría esta constante de velocidad para determinar una velocidad real de formación del producto (V)? ¿En qué circunstancias esta velocidad sería igual a la velocidad máxima ($V_{\max}$) de la enzima?
4. El siguiente gráfico de coordenadas de reacción muestran curvas de la energía de una molécula de sustrato (S) cuando pasa a través de un estado de transición (X^*) en su camino a transformarse en un producto estable (P), solo o en presencia de dos enzimas diferentes (E1 y E2). ¿De qué manera la adición de cualquiera de las enzimas afecta el cambio en la energía libre de Gibbs (ΔG) para la reacción? ¿Cuál de las dos enzimas se une con mayor afinidad al sustrato? ¿Qué enzima es mejor para estabilizar el estado de transición? ¿Qué enzima funciona como mejor catalizador?
5. Un sistema inmunitario adaptativo saludable puede generar anticuerpos que reconocen y se unen con alta afinidad a casi cualquier



molécula estable. La molécula a la cual se une un anticuerpo se conoce como "antígeno". Los anticuerpos han sido explotados por científicos emprendedores para generar herramientas valiosas para la investigación, el diagnóstico y el tratamiento. Una aplicación inteligente es la generación de anticuerpos que funcionan como enzimas para catalizar reacciones químicas complicadas. Si usted deseara producir un anticuerpo "catalítico" de este tipo, ¿qué sugeriría emplear como antígeno? ¿Sería el sustrato de la reacción? ¿El producto? ¿Alguna otra cosa?

6. Las proteínas se degradan en las células. ¿Qué es la ubiquitina y qué papel desempeña en marcar a las proteínas para su degradación? ¿Cuál es el papel de los proteasomas en la degradación de las proteínas? ¿Cómo podrían servir los inhibidores de los proteasomas como agentes quimioterapéuticos (para el tratamiento del cáncer)?
7. La función de las proteínas puede regularse de diferentes maneras. ¿Qué es la cooperatividad y cómo influencia a la función de las proteínas? Describa de qué manera la fosforilación de las proteínas y la escisión proteolítica pueden modular la función proteica.
8. Distintas técnicas pueden separar las proteínas de acuerdo con sus diferencias de masa. Describa el uso de dos de estas técnicas, la centrifugación y la electroforesis en gel. Las proteínas de la sangre, transferrina (PM 76 kDa) y lisozima (PM 15 kDa), pueden separarse mediante centrifugación zonal por velocidad o por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS. ¿Cuál de las dos proteínas sedimentará más rápido durante la centrifugación? ¿Cuál migrará más rápido durante la electroforesis?
9. La cromatografía es un método analítico empleado para separar las proteínas. Describa los principios para separar las proteínas por filtración en gel, intercambio iónico y cromatografía de afinidad.
10. Se han desarrollado varios métodos para detectar proteínas. Describa de qué manera se pueden emplear los radioisótopos y la radioautografía para marcar y detectar las proteínas. ¿De qué manera detecta las proteínas el Western blotting?
11. Con frecuencia, se emplean métodos físicos para determinar la conformación de las proteínas. Describa de qué manera la cristalografía de rayos X, la microscopía crioelectrónica y la espectroscopia por RMN pueden usarse para determinar la forma de las proteínas. ¿Cuáles son las ventajas y desventajas de cada método? ¿Cuál es mejor para las proteínas pequeñas? ¿Y para las proteínas grandes? ¿Y para los ensamblajes macromoleculares enormes?
12. La espectrometría de masas es una herramienta poderosa en la proteómica. ¿Cuáles son las cuatro características clave de un espec-

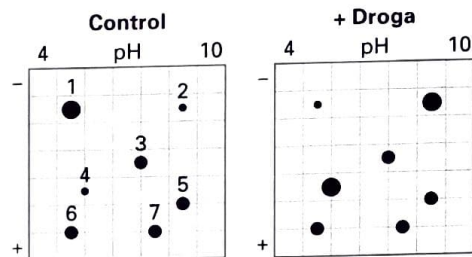
trómetro de masas? Describa brevemente de qué manera la MALDI y la electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida (PAGE-2D) podrían usarse para identificar una proteína expresada en células cancerosas pero no en células sanas normales.

Análisis de los datos

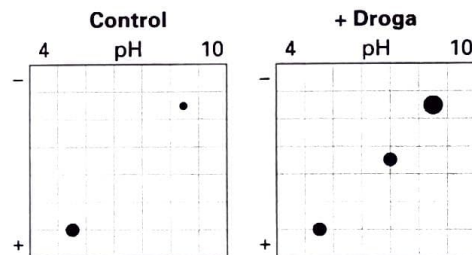
1. Hermosos modelos de macromoléculas, como proteínas y ácidos nucleicos, se generan a partir de archivos de coordenadas atómicas obtenidos habitualmente a partir de la difracción de rayos X de muestras cristalizadas o del análisis por RMN de las moléculas en solución. El Protein Data Bank (PDB) es un depósito accesible al público de archivos de coordenadas atómicas macromoleculares a los que pueden accederse en línea en <http://www.rcsb.org>. Acceda al PDB y familiarícese con su página de inicio. ¿Cuántas estructuras moleculares contiene hoy? ¿Cuál es la “Molécula del Mes”? Descargue un archivo coordinado para la proteasa de serina quimotripsina teclando el código de acceso “1ACB” en el casillero de búsqueda. Esto lo llevará a una página que describe la estructura cristalográfica de rayos X de un complejo entre la quimotripsina α bovina y la pequeña proteína inhibidora seudosustrato eglna-c. ¿Cuándo y en qué revista se publicó el estudio que informó acerca de este modelo estructural? Haga clic en el enlace “descargar archivo”, seleccione “archivo PDB (Texto)” y descargue el archivo “1ACB.pdb”. Este es un archivo de coordenadas atómicas (.pdb) que especifica las posiciones relativas de cada átomo en este complejo proteico según se determinó en forma experimental mediante cristalografía de rayos X. Abra el archivo en un visor de texto o en un procesador de palabras y mire su formato. Los primeros varios cientos de líneas contienen información de los antecedentes, incluidos los nombres de las moléculas, sus fuentes naturales, el modo en que fueron preparadas para el experimento, análisis estadísticos de la calidad del modelo e información bibliográfica. Finalmente, llegará a una larga lista de líneas, cada una de las cuales comienzan con “ATOM”. Estas son las coordenadas que forman una lista por número atómico, tipo de átomo, tipo de aminoácido y número de cadenas. Cada una de las líneas “ATOM” finaliza con cinco números que representan la posición atómica en un eje x, y, z, su “grado de ocupación” y su “factor térmico”. Cierre el archivo y descargue el programa para visualizar el modelo molecular. Hay muchos, tales como RasMol, iMol, Swiss-PDB Viewer y PyMol, que pueden descargarse gratuitamente con fines educativos. Abra el archivo 1ACB.pdb y gírelo alrededor en el visor. ¿Puede identificar la proteasa? ¿Y la proteína inhibidora? ¿Puede encontrar el sitio activo de la enzima? ¿Qué otras observaciones puede hacer acerca de las proteasas de serina a partir del modelo de este complejo inactivado?

2. La proteómica involucra el análisis global de la expresión de las proteínas. En un enfoque, todas las proteínas de las células control y tratadas se extrajeron y posteriormente se separaron empleando electroforesis bidimensional en gel. Por lo general, cientos o miles de manchas proteicas se resuelven y los niveles en estado estacionario de cada proteína se comparan entre las células control y las células tratadas. En el siguiente ejemplo, solo unas pocas manchas proteicas se muestran para simplificar. Las proteínas se separaron en la primera dimensión sobre la base de la carga mediante isoelectroenfoco (pH 4-10) y luego se separaron por tamaño mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS. Las proteínas fueron detectadas por un colorante como el azul de Coomassie y se les asignó números para identificarlas.

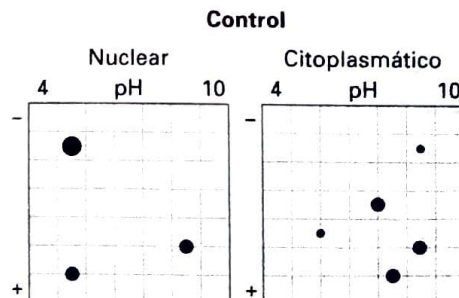
a. Las células se trataron con una droga (“Droga 1”) o permanecieron sin tratar (“Control”) y luego se extrajeron y separaron las proteínas mediante electroforesis en gel en dos dimensiones. Los geles teñidos se muestran más abajo. ¿Qué puede concluir acerca del efecto de la droga en los niveles sobre las proteínas 1-7 en estado estacionario?



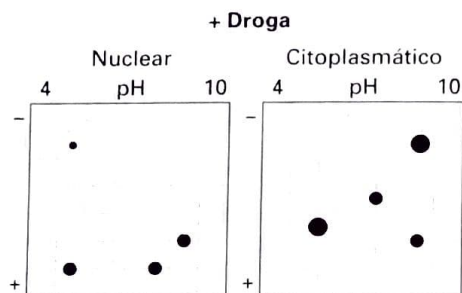
b. Usted sospecha que la droga puede inducir una proteína-quinasa y, por lo tanto, repite el experimento de la parte (a) en presencia de 32p-fosfato inorgánico marcado. En este experimento, los geles bidimensionales se exponen a una película de rayos X para detectar la presencia de proteínas marcadas con 32p. Las películas de rayos X se muestran más abajo. ¿Qué concluye a partir de este experimento acerca del efecto de la droga en las proteínas 1-7?



c. Para determinar la localización celular de las proteínas 1-7, las células de la parte (a) fueron separadas en fracciones nuclear y citoplasmática mediante centrifugación diferencial. Se corrieron geles bidimensionales y los geles teñidos se muestran más abajo. ¿Qué concluye acerca de la localización celular de las proteínas 1-7?



d. Resuma las propiedades generales de las proteínas 1-7, combinando los datos de las partes (a), (b) y (c). Describa de qué manera podría determinar la identidad de cualquiera de las proteínas.



Referencias

Referencias generales

- Berg, J. M., J. L. Tymoczko, and L. Stryer. 2007. *Biochemistry*, 6th ed. W. H. Freeman and Company.
- Nelson, D. L., and M. M. Cox. 2005. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4th ed. W. H. Freeman and Company.

Sitios Web

- Entry site into proteins, structures, genomes, and taxonomy: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/>
- The protein 3-D structure database: <http://www.rcsb.org/> Structural classifications of proteins: <http://scop.berkeley.edu/> Sites containing general information about proteins: <http://www.expasy.ch/>; <http://www.proweb.org/>; <http://scop.berkeley.edu/intro.html>
- PROSITE database of protein families and domains: <http://www.expasy.org/prosite/>
- Domain organization of proteins and large collection of multiple sequence alignments: <http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>; <http://people.crysl.bbk.ac.uk/~ubcgl6z/cpn/elmovies.html>
- MitoCarta: An Inventory of Mammalian Mitochondrial Genes: <http://www.broadinstitute.org/pubs/MitoCarta/index.html>

Estructura jerárquica de las proteínas y Plegamiento de las proteínas

- Branden, C., and J. Tooze. 1999. *Introduction to Protein Structure*. Garland.
- Broadley, S. A., and F. U. Hartl. 2009. The role of molecular chaperones in human misfolding diseases. *FEBS Lett.* **583**(16):2647-2653.
- Brodsky, J. L., and G. Chiosis. 2006. Hsp70 molecular chaperones: emerging roles in human disease and identification of small molecule modulators. *Curr. Top. Med. Chem.* **6**(11):1215-1225.
- Bukau, B. J. Weissman, and A. Horwich. 2006. Molecular chaperones and protein quality control. *Cell* **125**(3):443-451.
- Cohen, F. E. 1999. Protein misfolding and prion diseases. *J. Mol. Biol.* **293**:313-320.
- Coulson, A. F., and J. Moult. 2002. A unfold, mesofold, and superfold model of protein fold use. *Proteins* **46**:61-71.
- Daggett, V., and A. R. Fersht. 2003. Is there a unifying mechanism for protein folding? *Trends Biochem. Sci.* **28**(1):18-25.
- Dobson, C. M. 1999. Protein misfolding, evolution, and disease. *Trends Biochem. Sci.* **24**:329-332.

- Gimona, M. 2006. Protein linguistics—a grammar for modular protein assembly? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**(1):68-73.
- Gough, J. 2006. Genomic scale sub-family assignment of protein domains. *Nucl. Acids Res.* **34**(13):3625-3633.
- Koonin, E. V., Y. I. Wolf, and G. P. Karev. 2002. The structure of the protein universe and genome evolution. *Nature* **420**:218-223.
- Lesk, A. M. 2001. *Introduction to Protein Architecture*. Oxford.
- Levitt M. 2009. Nature of the protein universe. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**(27):11079-11084.
- Lin, Z., and H. S. Rye. 2006. GroEL-mediated protein folding: making the impossible, possible. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **41**(4):211-239.
- Orengo, C. A., D. T. Jones, and J. M. Thornton. 1994. Protein superfamilies and domain superfolds. *Nature* **372**:631-634.
- Patthy, L. 1999. *Protein Evolution*. Blackwell Science.
- Rochet, J.-C., and P. T. Lansbury. 2000. Amyloid fibrillogenesis: themes and variations. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **10**:60-68.
- Taipale, M., D. F. Jarosz, and S. Lindquist. 2010. HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**(7):515-528.
- Vogel, C., and C. Chothia. 2006. Protein family expansions and biological complexity. *PLoS Comput. Biol.* **2**(5):e48.
- Yaffe, M. B. 2006. "Bits" and pieces. *Sci STKE*. **2006**(340):pe28.
- Young, J. C., et al. 2004. Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**:781-791.
- Wlodarski, T., and B. Zagrovic. 2009. Conformational selection and induced fit mechanism underlie specificity in noncovalent interactions with ubiquitin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**(46):19346-19351.

Unión de las proteínas y catálisis enzimática

- Dressier, -D. H., and H. Potter. 1991. *Discovering Enzymes*. Scientific American Library.
- Fersht, A. 1999. *Enzyme Structure and Mechanism*, 3d ed. W. H. Freeman and Company.
- Jeffery, C. J. 2004. Molecular mechanisms for multitasking: recent crystal structures of moonlighting proteins. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **14**(6):663-668.
- Marnett, A. B., and C. S. Craik. 2005. Papa's got a brand new tag: advances in identification of proteases and their substrates. *Trends Biotechnol.* **23**(2):59-64.
- Polgar, L. 2005. The catalytic triad of serine peptidases. *Cell Mol. Life Sci.* **62**(19-20):2161-2172.
- Radisky, E. S., et al. 2006. Insights into the serine protease mechanism from atomic resolution structures of trypsin reaction intermediates. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* **103**(18):6835-6840.
- Schenone, M., B. C. Furie, and B. Furie. 2004. The blood coagulation cascade. *Curr. Opin. Hematol.* **10**(4):272-277.
- Schramm, V. L. 2005. Enzymatic transition states and transition state analogues. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **15**(6):604-613.

Regulación de la función de las proteínas

- Bellelli, A., et al. 2006. The allosteric properties of hemoglobin: insights from natural and site directed mutants. *Curr. Prot. Pep. Sci.* **7**(1):17-45.
- Bochtler, M., et al. 1999. The proteasome. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **28**:295-317.
- Burack, W. R., and A. S. Shaw. 2000. Signal transduction: hanging on a scaffold. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**:211-216.
- Gallastegui, N., and M. Groll. 2010. The 26S proteasome: assembly and function of a destructive machine. *Trends Biochem. Sci.* **35**(11):634-642.
- Glen, R., et al. 2008. Regulatory monoubiquitination of phosphoenolpyruvate carboxylase in germinating castor oil seeds *J. Biol. Chem.* **283**:29650-29657.
- Glickman, M. H., and A. Ciechanover. 2002. The ubiquitin-proteasome

proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* **82**(2):373-428.

Goldberg, A. L. 2003. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* **426**:895-899.

Goldberg, A. L., S. J. Elledge, and J. W. Harper. 2001. *The cellular chamber of doom*. *Sci. Am.* **284**(1):68-73.

Groll, M., and R. Huber. 2005. Purification, crystallization, and x-ray analysis of the yeast 20S proteasome. *Metb. Enzymol.* **398**:329-336.

Hailing, D. B., P. Aracena-Parks, and S. L. Hamilton. 2006. Regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels by calmodulin. *Sci STKE* **2005** (315):rel5.

Horowitz, A., et al. 2001. Review: allostery in chaperonins. *J. Struct. Biol.* **135**:104-114.

Huang, H., et al. 2010. K33-linked polyubiquitination of T cell receptor- ζ regulates proteolysis-independent T cell signaling. *Immunity*. **33**(1):60-70.

Katz, E. J., M. Isasa, and B. Crosas. 2010. A new map to understand deubiquitination. *Biochem. Soc. Trans.* **38**(pt. 1):21-28.

Kern, D., and E. R. Zuiderweg. 2003. The role of dynamics in allosteric regulation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**(6):748-757.

Kisselev, A. F., A. Callard, and A. L. Goldberg. 2006. Importance of the different proteolytic sites of the proteasome and the efficacy of inhibitors varies with the protein substrate. *J. Biol. Chem.* **281**(13):8582-8590.

Lane, K. T., and L. S. Beese. 2006. Thematic review series: lipid posttranslational modifications. Structural biology of protein farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase type I. *J. Lipid Res.* **47**(4):681-699.

Lim, W. A. 2002. The modular logic of signaling proteins: building allosteric switches from simple binding domains. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**:61-68.

Martin, C., and Y. Zhang. 2005. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**(11):838-849.

Rabl, J., et al. 2008. Mechanism of gate opening in the 20S proteasome by the proteasomal ATPases. *Mol. Cell.* **30**(3):360-368.

Rechsteiner, M., and C. P. Hill. 2005. Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. *Trends Cell Biol.* **15**(1):27-33.

Sawyer, T. K., et al. 2005. Protein phosphorylation and signal transduction modulation: chemistry perspectives for small-molecule drug discovery. *Med. Chem.* **1**(3):293-319.

Sowa, M. E., et al. 2009. Defining the human deubiquitinating enzyme interaction landscape. *Cell* **138**(2):389-403.

Xia, Z., and D. R. Storm. 2005. The role of calmodulin as a signal integrator for synaptic plasticity. *Nat. Rev. Neurosci.* **6**(4):267-276.

Yap, K. L., et al. 1999. Diversity of conformational states and changes within the EF-hand protein superfamily. *Proteins* **37**:499-507.

Zeng, W., et al. 2010. Reconstitution of the RIG-I pathway reveals a signaling role of unanchored polyubiquitin chains in innate immunity. *Cell* **141**(2):315-330.

Zhou, P. 2006. REGgamma: a shortcut to destruction. *Cell* **124**(2):256-257.

Zolk, O., C. Schenke, and A. Sarikas. 2006. The ubiquitin-proteasome system: focus on the heart. *Cardiovasc. Res.* **70**(3):410-421.

Purificación, detección y caracterización de proteínas

Domon, B., and R. Aebersold. 2006. Mass spectrometry and protein analysis. *Science* **312**(5771):212-217.

Encarnación, S., et al. 2005. Comparative proteomics using 2-D gel electrophoresis and mass spectrometry as tools to dissect stimulons and regulons in bacteria with sequenced or partially sequenced genomes. *Biol. Proc. Online* **7**:117-135.

Hames, B. D. A Practical Approach. Oxford University Press. A methods series that describes protein purification methods and assays.

O'Connell, M. R., R. Gamsjaeger, and J. P. Mackay. 2009. The structural analysis of protein-protein interactions by NMR spectroscopy. *Proteomics* **9**(23):5224-5232.

Patton, W. F. 2002. Detection technologies in proteome analysis. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **771**(1-2):3-31.

White, I. R., et al. 2004. A statistical comparison of silver and SYPRO Ruby staining for proteomic analysis. *Electrophoresis* **25**(17):3048-3054.

Proteómica

Calvo, S. E., and V. K. Mootha. 2010. The mitochondrial proteome and human disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **11**:25-34.

Foster, L. J., et al. 2006. A mammalian organelle map by protein correlation profiling. *Cell* **125**(1):187-199.

Fu, Q., and J. E. Van Eyk. 2006. Proteomics and heart disease: identifying biomarkers of clinical utility. *Expert Rev. Proteomics* **3**(2):237-249.

Gavin, A. C., et al. 2006. Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature* **440**(7084):631-636.

Kellie, J. F., et al. 2010. The emerging process of Top Down mass spectrometry for protein analysis: biomarkers, protein-therapeutics, and achieving high throughput. *Mol. Biosyst.* **6**(9):1532-1539.

Kislinger, T., et al. 2006. Global survey of organ and organelle protein expression in mouse: combined proteomic and transcrip-tomic profiling. *Cell* **125**(1):173-186.

Kolker, E., R. Higdon, and J. M. Hogan. 2006. Protein identification and expression analysis using mass spectrometry. *Trends Microbiol.* **14**(5):229-235.

Krogan, N. J., et al. 2006. Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **440**(7084):637-643.

Ong, S. E., and M. Mann. 2005. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nat. Chem. Biol.* **1**(5):252-262.

Rifai, N., M. A. Gillette, and S. A. Carr. 2006. Protein bio-marker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nat. Biotech.* **24**(8):971-983.

Walther, T. C., and M. Mann. 2010. Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. *J. Cell Biol.* **190**(4):491-500.

Zhou, M., and C. V. Robinson. When proteomics meets structural biology. *Trends Biochem. Sci.* **35**:522-539.



Fotomicrografía electrónica de transmisión coloreada de una unidad de transcripción del RNA ribosómico de un ovocito de *Xenopus*.

La transcripción procede de izquierda a derecha y los complejos de ribonucleo-proteína naciente (rRNP) que crecen en longitud a medida que cada molécula de RNA polimerasa I sucesiva se mueve a lo largo del molde de DNA en el centro. En este preparado, cada rRNP está orientada por encima o por debajo de la hebra central del DNA que se está transcribiendo, tal que la forma general es similar a la de una pluma. En el núcleo de una célula viva, las rRNP nacientes se extienden en todas las direcciones, como un cepillo de madera. (Profesor Oscar L. Miller/Biblioteca Fotográfica de Science.)

Mecanismos genéticos moleculares

La extraordinaria versatilidad de las proteínas como maquinarias e interruptores moleculares, catalizadores celulares y componentes de las estructuras celulares se describió en el Capítulo 3. En este capítulo consideraremos de qué manera se sintetizan las proteínas, así como otros procesos celulares críticos para la supervivencia del organismo y de su descendencia. Nuestro foco estará puesto en las moléculas vitales conocidas como **ácidos nucleicos** y de qué manera finalmente ellos son responsables de gobernar todo el funcionamiento celular. Como se presentaron en el Capítulo 2, los ácidos nucleicos son polímeros lineales de nucleótidos (véanse las Figs. 2-13, 2-16 y 2-17). Estas macromoléculas (1) contienen, en la secuencia precisa de sus nucleótidos, la información para determinar la secuencia de aminoácidos y así la estructura y función de todas las proteínas de una célula, (2) son componentes funcionales críticos de las fábricas macromoleculares que seleccionan y alinean los aminoácidos en el orden correcto, a medida que se sintetiza la cadena polipeptídica, (3) catalizan un número de reacciones químicas fundamentales en las células, que incluyen la formación de enlaces peptídicos entre los aminoácidos durante la síntesis proteica y (4) regulan la expresión de los genes.

El **ácido desoxirribonucleico (DNA)** es una molécula que contiene, en la secuencia de sus nucleótidos, la información requerida para construir todas las proteínas necesarias de un organismo y así, las células y tejidos de ese organismo. Es idealmente apta para desempeñar esta función a nivel molecular. Químicamente, es extraordinariamente estable en la mayoría de las condiciones terrestres, lo cual queda ejemplificado por la capacidad de recuperar la secuencia de DNA de huesos y tejidos que tienen decenas de miles de años. A raíz de esto, y dados los mecanismos de reparación que operan en las células vivas, los largos polímeros que constituyen una molécula de DNA pueden tener una secuencia de hasta 10^9 nucleótidos. Virtualmente toda la información requerida para el desarrollo de un óvulo humano fertilizado en un adulto constituido por billones de células con funciones especializadas, puede almacenarse en la secuencia de los cuatro tipos de nucleótidos, que constituyen hasta los $\approx 3 \times 10^9$ pares de bases del genoma humano. Dados los principios del apareamiento de bases analizados a continuación, la información se copia con rapidez con una tasa de error < 1 cada 10^9 nucleótidos por

CONTENIDO

4.1 Estructura de los ácidos nucleicos	117	4.5 Replicación del DNA	145
4.2 Transcripción de los genes que codifican proteínas y formación de mRNA funcional	124	4.6 Reparación y recombinación del DNA	151
4.3 La decodificación de los mRNA por los tRNA	131	4.7 Los virus: los parásitos del sistema genético celular	160
4.4 Síntesis escalonada de las proteínas en los ribosomas	136		

generación. La exacta replicación de esta información en cualquier especie asegura su continuidad genética de una generación a otra, y resulta crítica para el desarrollo normal de un individuo. Cumple estas funciones tan bien que el DNA es la fuente de la información genética en todas las formas de vida conocidas (con exclusión de los virus de RNA que se limitan a genomas muy cortos, por la inestabilidad relativa del RNA comparado con el DNA, como veremos más adelante). El descubrimiento de que virtualmente todas las formas de vida emplean DNA para codificar su información genética, y también emplean un código genético casi idéntico, implica que todas las formas de vida descienden de un ancestro común, basado en el almacenamiento de información en las secuencias de ácido nucleico. Se accede a esta información y se la replica mediante el apareamiento específico de bases entre los nucleótidos. La información almacenada en el DNA se distribuye en unidades de herencia conocidas como genes, que controlan rasgos identificables de un organismo. En el proceso de transcripción, la información almacenada en el DNA se copia al **ácido ribonucleico (RNA)** que tiene tres funciones distintas en las síntesis de las proteínas.

Porciones de la secuencia nucleotídica del DNA se copian a las moléculas de RNA mensajero (**mRNA**) que dirigen la síntesis de una proteína específica. La secuencia de nucleótidos de una molécula de mRNA, contiene información que especifica el orden correcto de los aminoácidos durante la síntesis de una proteína. El ensamblaje notablemente preciso, gradual, de los aminoácidos en las proteínas, ocurre por la **traducción** del mRNA. En este proceso, la secuencia de nucleótidos de una molécula de mRNA es “leída” por un segundo tipo de RNA, llamado **RNA de transferencia (tRNA)** con ayuda de un tercer tipo de RNA, el **RNA ribosómico (rRNA)**, y sus proteínas asociadas. A medida que los aminoácidos correctos se colocan en secuencia por acción de los tRNA, se unen mediante enlaces peptídicos para formar proteínas. La síntesis de RNA se llama **transcripción**, porque “el lenguaje” de la secuencia de nucleótidos del DNA se copia con precisión, o se *transcribe*, a la secuencia de nucleótidos de una molécula de RNA. Se dice que la síntesis de proteínas es una **traducción**, porque el “lenguaje” de la secuencia de nucleótidos del DNA y del RNA, se *traduce* al “lenguaje” de la secuencia de aminoácidos de las proteínas.

El descubrimiento de la estructura del DNA en 1953, y la elucidación del modo en que el DNA dirige la síntesis de RNA que luego dirige el ensamblaje de proteínas –en el llamado *dogma central*– fueron logros monumentales que marcaron los inicios de la biología molecular. Sin embargo, la representación simplificada del dogma central DNA → RNA → proteína, no refleja el papel de las proteínas en la síntesis de los ácidos nucleicos. Más aún, como se analizó aquí para las bacterias, y en capítulos posteriores para los eucariontes, las proteínas son responsables en gran medida de la **regulación de la expresión génica**, el proceso completo por el cual la información codificada en el DNA se decodifica a las proteínas en las células adecuadas, en los momentos adecuados del desarrollo. Como consecuencia, la hemoglobina se expresa solamente en las células de la médula ósea (reticulocitos) destinados a convertirse en hematíes circulantes (eritrocitos), y las neuronas en desarrollo hacen sus sinapsis adecuadas (conexiones) con otras 10¹¹ neuronas en desarrollo del cerebro humano. Los procesos genéticos moleculares fundamentales de la replicación, transcripción y traducción del DNA deben llevarse a cabo con extraordinaria fidelidad, rapidez y regulación precisa, para el desarrollo normal de los organismos

tan complejos como lo son procariontes y eucariontes. Esto se logra mediante procesos químicos que operan con extraordinaria precisión acoplada con múltiples etapas de puntos de control, o mecanismos de vigilancia, que ponen a prueba si los pasos críticos de estos procesos han ocurrido correctamente, antes de que se inicie el paso siguiente. Esta expresión muy regulada de los genes, necesaria para el desarrollo de un organismo multicelular, requiere la integración de información proveniente de señales enviadas por células distantes en el organismo en desarrollo, así como de células cercanas y un programa de desarrollo intrínseco determinado por pasos tempranos en la embriogénesis, tomados por los progenitores de esa célula. Toda esta regulación depende de secuencias control en el DNA que funcionan mediante proteínas llamadas *factores de transcripción* que coordinan la expresión de cada gen. Las secuencias de RNA que analizamos en el Capítulo 8 que regulan el procesamiento y traducción del RNA, también están codificadas originariamente en el DNA. Los ácidos nucleicos funcionan como los “cerebros y el sistema nervioso central” de la célula, mientras que las proteínas ejecutan las funciones que especifican.

En este capítulo, reseñamos las estructuras y las propiedades del DNA y del RNA, y exploramos el modo en que las diferentes características de cada tipo de ácido nucleico lo hacen apto para sus respectivas funciones celulares. En las siguientes secciones, analizamos los procesos básicos que se resumen en la **Figura 4-1**: la transcripción del DNA a precursores del RNA, el procesamiento de estos precursores para constituir moléculas funcionales de RNA, la traducción de los mRNA a proteínas y la replicación del DNA. Las proteínas regulan la estructura celular y la mayoría de las reacciones bioquímicas de las células, de modo que consideramos en primer término el modo en que las secuencias de aminoácidos de las proteínas, que determinan las estructuras tridimensionales y de esta forma, sus funciones, están codificadas en el DNA y se traducen. Después de resumir las funciones del mRNA, del tRNA y del rRNA en la síntesis proteica, presentamos una descripción detallada de los componentes y de los pasos bioquímicos de la traducción. La comprensión de este proceso nos da una profunda apreciación de la necesidad de copiar la secuencia de nucleótidos del DNA con precisión. Como consecuencia, consideramos luego los problemas moleculares implicados en la replicación del DNA y la maquinaria celular compleja para asegurar un copiado preciso del material genético. A lo largo del camino, comparamos estos procesos en los procariontes y en los eucariontes. La siguiente sección describe la forma en que se repara el daño al DNA y de qué manera las diferentes regiones de las moléculas de DNA se intercambian en el proceso de **recombinación** para generar nuevas combinaciones de características de los organismos individuales de una especie. La sección final del capítulo presenta información básica acerca de los virus, los parásitos que explotan la maquinaria celular para la replicación, transcripción y síntesis proteica del DNA. Además de ser patógenos, los virus son organismos modelo importantes para el estudio de estos mecanismos celulares para la síntesis macromolecular y otros procesos celulares. Los virus tienen estructuras relativamente simples comparadas con las células, y genomas pequeños que los hicieron manejables para los primeros estudios históricos de estos procesos celulares básicos. Los virus continúan enseñándonos importantes lecciones en biología celular molecular, se han adaptado como herramientas experimentales para introducir cualquier gen deseado en las células y constituyen herramientas que en la actualidad están siendo probadas por su efectividad en la terapia génica en los seres humanos.

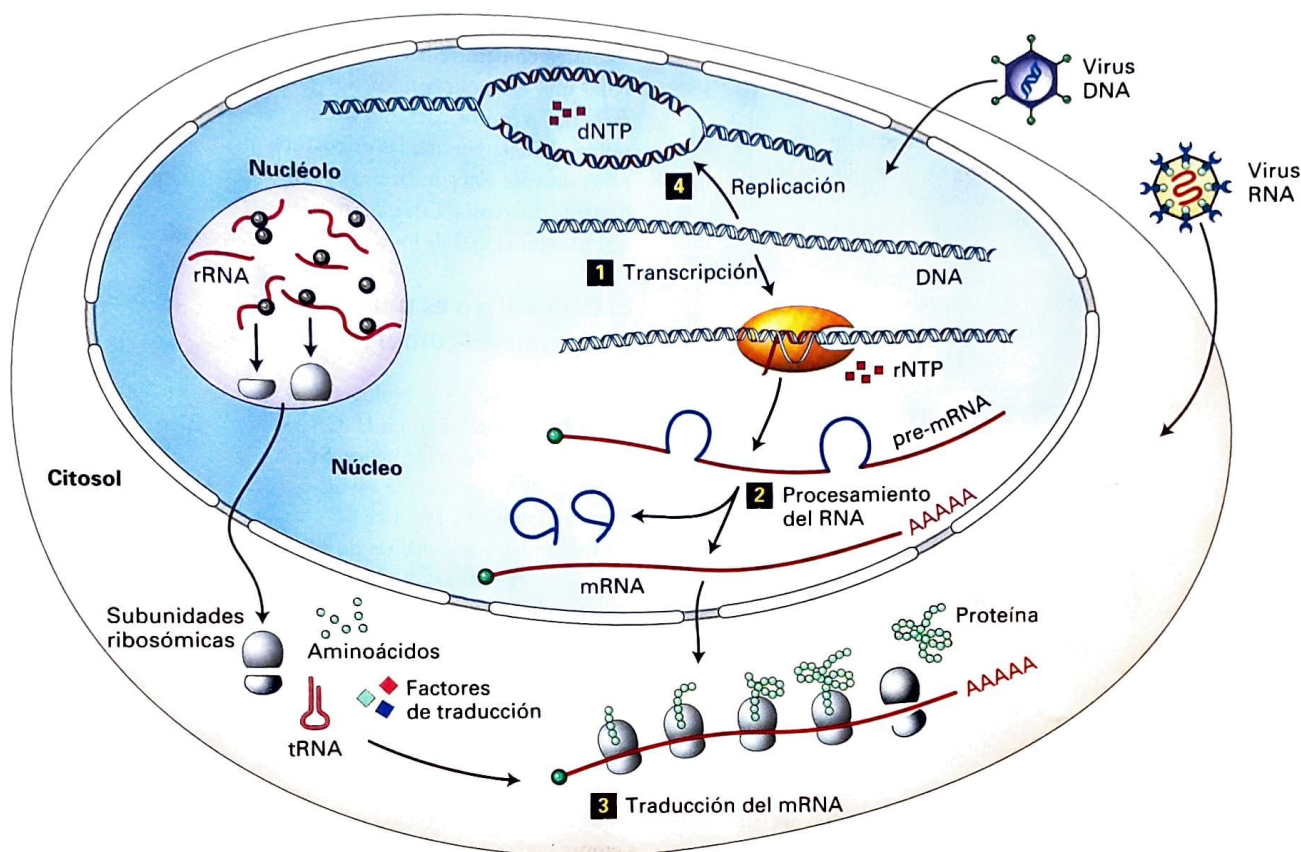


FIGURA 4-1 Generalidades de cuatro procesos genéticos moleculares básicos. En este capítulo cubrimos los tres procesos que llevan a la producción de las proteínas (1 - 3) y el proceso para la replicación del DNA (4). Dado que los virus utilizan la maquinaria de la célula huésped, han sido modelos importantes para estudiar estos procesos. Durante la transcripción de un gen codificante de una proteína por la RNA polimerasa (1), el código de DNA de cuatro bases que especifica la secuencia de aminoácidos de una proteína se copia o se transcribe a un RNA mensajero precursor (pre-mRNA) por la polimerización de monómeros de ribonucleósido trifosfato (rNTP). La eliminación de las secuencias no codificantes y otras modificaciones del pre-mRNA (2), conocidas colectivamente como *procesamiento del RNA*, producen un mRNA funcional que es transportado

al citoplasma. Durante la *traducción* (3), el código de cuatro bases del mRNA se decodifica al lenguaje de 20 aminoácidos de las proteínas. Los ribosomas, las máquinas moleculares que traducen el código del mRNA, están compuestos por dos subunidades ensambladas en el nucleólo a partir de los RNA ribosómicos (rRNA) y múltiples proteínas (izquierda). Después del transporte al citoplasma, las subunidades ribosómicas se asocian con un mRNA y llevan a cabo la síntesis proteica con ayuda de los RNA de transferencia (tRNA) y varios factores de traducción. Durante la replicación del DNA (4), que ocurre solo en las células que se preparan para la división, los monómeros de desoxirribonucleósido trifosfato (dNTP) se polimerizan para dar dos copias idénticas de cada molécula de DNA cromosómico. Cada célula hija recibe una de las copias idénticas.

4.1 Estructura de los ácidos nucleicos

El DNA y el RNA son muy similares químicamente. Las estructuras primarias de ambos son **polímeros** lineales compuestos por **monómeros** llamados **nucleótidos**. Ambos funcionan principalmente como moléculas de información, que llevan ésta en la exacta secuencia de sus nucleótidos. Los RNA celulares tienen una longitud que varía de poco menos de 100 a muchos miles de nucleótidos. Las moléculas de DNA celular pueden tener una longitud de hasta varios cientos de millones de nucleótidos. Estas grandes unidades de DNA asociadas con proteínas pueden teñirse con colorantes y verse al microscopio óptico como cromosomas, llamados así por su capacidad de teñirse. Aunque son similares desde el punto de vista químico, el DNA y el RNA muestran algunas diferencias muy importantes. Por ejemplo, el RNA también puede funcionar como una molécula catalítica. Como veremos, son las propiedades diferentes y únicas del DNA y del RNA las que los hacen adecuados para desempeñar sus papeles específicos en las células.

Una hebra de ácido nucleico es un polímero lineal con una direccionalidad extremo a extremo

En todos los organismos, el DNA y el RNA están cada uno formado sólo por cuatro nucleótidos diferentes. Recuerde, del Capítulo 2, que todos los nucleótidos consisten en una base orgánica ligada a un azúcar de cinco carbonos, que tiene un grupo fosfato unido al carbono 5. En el RNA, el azúcar es una ribosa; en el DNA, una desoxirribosa (véase la Fig. 2-16). Los nucleótidos empleados en la síntesis del DNA y el RNA contienen cinco bases diferentes. Las bases *adenina* (A) y *guanina* (G) son **purinas**, que contienen un par de anillos fusionados; las bases *citosina* (C), *timina* (T) y *uracilo* (U) son **pirimidinas**, con un anillo simple (véase la Fig. 2-17). Tres de estas bases —A, G y C— se encuentran tanto en el DNA como en el RNA; sin embargo, la T se encuentra sólo en el DNA y el U sólo en el RNA. (Nótese que las abreviaturas con una única letra para estas bases también se emplean, por lo común, para denotar los nucleótidos completos en los polímeros de ácidos nucleicos.)

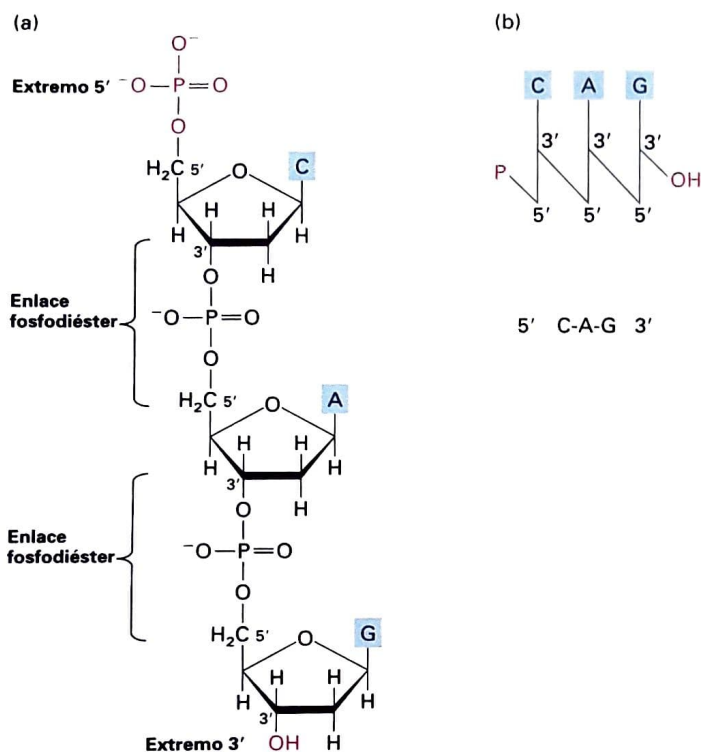


FIGURA 4-2 Direccionalidad química de una hebra de ácido nucleico. Se muestran aquí representaciones alternativas de un DNA de hebra simple que contiene solo tres bases: citosina (C), adenina (A) y guanina (G). (a) La estructura química muestra un grupo hidroxilo en el extremo 3' y un grupo fosfato en el extremo 5'. Note también que dos enlaces fosfoéster unen nucleótidos adyacentes; este enlace de doble ligadura comúnmente se conoce como *enlace fosfodiéster*. (b) En el diagrama de "palillos" (*arriba*), los azúcares están indicados como líneas verticales y los enlaces fosfodiéster como líneas diagonales; las bases se indican por su abreviatura con una sola letra. En la representación más simple (*abajo*), solo se indican las bases. Por convención, siempre se escribe una secuencia de polinucleótidos en la dirección 5' $\rightarrow$ 3' (de izquierda a derecha) a menos que se indique de otra manera.

Una hebra de ácido nucleico simple tiene un *esqueleto* compuesto de unidades pentosa-fosfato repetidas, a partir de las cuales se extienden las bases púricas y pirimídicas como grupos laterales. Al igual que un polipéptido, una hebra de ácido nucleico tiene una orientación química de un extremo hacia otro: el *extremo 5'* tiene un grupo hidroxilo o fosfato en el carbono 5' de su azúcar terminal; el *extremo 3'* habitualmente tiene un grupo hidroxilo en el carbono 3' de su azúcar terminal (Fig. 4-2). Esta direccionalidad, sumada al hecho de que la síntesis procede en dirección 5' a 3', ha dado lugar a la convención de que las secuencias de polinucleótidos se escriben y leen en la dirección 5' $\rightarrow$ 3' (de izquierda a derecha); por ejemplo, la secuencia AUG se supone que es (5')AUG(3'). Como veremos aquí, la direccionalidad 5' $\rightarrow$ 3' de una hebra de ácido nucleico es una propiedad importante de la molécula. La unión química entre nucleótidos adyacentes, llamada comúnmente **enlace fosfodiéster**, consiste en realidad en dos enlaces fosfoéster, uno en el lado 5' del fosfato y otro en el lado 3'.

La secuencia lineal de los nucleótidos unidos por los enlaces fosfodiéster, constituye la estructura primaria de los ácidos nucleicos. Al igual que los polipéptidos, los polinucleótidos pueden enrollarse y plegarse en conformaciones tridimensionales estabilizadas por enlaces no covalentes. Aunque las estructuras primarias del DNA y del RNA generalmente son similares, sus conformaciones tridimensionales son bastante diferentes. Estas diferencias estructurales son críticas para las distintas funciones de los dos tipos de ácidos nucleicos.

El DNA nativo es una doble hélice de hebras antiparalelas complementarias

La era moderna de la biología molecular se inició en 1953, cuando James D. Watson y Francis H. C. Crick propusieron que el DNA tiene una estructura de doble hélice. Su propuesta se basó sobre análisis de patrones de difracción de rayos X de fibras de DNA, generados por Rosalind Franklin y Maurice Wilkins, que mostraron que la estructura era helicoidal, y los análisis de la composición de bases del DNA de múltiples organismos, hechos por Erwin Chargaff y sus colegas. Los estudios de Chargaff mostraron que mientras que la composición de bases (porcentaje de A, T, G y C) varía en gran medida entre organismos poco relacionados, en todos los organismos el porcentaje de A siempre es igual al porcentaje de T, y el porcentaje de G siempre es igual al porcentaje de C. Sobre la base de estos descubrimientos y las estructuras de los cuatro nucleótidos, Watson y Crick construyeron cuidadosamente un modelo molecular proponiendo una **doble hélice**, donde siempre A estaba unida por puentes de hidrógeno a T, y G siempre estaba unida por puentes de hidrógeno a C, en el eje de la doble hélice. El modelo de Watson y Crick probó ser correcto, e inició el camino de nuestra comprensión moderna del funcionamiento del DNA como material genético. En la actualidad, nuestros modelos más precisos acerca de la estructura del DNA provienen de estudios de difracción de rayos X de alta resolución, de cristales de DNA que fueron posibles merced a la síntesis química de grandes cantidades de moléculas cortas de DNA de longitud y secuencia uniforme, susceptibles de ser cristalizadas (Fig. 4-3a).

El DNA consiste en dos hebras de polinucleótidos asociados, que se enrollan juntas para formar una doble hélice. Los dos esqueletos de azúcar-fosfato están en el exterior de la doble hélice y las bases se proyectan al interior. Las bases enfrentadas de cada hebra se apilan una sobre otra en planos paralelos (Fig. 4-3a). La orientación de las dos hebras es *antiparalela*; es decir, sus direcciones 5' $\rightarrow$ 3' son opuestas. Las hebras se mantienen unidas con precisión por la formación de **pares de bases** entre las dos hebras: A se aparea con T mediante dos puentes de hidrógeno; G se aparea con C mediante tres puentes de hidrógeno (Fig. 4-3b). Esta complementariedad entre los pares de bases es consecuencia del tamaño, la forma y la composición química de las bases. La presencia de miles de estos puentes de hidrógeno en la molécula de DNA contribuye en gran medida a la estabilidad de la doble hélice. Las interacciones hidrofóbicas y de van der Waals entre los pares de bases adyacentes, apiladas, estabilizan adicionalmente la estructura de la doble hélice.

En el DNA natural, la A siempre forma puentes de hidrógeno con la T y la G siempre los forma con la C, constituyendo pares de bases A-T y G-C, según se muestra en la Figura 4-3b. Estas asociaciones, siempre entre una purina más grande y una pirimidina más pequeña, se llaman con frecuencia *pares de bases de Watson-Crick*. Las dos hebras de polinucleótidos, o regiones, en las cuales todos los nucleótidos forman estos

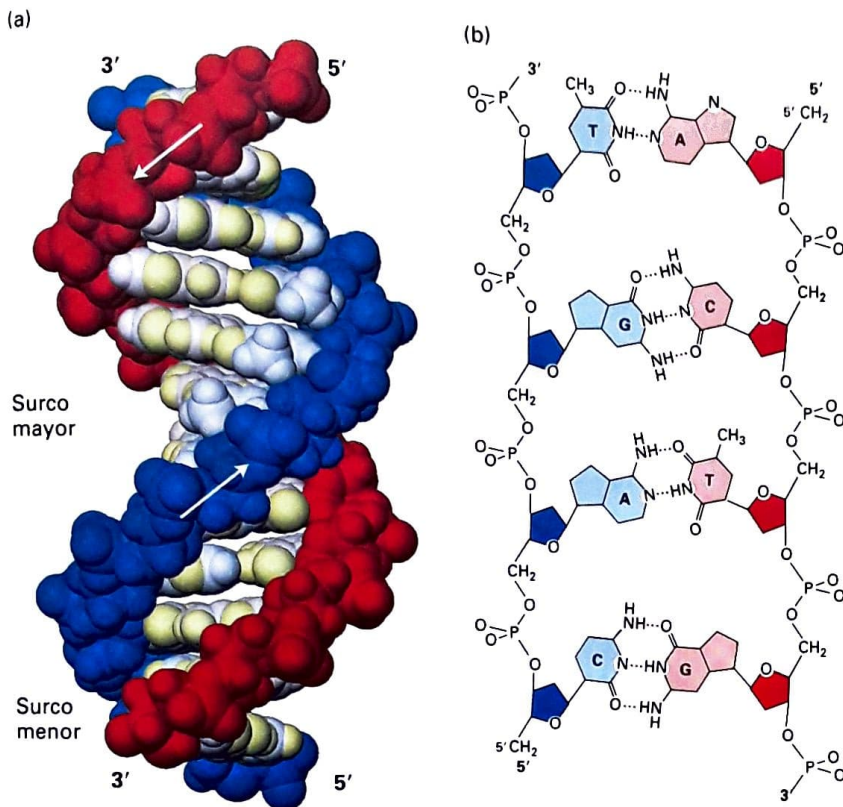


FIGURA 4-3 La doble hélice de DNA. (a) Modelo espacial del DNA B, la forma más común de DNA celular. Las bases (sombreado en color claro) se proyectan hacia el interior desde los esqueletos azúcar-carbono (rojo oscuro y azul) de cada hebra, pero sus bordes son accesibles a través de los surcos mayor y menor. Las flechas indican la dirección 5' → 3' de cada hebra. Los puentes de hidrógeno entre las bases se encuentran en el centro de la estructura. Los surcos mayor y menor están tapizados por donantes y aceptores potenciales de puentes de hidrógeno (marcados en amarillo). (b) Estructura química de la doble hélice de DNA. Este esquema extendido muestra los dos esqueletos azúcar-fosfato y los puentes de hidrógeno entre los pares de bases de Watson-Crick A-T y G-C. (Parte [a] adaptada de R. Wing y cols., 1980, *Nature* **287** 755. Parte [b] adaptada de R. E. Dickerson, 1983, *Sci. Am.* **249** 94.)

pares de bases se dice que son **complementarias**. Sin embargo, en teoría y en los DNA sintéticos, se pueden formar otros pares de bases. Por ejemplo, la guanina (una purina) teóricamente podría formar puentes de hidrógeno con la timina (una pirimidina) provocando sólo una distorsión menor de la hélice. El espacio disponible en la hélice también permitiría el apareamiento entre las dos pirimidinas, citosina y timina. Si bien normalmente los pares de bases no estándar G-T y C-T no se encuentran en el DNA, los pares de bases G-U son bastante comunes en las regiones de doble hélice que se forman en el RNA, que por lo demás, es monocatenario. Los pares de bases no estándar no surgen en forma natural en los dúplex de DNA, porque la enzima que copia el DNA, que se describe más adelante en este capítulo, no lo permite.

La mayoría del DNA de las células es una hélice *dextrógira*. El patrón de difracción de rayos X del DNA indica que las bases apiladas están espaciadas regularmente a 0,34 nm de distancia a lo largo del eje de la hélice. La hélice da un giro completo cada 3,4 nm a 3,6 nm, dependiendo de la secuencia; así, hay aproximadamente entre 10 y 10,5 pares de bases por vuelta. Esto se conoce como la forma B del DNA, la forma normal presente en la mayoría de los tramos de DNA de las células. En la parte externa de la *forma B* del DNA, los espacios entre las hebras enroscadas forman dos surcos helicoidales de diferente ancho, que se conocen como el *surco mayor* y el *surco menor* (véase la Fig. 4-3a). En consecuencia, los átomos que se encuentran en los bordes de cada base dentro de estos surcos son accesibles desde el exterior de la hélice formando dos tipos de superficies de unión. Las proteínas que se unen al DNA pueden “leer” la secuencia de bases en el dúplex de DNA, contactando con los átomos de los surcos mayor o menor.

En condiciones de laboratorio en las cuales la mayor parte del agua se elimina del DNA, la estructura cristalográfica de esta molécula cam-

bia a la *forma A*, que es más ancha y más corta que la forma B, con un surco mayor más ancho y profundo y un surco menor menos profundo y más estrecho (Fig. 4-4). En las células e in vitro, existen hélices RNA-DNA y RNA-RNA de esta forma.

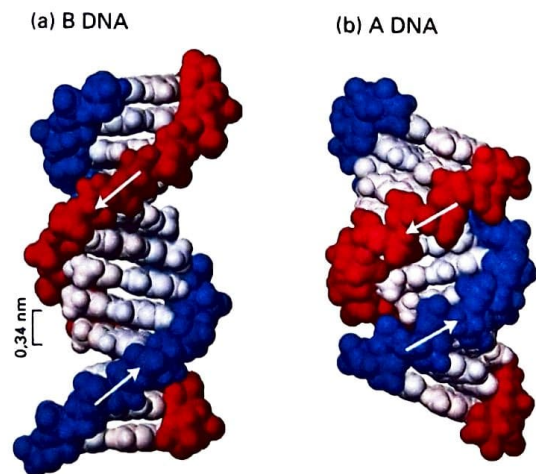


FIGURA 4-4 Comparación de las formas A y B del DNA. Los esqueletos azúcar-fosfato de las dos hebras que se encuentran en el exterior de ambas estructuras se muestran en rojo y en azul; las bases (sombreados más claros) se orientan hacia el interior. (a) La forma B del DNA tiene ≈ 10,5 pares de bases por giro de la hélice. Los pares de bases apilados adyacentes están a una distancia de 0,34 nm. (b) La forma A más compacta del DNA tiene 11 pares de bases por giro, con un surco mayor mucho más profundo y un surco menor mucho menos profundo que la forma B del DNA.

Como resultado de la unión de las proteínas a secuencias específicas de DNA, se producen importantes modificaciones en la estructura de la forma estándar B del DNA. Aunque la multitud de enlaces hidrofóbicos y puentes de hidrógeno entre las bases proporciona estabilidad a la molécula de DNA, la doble hélice es flexible a lo largo de su eje longitudinal. A diferencia de la hélice α de las proteínas (véase la Fig. 3-4), no hay puentes de hidrógeno paralelos al eje de la hélice de DNA. Esta propiedad permite que el DNA se curve cuando forma un complejo con una proteína capaz de unirse a él (Fig. 4-5). La curvatura del DNA es crítica para el empaquetamiento denso del DNA en la cromatina, el complejo proteína-DNA, en el cual se presenta el DNA nuclear en las células eucariontes (Cap. 6).

¿Por qué el DNA evolucionó para ser el portador de la información genética en las células y no el RNA? El hidrógeno en posición 2' en la desoxirribosa del DNA lo hace mucho más estable como molécula que el RNA, que en lugar de ello, tiene un grupo hidroxilo en la posición 2' de la ribosa (véase la Fig. 2-16). Los grupos 2'-hidroxilo del RNA participan en la hidrólisis lenta, catalizada por OH^- de los enlaces fosfodiéster a pH neutro (Fig. 4-6). La ausencia de grupos 2'-hidroxilo en el DNA evita este proceso. Por lo tanto, la presencia de desoxirribosa en el DNA lo hace una molécula más estable—una característica crítica para su función en el almacenamiento de la información genética a largo plazo—.

El DNA puede sufrir una separación reversible de las hebras

Durante la replicación y transcripción del DNA, las hebras de la doble hélice deben separarse para permitir que las caras internas de las bases se apareen con las bases de los nucleótidos que están polimerizándose en nuevas cadenas polinucleotídicas. En secciones posteriores, descri-

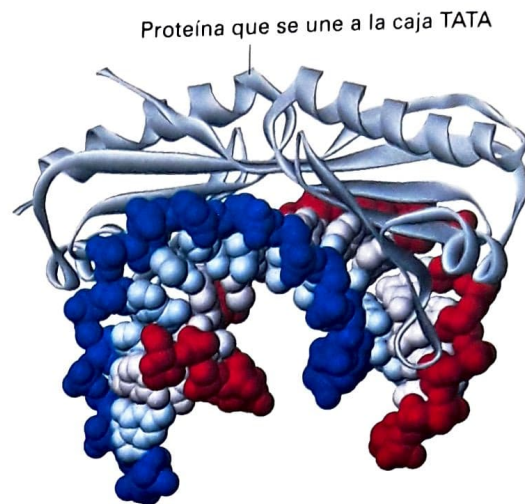


FIGURA 4-5 La interacción con las proteínas puede curvar el DNA.

El dominio C-terminal conservado de la proteína que se une a la caja TATA (TBP) se une al surco menor de secuencias específicas del DNA ricas en A y T, desenroscando y curvando profundamente la doble hélice. La transcripción de la mayoría de los genes eucariontes requiere de la participación de la TBP. (Adaptado de D. B. Nikolov y S. K. Burley, 1997, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 94:15.)

biremos los mecanismos celulares que separan y luego vuelven a asociar las hebras de DNA, durante la replicación y la transcripción. Aquí, analizaremos los factores fundamentales que influyen la separación y la nueva asociación de las hebras de DNA. Estas propiedades del DNA fueron esclarecidas mediante experimentos *in vitro*.

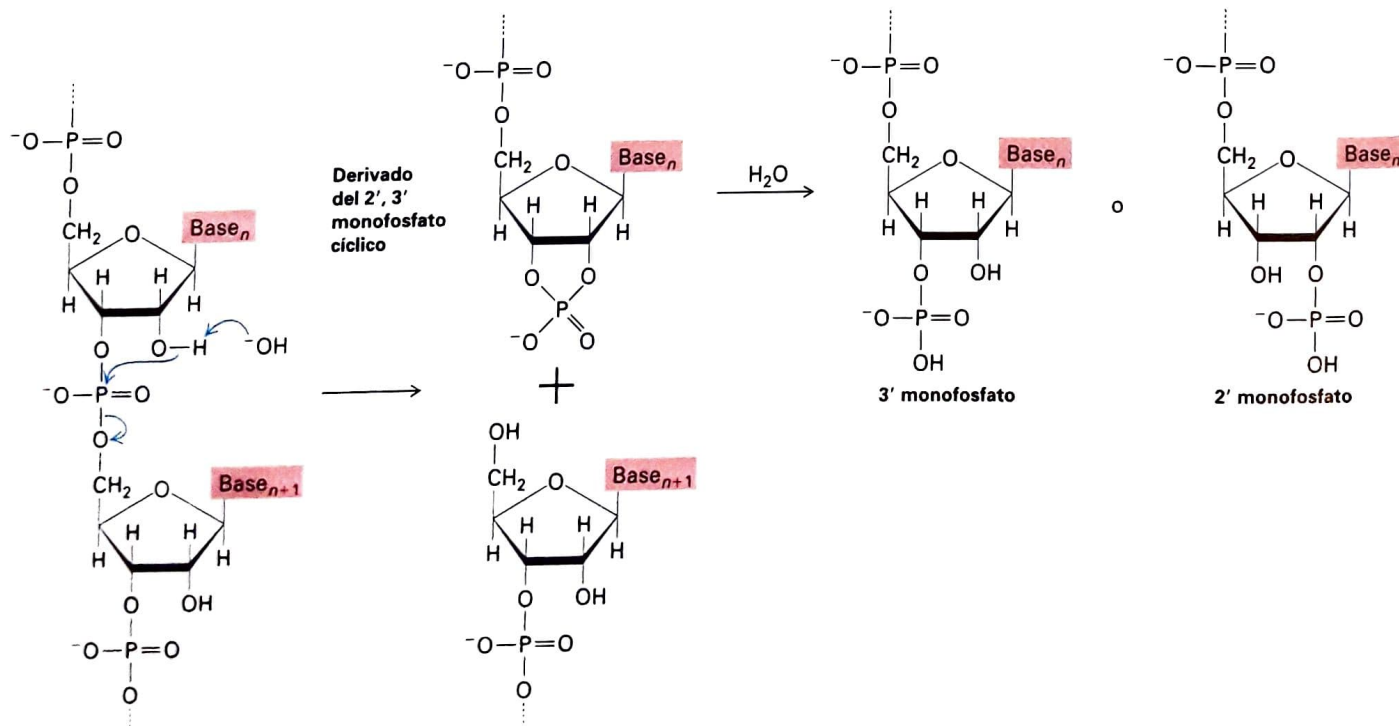


FIGURA 4-6 Hidrólisis del RNA catalizada por las bases. El grupo 2' hidroxilo del RNA puede actuar como un nucleófilo, que ataca el enlace fosfodiéster. El derivado monofosfato 2',3' cíclico es adicionalmente hidrolizado a una mez-

cla de monofosfatos 2' y 3'. Este mecanismo de hidrólisis del enlace fosfodiéster no puede ocurrir en el DNA, que carece de grupos 2' hidroxilo. (Adaptado de Nelson y cols., *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4th ed. W. H. Freeman and Company.)

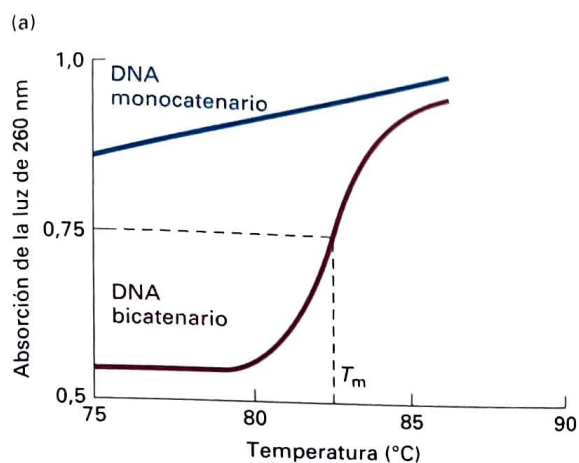
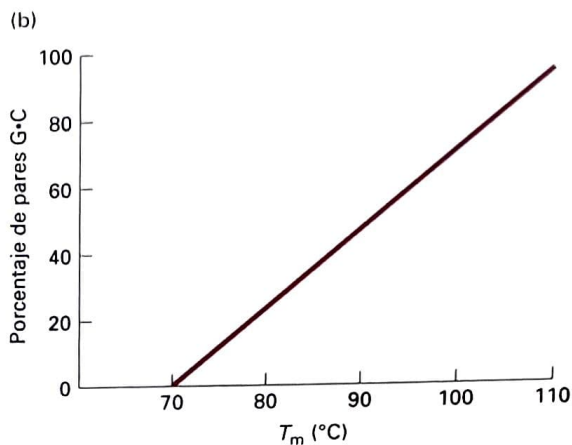


FIGURA EXPERIMENTAL 4-7 El contenido G-C afecta la temperatura de fusión. La temperatura a la cual el DNA se desnaturaliza se incrementa con la proporción de pares G-C. (a) La fusión del DNA de doble hebra puede ser controlada mediante la absorción de luz ultravioleta a 260 nm. A medida que las regiones de doble hebra del DNA se desaparean, la absorción de la luz en esas regiones se aumenta a casi el doble. La temperatura a la cual la mitad de

El desenrollamiento y la separación de las hebras del DNA, proceso conocido como **desnaturalización**, o “fusión”, pueden inducirse en forma experimental al aumentar la temperatura de una solución de DNA. A medida que aumenta la energía térmica, el incremento resultante en el movimiento de las moléculas finalmente rompe los puentes de hidrógeno y las otras fuerzas que estabilizan la doble hélice; luego se separan las hebras, y se apartan por la repulsión electrostática del esqueleto negativamente cargado de desoxirribosa-fosfato de cada hebra. Próximo a la temperatura de desnaturalización, un pequeño incremento de temperatura provoca una pérdida rápida, casi simultánea, de las múltiples interacciones débiles que mantienen unidas a las hebras a lo largo de toda la longitud de la molécula de DNA. Dado que las bases apiladas en el dúplex de DNA absorben menos luz ultravioleta (UV) que las bases no apiladas en el DNA de una sola hebra, esto lleva a un incremento abrupto en la absorción de la luz UV, un fenómeno conocido como **efecto hipercrómico** (Fig. 4-7a).

La **temperatura de fusión** (T_m) a la cual las hebras de DNA se separan, depende de varios factores. Las moléculas que contienen una mayor proporción de pares G-C requieren temperaturas más elevadas para desnaturalizarse, porque los tres puentes de hidrógeno en los pares G-C hacen a estos pares de bases más estables que a los pares A·T, que tienen solo dos puentes de hidrógeno. De hecho, el porcentaje de pares de bases G-C en una muestra de DNA puede estimarse a partir de su T_m (Fig. 4-7b). La concentración iónica también influye en la T_m porque los grupos fosfato, de carga negativa, de las dos hebras están protegidos por iones con carga positiva. Cuando la concentración iónica es baja este escudo disminuye, aumentando así las fuerzas de repulsión entre las hebras y reduciendo la T_m . Los agentes que desestabilizan los puentes de hidrógeno, como la formamida o la urea, también disminuyen la T_m . Finalmente, los pH extremos desnaturalizan el DNA a baja temperatura. A pH bajo (ácido), las bases se protonan y así se cargan positivamente, repeliéndose unas a otras. A pH elevado (alcalino), las bases pierden protones y se cargan negativamente, repeliéndose nuevamente entre sí a raíz de la carga similar. En las células, el pH y la temperatura



las bases en una muestra de DNA de doble hebra se ha desnaturalizado se denota con T_m (que significa “temperatura de fusión”). La absorción de la luz por el DNA de una sola hebra cambia mucho menos a medida que la temperatura se incrementa. (b) La T_m es una función del contenido de G-C del DNA; cuanto mayor sea el porcentaje de G+C, mayor será la T_m .

se mantienen en su mayor parte. Estas características de la separación del DNA son muy útiles para manipular el DNA en el laboratorio.

Las moléculas de DNA monocatenarias resultantes de la desnaturalización, forman espirales al azar sin una estructura organizada. Cuando se baja la temperatura, se aumenta la concentración iónica o se neutraliza el pH, las dos hebras complementarias se reasocian en una doble hélice perfecta. El grado de esta **renaturalización** depende del tiempo, la concentración de DNA y la concentración iónica. Dos hebras de DNA que no están relacionadas en su secuencia permanecerán como espirales al azar y no se renaturalizarán; lo que es aún más importante, no impedirán que hebras complementarias se encuentren y se renaturalicen. La desnaturalización y renaturalización del DNA son la base de la **hibridación** de los ácidos nucleicos, una poderosa técnica empleada para estudiar el grado de parentesco de dos muestras de DNA, y para detectar y aislar moléculas específicas de DNA en una mezcla que contenga numerosas secuencias diferentes de éste (véase la Fig. 5-16).

El estrés de torsión del DNA se alivia por acción enzimática

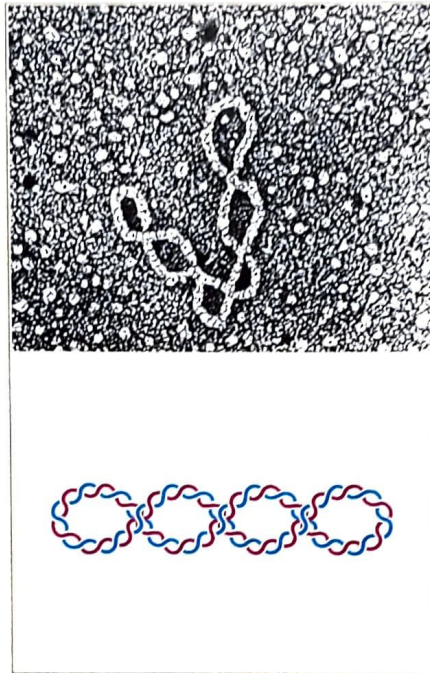
Muchos DNA del genoma bacteriano y muchos DNA virales son moléculas circulares. Las moléculas de DNA circular también existen en las mitocondrias presentes en casi todas las células eucariotes y en los cloroplastos de las plantas y en algunos eucariotes unicelulares.

Cada una de las dos hebras de una molécula de DNA circular forma una estructura cerrada sin extremos libres. El desenrollamiento localizado de una molécula de DNA circular, que tiene lugar durante la replicación del DNA, induce un estrés de torsión en el resto de la molécula, porque los extremos de las hebras no tienen libertad de rotación. Como resultado de ello, la molécula de DNA se enrolla sobre sí misma como una banda elástica retorcida, formando **superenrollamientos** (Fig. 4-8a). En otras palabras, cuando parte de la hélice de DNA se desenrolla, se introducen **superenrollamientos** dextrógiros en la molécula de

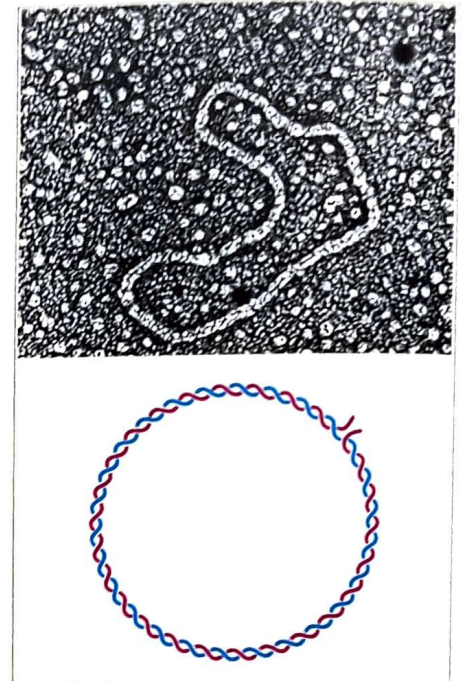
FIGURA EXPERIMENTAL 4-8

La topoisomerasa I alivia el estrés de torsión del DNA. (a) Fotomicrografía electrónica del DNA viral del SV40. Cuando se aísla y se separa el DNA circular del virus SV40 de su proteína asociada, el dúplex del DNA se desenrolla y asume la configuración superenrollada. (b) Si un DNA superenrollado tiene una muesca (es decir, una hebra se corta) las hebras pueden volver a enrollarse, lo que lleva a la pérdida del superenrollamiento. La topoisomerasa I cataliza esta reacción y también vuelve a sellar los extremos cortados. Todo el superenrollamiento en el DNA aislado del SV40 puede eliminarse mediante la acción secuencial de esta enzima, produciendo una conformación de círculo relajado. Por claridad, las formas de las moléculas en la parte inferior se han simplificado.

(a) Superenrollado



(b) Círculo relajado



DNA circular, como aparece en la Figura 4-8a. Sin embargo, las células bacterianas y eucariontes contienen *topoisomerasa I*, que puede aliviar cualquier estrés de torsión que se desarrolle en las moléculas de DNA celular durante la replicación u otros procesos. Esta enzima se une al DNA en sitios al azar, y rompe un enlace fosfodiéster en una hebra. Este corte en una hebra del DNA se denomina *muesca*. El extremo roto luego se enrolla alrededor de la hebra que no se ha cortado, llevando a la pérdida de los superenrollamientos (Fig. 4-8b). Finalmente, la misma enzima une (liga) los dos extremos de la hebra rota. Otro tipo de enzima, la *topoisomerasa II*, hace cortes en ambas hebras de un DNA de doble hebra y luego vuelve a unirlos. Como resultado, la topoisomerasa II puede tanto aliviar el estrés de torsión como unir dos moléculas de DNA circulares, tal como en los eslabones de una cadena.

Aunque el DNA nuclear de los eucariontes es lineal, grandes bucles de DNA están fijos en su lugar dentro de los cromosomas (Cap. 6). De este modo, el estrés de torsión y la formación consecuente del superenrollamiento, también podrían ocurrir durante la replicación del DNA nuclear. Como sucede con las bacterias, la abundante topoisomerasa I de los núcleos eucariontes alivia cualquier estrés de torsión, que podría desarrollarse en ausencia de esta enzima, en el DNA nuclear.

Diferentes tipos de RNA muestran varias conformaciones relacionadas con sus funciones

La estructura primaria del RNA, en general, es similar a la del DNA con dos excepciones: el azúcar componente del RNA, la ribosa, tiene un grupo hidroxilo en la posición 2' (véase la Fig. 2-16b) y la timina del DNA es reemplazada por el uracilo del RNA. La presencia de timina en lugar de uracilo en el DNA es importante para la estabilidad a largo plazo de éste por su función en la reparación del DNA (véase la Sección 4.7). Como se indicó previamente, el grupo hidroxilo en el

C 2' de la ribosa, vuelve al RNA más lábil químicamente que el DNA. Como resultado de esta labilidad, el RNA se segmenta en mononucleótidos en solución alcalina (véase la Fig. 4-6), mientras que el DNA no lo hace. El hidroxilo del C 2' del RNA también proporciona un grupo químicamente reactivo que participa en la catálisis mediada por RNA. Al igual que el DNA, el RNA es un polinucleótido largo, que puede ser de doble hebra o de una sola hebra, lineal o circular. También puede participar en una hélice híbrida compuesta por una hebra de RNA y una de DNA. Como se analizó previamente, las dobles hélices RNA-RNA y RNA-DNA tienen una conformación compacta como la forma A del DNA (véase la Fig. 4-4b).

A diferencia del DNA, que existe principalmente como una doble hélice muy larga, la mayoría de los RNA celulares son de una sola hebra y muestran una variedad de conformaciones (Fig. 4-9). Las diferencias de tamaño y conformación de los distintos tipos de RNA les permiten desempeñar funciones específicas en una célula. Las estructuras secundarias más simples de los RNA monocatenarios se forman por el apareamiento de bases complementarias. Se generan "horquillas" por el apareamiento de bases con una longitud de $\approx 5-10$ nucleótidos cada una y "tallos-bucles" por apareamiento de bases que se encuentran separadas desde > 10 a varios cientos de nucleótidos. Estos simples pliegues pueden cooperar para formar estructuras terciarias más complicadas, una de las cuales se denomina "seudonudo".

Como se analizará en detalle más adelante, las moléculas de tRNA adoptan una arquitectura tridimensional bien definida en solución, que resulta crucial para la síntesis proteica. Las moléculas de rRNA más grandes también tienen estructuras tridimensionales locales bien definidas, con conectores más flexibles entre ellos. También se han reconocido estructuras secundarias y terciarias en el mRNA, en particular cerca de los extremos de las moléculas. Claramente entonces, las moléculas de RNA son como las proteínas.

A diagram of a hairpin loop structure. It shows a single strand of nucleic acid (represented by a red line) that folds back on itself to form a double-stranded stem (represented by two parallel lines, one red and one blue) and a single-stranded loop (represented by a red line). The label 'H' is placed next to the stem.

Región de tallo doble helicoidal

Tallo-bucle

Seudonudo

C
 U
 C
 U
 U
 U
 U
 U
 U
 GC
 UA
 CG
 GC
 GC
 GC
 5' GC

3'
 GC
 CG
 UA
 GC
 AU
 CG
 UA
 UA
 UA
 UA
 A
 A
 A
 C A

Diagram illustrating a DNA double helix structure. The strands are labeled 'Tallo 1' and 'Tallo 2'. The loops are labeled 'Bucle 1' and 'Bucle 2'. The 3' end is indicated at the top right.

la derecha adaptados de C. A. Theimer y cols., 2005, *Mol. Cell* **17**:671)

Los dominios plegados de las moléculas de RNA no solo son estructuralmente análogos a las hélices α y las hebras β que se encuentran en las proteínas, sino que —en algunos casos— también tienen capacidad catalítica. Estos RNA catalíticos se llaman **ribozimas**. Aunque las ribozimas habitualmente se asocian con proteínas que estabilizan su estructura, el que actúa como catalizador es el RNA. Algunas ribozimas pueden catalizar el corte y empalme, un proceso notable en el cual una secuencia de RNA interna se corta y elimina, y las dos cadenas resultantes luego se unen. Este proceso ocurre durante la formación de la mayoría de las moléculas funcionales de mRNA en los eucariontes multicelulares, y también en los eucariontes unicelulares como las levaduras, las bac-

En este capítulo nos centraremos en las funciones del mRNA, el tRNA y el rRNA en la expresión génica. En capítulos posteriores encontraremos otros RNA, asociados con frecuencia con proteínas, que participan en otras funciones celulares.

Estructura de los ácidos nucleicos

- El ácido desoxirribonucleico (DNA), el material genético, lleva la información para especificar las secuencias de aminoácidos de las proteínas. Se transcribe a varios tipos de ácido ribonucleico (RNA) que incluyen el RNA mensajero (mRNA), el RNA de transferencia (tRNA) y el RNA ribosómico (rRNA), que funcionan en la síntesis proteica (véase la Fig. 4-1).
- Todos los DNA y la mayoría de los RNA son polímeros largos no ramificados de nucleótidos que consisten en una pentosa fosforilada ligada a una base orgánica, ya sea una purina o una pirimidina.
- Las purinas adenina (A) y guanina (G) y la pirimidina citosina (C) están presentes tanto en el DNA como en el RNA. La pirimidina timina (T), presente en el DNA, es reemplazada por la pirimidina uracilo (U) en el RNA.
- Los nucleótidos adyacentes en un polinucleótido están unidos por enlaces fosfodiéster. La hebra completa tiene una direccionalidad química con los extremos 5' y 3' (véase la Fig. 4-2).
- El DNA natural (DNA B) contiene dos hebras de polinucleótidos antiparalelas complementarias enrolladas juntas en una doble hélice regular dextrógira, con las bases en el interior y los dos esqueletos azúcar-fosfato en la exterior (véase la Fig. 4-3). El apareamiento de bases entre las hebras y las interacciones hidrofóbicas entre los pares de bases adyacentes apiladas perpendiculares al eje de la hélice estabilizan su estructura nativa.
- Las bases de los ácidos nucleicos pueden interactuar vía los puentes de hidrógeno. Los pares de bases estándar de Watson-Crick son G-C, A-T (en el DNA) y G-C, A-U (en el RNA). El apareamiento de bases estabiliza las estructuras tridimensionales nativas del DNA y el RNA.
- La unión de las proteínas al DNA puede deformar su estructura helicoidal, provocando la curvatura local o el desenrollamiento de la molécula del DNA.
- El calor hace que las hebras del DNA se separen (desnaturalicen). La temperatura de fusión en T_m del DNA aumenta con el porcentaje de pares de bases G-C. En condiciones adecuadas, las hebras de ácidos nucleicos complementarias separadas se renaturalizarán.
- Las moléculas de DNA circular pueden enrollarse sobre sí mismas, formando superenrollamientos (véase la Fig. 4-8). Las enzimas llamadas topoisomerasas pueden aliviar el estrés de torsión y eliminar las superespirales de las moléculas de DNA circular. El DNA lineal largo

también puede experimentar estrés de torsión dado que los bucles grandes están fijos en su lugar dentro de los cromosomas.

- Los RNA celulares son polinucleótidos de hebra simple, parte de los cuales formarán estructuras secundarias y terciarias bien definidas (véase la Fig. 4-9). Algunos RNA, llamados ribozimas, tienen actividad catalítica.

4.2 Transcripción de los genes que codifican proteínas y formación de mRNA funcional

La definición más simple de gen es “unidad de DNA que contiene la información para especificar la síntesis de una única cadena polipeptídica o de un RNA funcional (como un tRNA)”. Las moléculas de DNA de los virus pequeños contienen solo unos pocos genes, mientras que la molécula de DNA individual de cada cromosoma de los animales superiores y las plantas puede contener varios miles de genes. La gran mayoría de los genes lleva información para sintetizar moléculas de proteína y son las copias de RNA de estos *genes que codifican proteínas* las que constituyen las moléculas de mRNA de las células.

Durante la síntesis de RNA, el lenguaje de cuatro bases del DNA que contiene A, G, C y T se copia de manera simple, o se *transcribe*, al lenguaje de cuatro bases del RNA, que es idéntico excepto en el hecho de que el U reemplaza a la T. Por el contrario, durante la síntesis proteica, el lenguaje de cuatro bases del DNA y el RNA se traduce al lenguaje de veinte aminoácidos de las proteínas. En esta sección nos centramos en la formación de mRNA funcionales a partir de genes codificantes para proteínas (véase la Fig. 4-1, paso 1). Un proceso similar da precursores de los rRNA y los tRNA codificados por los genes de rRNA y tRNA; estos precursores luego se modifican para dar moléculas funcionales de rRNA y tRNA (Cap. 8). De modo similar, miles de **micro RNA (miRNA)** que regulan la traducción de mRNA diana específicos se transcriben a precursores por acción de las RNA polimerasas, y se procesan a miRNA funcionales (Cap. 8). Otros RNA que no codifican proteínas (o simplemente “no codificantes”) ayudan a regular la transcripción de los genes que codifican para proteínas específicas. La regulación de la transcripción permite que diferentes conjuntos de genes se expresen en los múltiples tipos diferentes de células que constituyen un organismo multicelular. Permite también que diferentes cantidades de mRNA se transcriban a partir de diferentes genes, dando como resultado diferencias en las cantidades de proteínas codificadas en una célula. La regulación de la transcripción se trata en el Capítulo 7.

Una hebra molde de DNA se transcribe a una cadena complementaria de RNA por la RNA polimerasa

Durante la transcripción del DNA, una cadena de DNA actúa como *molde*, lo que determina el orden en el cual se polimerizarán los monómeros de ribonucleósido trifosfato (rNTP) para formar una cadena complementaria de RNA. Las bases en la hebra molde de DNA se aparean con las bases complementarias en los rNTP entrantes, que luego se unen en una reacción de polimerización catalizada por la **RNA po-**

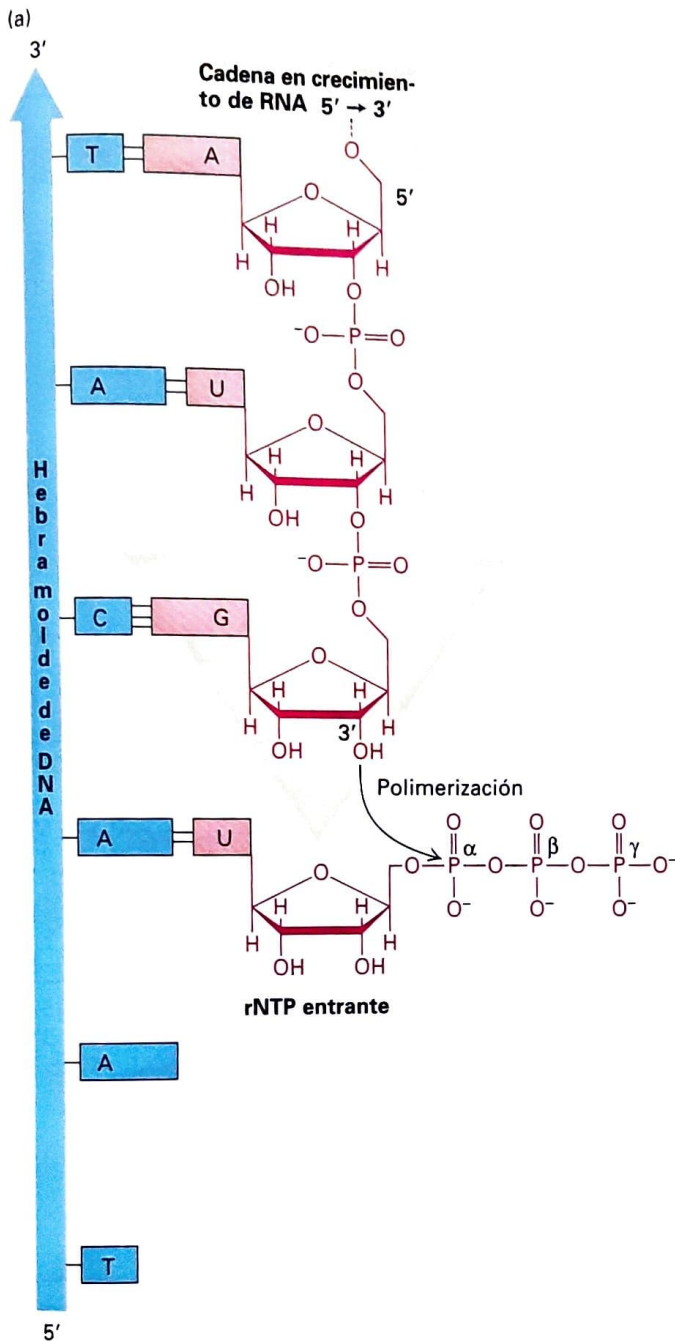
limerasa. La polimerización implica un ataque nucleofílico por el oxígeno 3' en la cadena creciente de RNA sobre el fosfato α del siguiente nucleótido precursor que será añadido, dando como resultado la formación de un enlace fosfodiéster y la liberación de pirofosfato (PP_i). Como consecuencia de este mecanismo, las moléculas de RNA siempre se sintetizan en la dirección $5' \rightarrow 3'$ (Fig. 4-10a).

El balance energético de la reacción de polimerización, rápidamente favorece la adición de ribonucleótidos a la cadena de RNA creciente, porque la alta energía de enlace entre los fosfatos α y β de los monómeros de rNTP, es reemplazada por el enlace fosfodiéster de más baja energía, que se forma entre los nucleótidos. El equilibrio de la reacción es conducido hacia adelante en sentido de la elongación de la cadena por la pirofosfata-sa, una enzima que cataliza la escisión del PP_i liberado en dos moléculas de fosfato inorgánico. Al igual que las dos hebras del DNA, la hebra de DNA molde y la hebra creciente de RNA que se aparea mediante sus bases a ella tienen una direccionalidad opuesta $5' \rightarrow 3'$.

Por convención, el sitio sobre el DNA en el cual comienza la transcripción de la RNA polimerasa se designa como +1 (Fig. 4-10b). Corriente abajo denota la dirección en la cual se transcribe la hebra del DNA molde; corriente arriba denota la dirección opuesta. Las posiciones de los nucleótidos en la secuencia de DNA *corriente abajo* a partir de un sitio de iniciación se indican con un signo positivo (+); las que se encuentran *corriente arriba*, con un signo negativo (-). Dado que el RNA se sintetiza $5' \rightarrow 3'$, la RNA polimerasa se mueve a lo largo de la hebra molde de DNA en dirección $3' \rightarrow 5'$. El RNA recién sintetizado es complementario a la hebra molde de DNA; por lo tanto, es idéntico a la cadena de DNA que no sirve de molde, pero con uracilo en lugar de timina.

Etapas de la transcripción Para llevar a cabo la transcripción, la RNA polimerasa desempeña varias funciones distintas, como se muestra en la Figura 4-11. Durante la *iniciación* de la transcripción, la RNA polimerasa, con ayuda de los factores de iniciación que se comentarán más tarde, reconoce y se une a un sitio específico llamado el **promotor**, presente en el DNA de doble hebra (paso 1). Después de la unión, la RNA polimerasa y los factores de iniciación separan las hebras de DNA para que las bases de la hebra molde queden disponibles para aparearse con las bases de los ribonucleósido trifosfatos que polimerizarán. Las RNA polimerasas y los factores de iniciación luego desnaturalizan 12 a 14 pares de bases del DNA vecino al sitio de iniciación de la transcripción, que se localiza sobre la hebra molde, dentro de la región promotora (paso 2). Esto permite que la hebra molde entre al sitio activo de la enzima que cataliza la formación del enlace fosfodiéster entre los ribonucleótido trifosfatos, que son complementarios con la hebra molde del promotor, en el sitio de iniciación de la transcripción. La región de 12 a 14 pares de bases del DNA desnaturalizado la polimerasa se conoce como *burbuja de transcripción*. La iniciación de la transcripción se considera completa cuando los primeros dos ribonucleótidos de la cadena del RNA se encuentran unidos mediante un enlace fosfodiéster (paso 3).

Después de que se han polimerizado varios ribonucleótidos, la RNA polimerasa se disocia del DNA promotor y los factores generales de la transcripción. Durante la etapa de *elongación de la hebra*, la RNA polimerasa se mueve a lo largo del DNA molde, una base por vez, abriendo el DNA de doble hebra frente a su dirección de avance y guiando a las hebras juntas de modo tal que se hibriden en el extremo corriente arriba de la burbuja de transcripción (Fig. 4-11, paso 4). Se añade un ribonucleótido a la vez al extremo 3' de la cadena de RNA



creciente (*naciente*) durante la elongación de la hebra por acción de la polimerasa. La enzima mantiene una región desnaturalizada de aproximadamente catorce pares de bases en la burbuja de transcripción. Aproximadamente ocho nucleótidos en el extremo 3' de la hebra creciente de RNA permanecen apareados con las bases a la hebra molde del DNA en la burbuja de transcripción. El complejo de elongación que comprende la RNA polimerasa, el molde de DNA y la cadena creciente (*naciente*) de RNA es muy estable. Por ejemplo, la RNA polimerasa transcribe el gen de mamífero más largo conocido que contiene aproximadamente dos millones de pares de bases, sin disociarse del DNA molde ni liberar el RNA naciente. La síntesis del RNA ocurre a una velocidad de aproximadamente 1 000 nucleótidos por minuto a 37 °C, de modo tal que el complejo de elongación debe permanecer intacto durante más de 24 horas para asegurar la síntesis continuada del pre-mRNA para este gen tan largo.

FIGURA 4-10 El RNA se sintetiza 5' → 3'. (a) Polimerización de los ribonucleótidos por la RNA polimerasa durante la transcripción. El ribonucleótido que debe ser añadido en el extremo 3' de una hebra de RNA creciente es especificado por el apareamiento de bases entre la siguiente base en la hebra molde de DNA y el ribonucleósido trifosfato (rNTP) entrante complementario. Se forma un enlace fosfodiéster cuando la RNA polimerasa cataliza una reacción entre el O 3' de la hebra creciente y el fosfato α de un rNTP correctamente apareado por sus bases. Las hebras de RNA siempre se sintetizan en la dirección 5' → 3' y tienen polaridad opuesta a sus hebras molde de DNA. (b) Convenciones para describir la transcripción de RNA. Arriba: el nucleótido de DNA en el que la RNA polimerasa inicia la transcripción se designa +1. La dirección en que la polimerasa viaja sobre el DNA es "corriente abajo", y las bases se marcan con números positivos. La dirección opuesta es "corriente arriba" y las bases se marcan con números negativos. Algunas características importantes de los genes se encuentran corriente arriba del sitio de iniciación de la transcripción, incluida la secuencia promotora que reconoce la RNA polimerasa en el gen. (Abajo) La hebra de DNA que está transcribiéndose es la hebra molde; su complemento, la hebra no molde. El RNA que está sintetizándose es complementario a la hebra molde, y por lo tanto idéntico a la secuencia de la hebra no molde, excepto con uracilo en lugar de timina. (Parte [b] adaptada de Griffiths y cols., *Modern Genetic Analysis*, 2d ed, W. H. Freeman and Company)

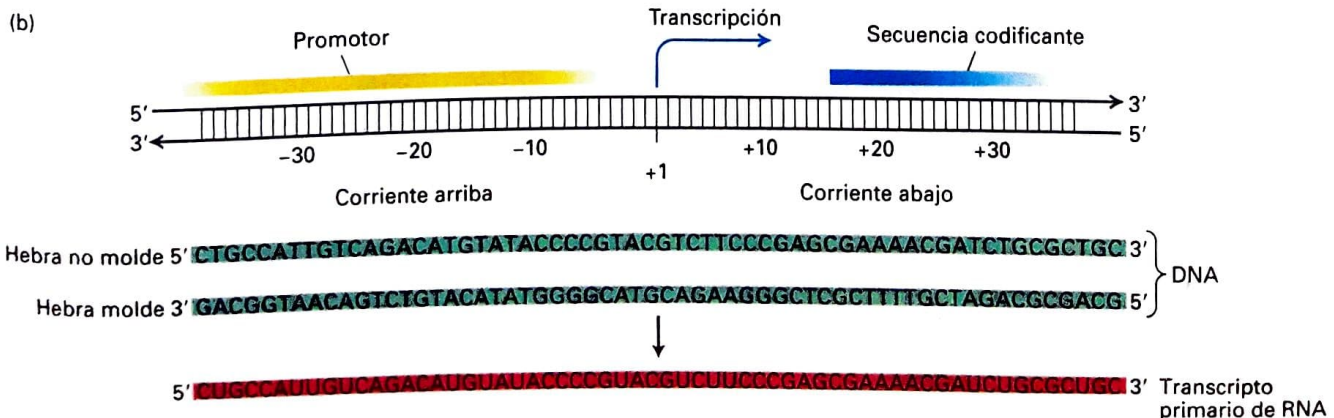
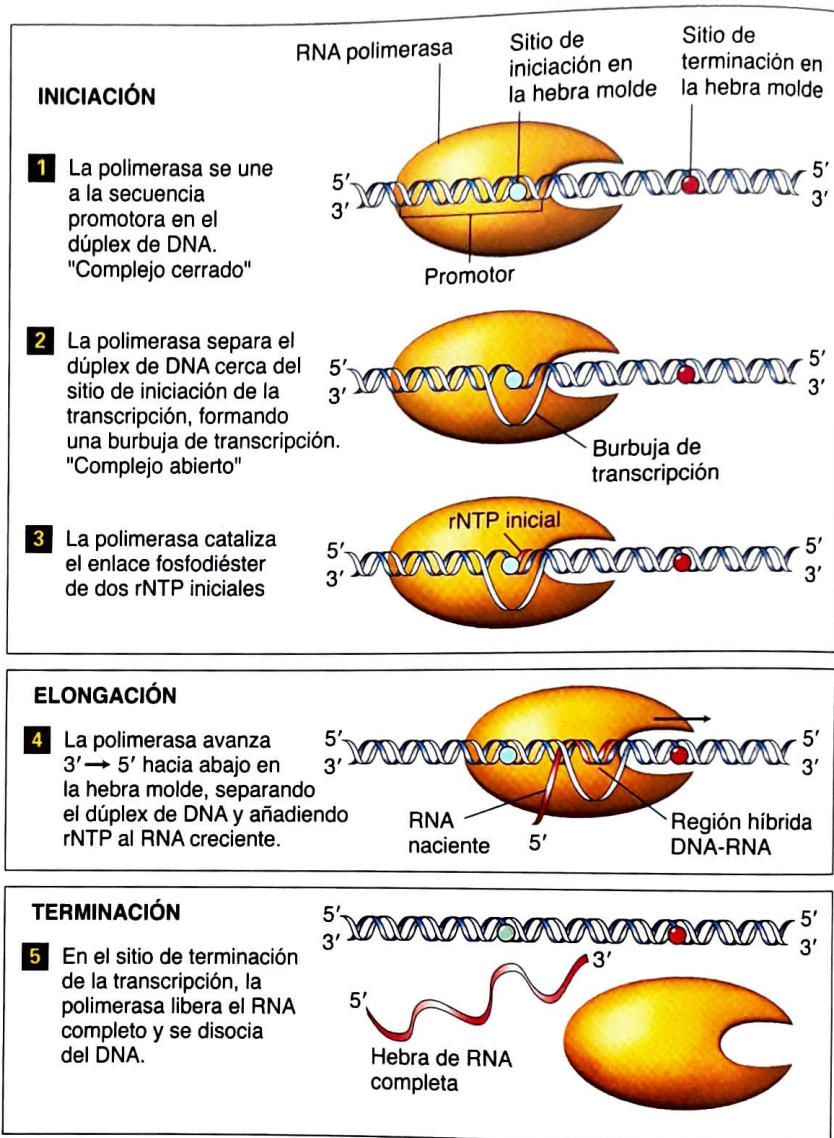


FIGURA 4-11 Las tres etapas de la transcripción. Durante la iniciación de la transcripción, la RNA polimerasa forma una burbuja de transcripción y comienza la polimerización de los ribonucleótidos (rNTP) en el sitio de iniciación, que se localiza dentro de la región promotora. Una vez que una región de DNA se ha transcrito, las hebras separadas se reasocian en una doble hélice. El RNA naciente se desplaza de la hebra molde excepto en su extremo 3'. El extremo 5' de la hebra de RNA sale de la RNA polimerasa a través de un canal de la enzima. La terminación se produce cuando la polimerasa se encuentra con una secuencia de terminación específica (sitio de detención). Véase el texto para detalles. Por simplicidad, el diagrama muestra la transcripción de cuatro giros de la doble hélice que codifica ≈ 40 nucleótidos de RNA. La mayoría de los RNA son considerablemente más largos y requieren la transcripción de una región del DNA más larga.



Durante la *terminación* de la transcripción, la etapa final de la síntesis del RNA, se libera la molécula completa de RNA desde la RNA polimerasa y la enzima se disocia del DNA molde (Fig. 4-11, paso 5). Una vez liberada, la RNA polimerasa es libre de transcribir el mismo gen nuevamente u otro gen.

Estructura de las RNA polimerasas Las RNA polimerasas de las bacterias, arqueobacterias y células eucariontes son fundamentalmente similares en su estructura y función. Las polimerasas de los RNA bacterianos están compuestas por dos subunidades grandes relacionadas (β' y β), dos copias de una subunidad más pequeña (α) y una copia de una quinta subunidad (ω) que no es esencial para la transcripción o la viabilidad celular, pero que estabiliza la enzima y asiste en el ensamblado de sus subunidades. Las RNA polimerasas de las arqueobacterias y los eucariontes tienen varias subunidades pequeñas adicionales, asociadas con este complejo central, que describiremos en el Capítulo 7. Los diagramas esquemáticos del proceso de transcripción, generalmente muestran una RNA polimerasa unida a una molécula de DNA no curvada, como se muestra en la Figura 4-11. Sin embargo, la cristalografía de rayos X y otros estudios de una RNA polimerasa bacteriana en elongación, indican que el DNA se curva en la burbuja de transcripción (Fig. 4-12).

bacterias y los eucariontes tienen varias subunidades pequeñas adicionales, asociadas con este complejo central, que describiremos en el Capítulo 7. Los diagramas esquemáticos del proceso de transcripción, generalmente muestran una RNA polimerasa unida a una molécula de DNA no curvada, como se muestra en la Figura 4-11. Sin embargo, la cristalografía de rayos X y otros estudios de una RNA polimerasa bacteriana en elongación, indican que el DNA se curva en la burbuja de transcripción (Fig. 4-12).

La organización de los genes difiere en el DNA procarionte y eucarionte

Habiendo resumido el proceso de la transcripción, ahora consideraremos brevemente la disposición a gran escala de la información

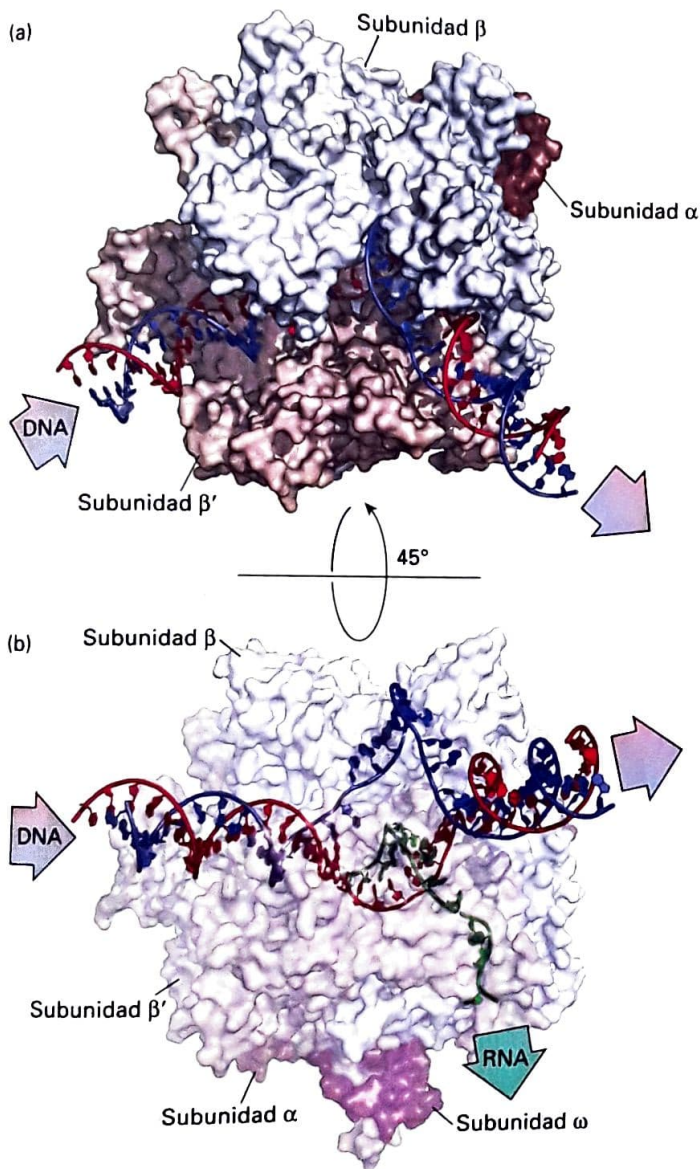


FIGURA 4-12 Polimerasa de RNA bacteriano. Esta estructura corresponde a la molécula de polimerasa en la fase de elongación (paso 4) de la Figura 4-11. En estos diagramas, la transcripción avanza hacia la izquierda. Las flechas indican en qué zona corriente abajo el DNA entra a la polimerasa y corriente arriba sale a un ángulo desde el DNA corriente abajo; la hebra codificante es roja y la no codificante, azul; el RNA nascente es verde. La subunidad de la RNA polimerasa β' es dorada, la subunidad β es gris y la subunidad α es visible en color pardo. El diagrama superior es un modelo espacial del complejo de elongación visto desde un ángulo que pone énfasis en la curvatura del DNA cuando este pasa a través de la polimerasa. El complejo de elongación está rotado en el diagrama inferior, como se muestra, y las proteínas se han representado en su mayor parte transparentes para que muestren la estructura de la burbuja de transcripción dentro de la polimerasa que no se ve en el modelo espacial. Se añaden nucleótidos complementarios al extremo 3' de la hebra nascente de RNA (a la izquierda). El RNA nascente recién sintetizado sale de la polimerasa en la parte inferior a través de un canal formado entre las subunidades β y β'. La subunidad ω y la otra subunidad α son visibles desde este ángulo. (Cortesía de Serh Darst; véase N. Kozhmina y cols., 2000, *Science* **289**: 619-625, y N. Opalka y cols., 2003, *Cell* **114**: 335-345)

en el DNA y de qué manera esta disposición dicta los requisitos para la síntesis del RNA, de modo tal que la transferencia de la información se produzca fácilmente. En años recientes, la secuenciación de **genomas** completos de múltiples organismos ha revelado no sólo grandes variaciones en el número de genes que codifican proteínas sino también diferencias en sus organizaciones en las bacterias y en los eucariontes.

La disposición más común de los genes que codifican proteínas en todas las bacterias, tiene una lógica poderosa y atractiva: los genes que codifican proteínas que funcionan juntas, por ejemplo las enzimas necesarias para sintetizar el aminoácido triptófano, con frecuencia se encuentran contiguos en el DNA. Esta disposición de los genes en un grupo funcional se llama **operón** porque opera como una unidad a partir de un único promotor. La transcripción de un operón produce una hebra continua de mRNA, que lleva el mensaje para una serie de proteínas relacionadas (Fig. 4-13a). Cada sección del mRNA representa la unidad (o gen) que codifica una de las proteínas de la serie. Esta disposición resulta en la **expresión coordinada** de todos los genes del operón. Cada vez que una molécula de RNA polimerasa inicia la transcripción en el promotor del operón, todos los genes del operón se transcriben y se traducen. En el DNA procarionte, los genes están íntimamente empaquetados, con muy pocos huecos no codificantes, y el DNA se transcribe en forma directa al mRNA. Dado que en los procariontes el DNA no está separado en un núcleo, los ribosomas tienen acceso inmediato a los sitios de iniciación de la traducción en el mRNA, a medida que emergen desde la superficie de la RNA polimerasa. En consecuencia, la traducción del mRNA comienza aun cuando el extremo 3' del mRNA todavía está siendo sintetizado en el sitio activo de la RNA polimerasa.

Este agrupamiento económico de genes dedicados a una función metabólica única no ocurre en los eucariontes, ni siquiera en los más simples como las levaduras, que pueden ser metabólicamente similares a las bacterias. En lugar de esto, los genes eucariontes que codifican proteínas que funcionan en conjunto, con frecuencia se encuentran físicamente separados en el DNA; de hecho, tales genes por lo general se localizan en diferentes cromosomas. Cada gen se transcribe con su propio promotor, que produce un mRNA que generalmente se traduce para producir un único polipéptido (Fig. 4-13b).

Cuando los investigadores compararon por primera vez las secuencias de nucleótidos de los mRNA eucariontes de organismos multicelulares con las secuencias de los DNA que los codificaban, se sorprendieron al encontrar que la secuencia codificante de proteínas ininterrumpida de un mRNA dado era discontinua en su sección correspondiente de DNA. Concluyeron que los genes eucariontes eran fragmentos de secuencias codificantes, los **exones**, separados por segmentos que no codificaban proteínas, los **intrones**. Este hallazgo sorprendente, implicó que los intrones se eliminan del **transcripto primario** inicial largo —la copia de RNA de la secuencia de DNA transcrita completa— y los exones restantes se cortan y empalman juntos para producir los mRNA eucariontes.

Si bien los intrones son comunes en los eucariontes multicelulares, son extremadamente raros en las bacterias y en las arqueobacterias y poco comunes en muchos eucariontes unicelulares como la levadura común. Sin embargo, los intrones están presentes en el DNA de los virus que infectan las células eucariontes. De hecho, la presencia de intrones fue descubierta en estos virus, cuyo DNA es transcripto por las enzimas de las células del huésped.

(a) Procariontes

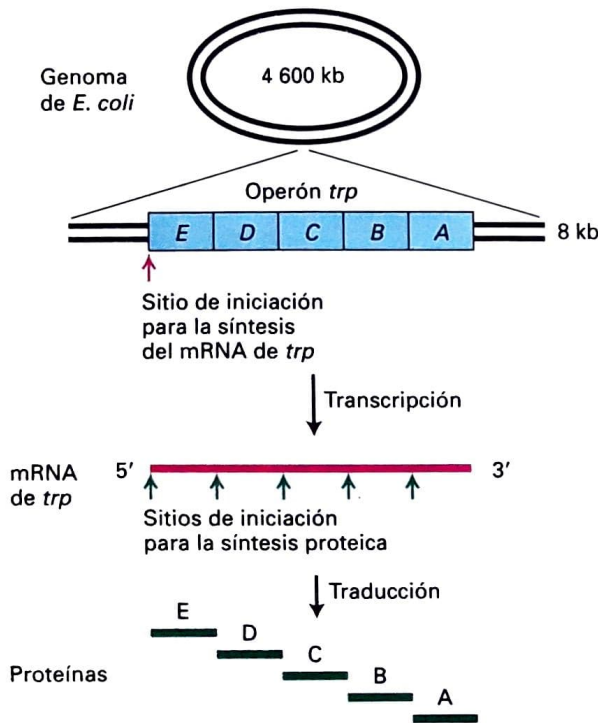
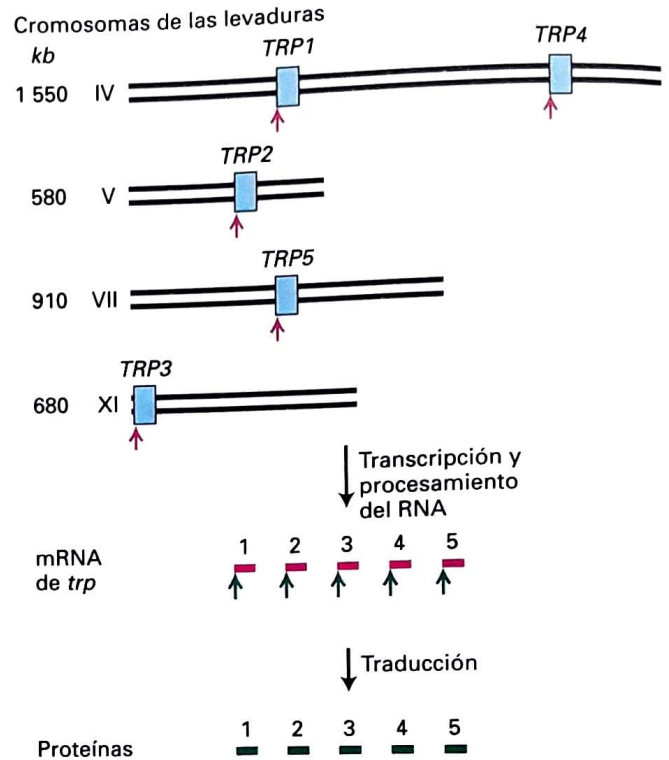


FIGURA 4-13 Organización de los genes en procariontes y eucariontes.

(a) El operón de triptófano (*trp*) es un segmento continuo del cromosoma de *E. coli* que contiene cinco genes (en azul) que codifican las enzimas necesarias para la síntesis consecutiva del triptófano. Todo el operón se transcribe a partir de un promotor en un mRNA de *trp* continuo (en rojo). La traducción de este mRNA comienza en cinco sitios de iniciación distintos, que resulta en cinco proteínas (verde). El orden de los genes en el genoma bacteriano va en paralelo

(b) Eucariontes



lo con la función secuencial de las proteínas codificadas en la vía del triptófano. (b) Los cinco genes que codifican las enzimas requeridas para la síntesis del triptófano en una levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) están en cuatro cromosomas diferentes. Cada gen es transcrito a partir de su propio promotor para dar un transcrito primario procesado en un mRNA que codifica una única proteína. Las longitudes de los distintos cromosomas se expresan en kilobases (10^3 bases).

Los mRNA precursores eucariontes son procesados para formar mRNA funcionales

En las bacterias, que no tienen núcleo, la traducción de un mRNA a proteína puede comenzar desde el extremo 5' del ácido nucleico, aun cuando el extremo 3' todavía esté siendo sintetizado por la RNA polimerasa. En otras palabras, en las bacterias, la transcripción y la traducción ocurren simultáneamente. Sin embargo, en los eucariontes no solo el sitio de la síntesis de RNA —el núcleo— está separado del sitio de la traducción —el citoplasma—, sino que los transcritos primarios de los genes que codifican proteínas son mRNA precursores (**pre-mRNA**) que deben sufrir varias modificaciones, conocidas en conjunto como **procesamiento del RNA**, para dar como resultado RNA funcionales (véase la Fig. 4-1, paso 2). Luego, estos mRNA deben exportarse al citoplasma antes de que puedan traducirse a proteínas. Así, en las células eucariontes, la transcripción y la traducción no pueden ocurrir simultáneamente.

Todos los pre-mRNA eucariontes inicialmente se modifican en los dos extremos, y estas modificaciones se mantienen en los mRNA. A medida que el extremo 5' de una cadena nascente de RNA surge de la superficie de la RNA polimerasa, es modificado de inmediato por varias enzimas que, en conjunto, sintetizan el **casquete 5'**; un 7-metil-

guanilato que está conectado al nucleótido terminal del RNA por un enlace inusual 5',5' trifosfato (Fig. 4-14). El casquete protege al mRNA de la degradación enzimática y lo ayuda a ser exportado al citoplasma. El casquete también está unido por un factor proteico necesario para comenzar la traducción en el citoplasma.

El procesamiento en el extremo 3' de un pre-mRNA implica la escisión por una endonucleasa para producir un grupo hidroxilo 3' libre, al cual se añade una secuencia de residuos de ácido adenílico, uno a la vez por una enzima llamada **poli(A) polimerasa**. La **cola de poli(A)** resultante contiene 100-250 bases, que es más corta en las levaduras y los invertebrados que en los vertebrados. La poli(A) polimerasa es parte de un complejo de proteínas que pueden localizar y escindir un transcrito en un sitio específico, y luego añadir el número correcto de residuos de A en un proceso que no requiere un molde.

Otro paso en el procesamiento de muchas moléculas de mRNA en eucariontes es el **corte y empalme (procesamiento) del RNA**: el corte interno de un transcrito para eliminar los intrones y unir los exones codificantes. La Figura 4-15 resume los pasos básicos en el procesamiento del mRNA eucarionte, empleando al gen de globina β como ejemplo. En el Capítulo 8 examinamos la maquinaria celular necesaria para llevar a cabo el procesamiento del mRNA, así como la del tRNA y el rRNA.

FIGURA 4-14 Estructura del casquete 5' metilado. Las características químicas que distinguen al casquete 5' metilado del mRNA eucariote son (1) el enlace 5' → 5' de 7-metilguanilato al nucleótido inicial de la molécula de mRNA y (2) el grupo metilo del 2' hidroxilo de la ribosa del primer nucleótido (base 1). Estas características ocurren en todas las células animales y en las células de las plantas superiores; las levaduras carecen del grupo metilo en el nucleótido 1. La ribosa del segundo nucleótido (base 2) también está metilada en los vertebrados. (Wörise A. J. Shatkin, 1976, *Cell* 9:645)

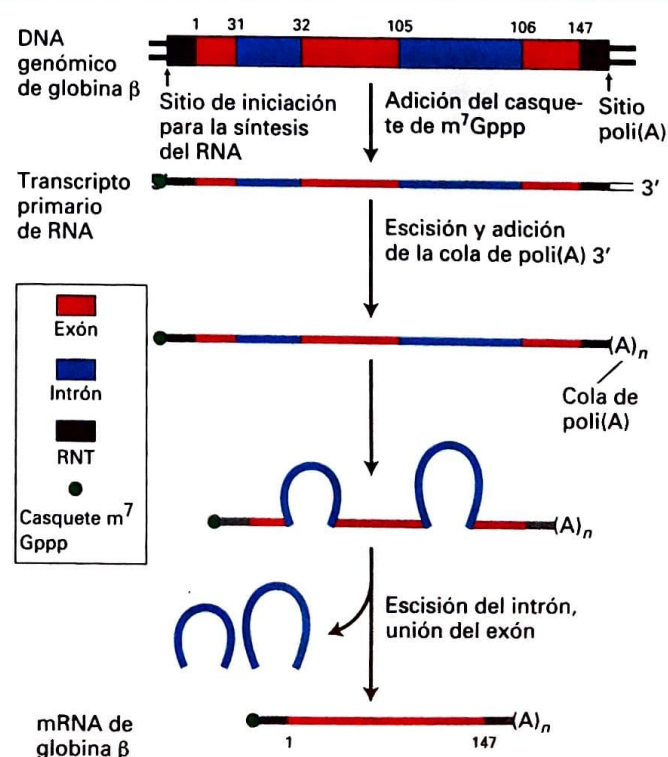
Los mRNA eucariontes funcionales, producidos por el procesamiento del RNA, retienen regiones no codificantes conocidas como *regiones no traducidas (RNT)* en cada extremo. En los mRNA de mamífero, las RNT 5' pueden ser de 100 o más nucleótidos y las RNT 3' pueden tener varias kilobases de longitud. Los mRNA bacterianos también tienen habitualmente RNT 5' y 3' pero éstas son mucho más cortas que las de los mRNA eucariontes, y generalmente contienen menos de 10 nucleótidos.

El corte y empalme alternativo de RNA aumenta el número de proteínas expresadas por un único gen eucarionte

A diferencia de lo que ocurre con los genes de las bacterias y de las arqueobacterias, la gran mayoría de los genes en los eucariontes superiores multicelulares contienen múltiples intrones. Como se indicó en el **Capítulo 3**, muchas proteínas de eucariontes superiores tienen una estructura terciaria multidominio (véase la **Fig. 3-11**). Los dominios proteicos repetidos individuales, con frecuencia están codificados por un exón o un pequeño número de exones que codifican para secuencias de aminoácidos idénticas, o casi idénticas. Se piensa que estos exo-

 ANIMACIÓN GENERAL: Ciclo de vida de un mRNA

FIGURA 4-15 Generalidades del procesamiento del RNA. El procesamiento del RNA produce mRNA funcional en los eucariontes. El gen de globina β contiene tres exones que codifican proteínas (que constituyen la región codificante, en rojo) y dos intrones interpuestos no codificantes (azul). Los intrones interrumpen la secuencia que codifica para proteínas entre los codones para los aminoácidos 31 y 32 y 105 y 106. La transcripción de los genes codificantes para proteínas eucariontes se inicia antes de la secuencia que codifica el primer aminoácido y se extiende más allá de la secuencia que codifica para el último aminoácido, dando como resultado regiones no codificantes (en gris) en los extremos del transcripto primario. Estas regiones no traducidas (RNT) se retienen durante el procesamiento. El casquete 5' (m^7 Gppp) se añade durante la formación del transcripto primario de RNA que se extiende más allá del sitio poli(A). Después de la escisión en el sitio de poli(A) y la adición de múltiples residuos de A en el extremo 3'; el corte y empalme elimina los intrones y une los exones. Los números pequeños hacen alusión a las posiciones en la secuencia de los 147 aminoácidos de la globina β .



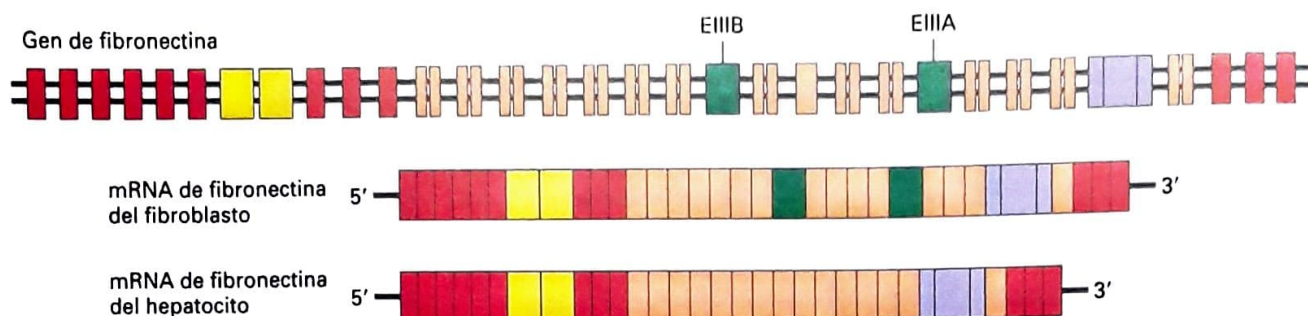


FIGURA 4-16 Corte y empalme alternativo. El gen de fibronectina de ≈ 75 kb (arriba) contiene múltiples exones; el corte y empalme de la fibronectina varía según el tipo celular. Los exones EIIIB y EIIIA (en verde) codifican dominios de unión para proteínas específicas sobre la superficie de los fibroblastos. El mRNA

de fibronectina producido en los fibroblastos incluye los exones EIIIA y EIIIB en los que estos exones son eliminados del mRNA de fibronectina en los hepatocitos. En este diagrama, los intrones (líneas negras) no están dibujados a escala; la mayor parte de ellos son mucho más largos que cualquiera de los exones.

nes repetidos han evolucionado por la duplicación accidental múltiple de segmento de DNA, que se encontraba entre dos sitios en intrones adyacentes, lo cual dio como resultado la inserción de una secuencia de exones repetidos, separados por intrones, entre los dos intrones originales. La presencia de múltiples intrones en muchos genes eucariotes, permite la expresión de múltiples proteínas relacionadas a partir de un único gen por medio del **corte y empalme alternativo** (*splicing*). En los eucariotes superiores, el corte y empalme alternativo es un mecanismo importante para la producción de diferentes formas de una proteína, llamadas **isoformas**, por diferentes tipos de células.

La fibronectina, una proteína multidominio presente en los mamíferos, provee un buen ejemplo de corte y empalme alternativo (Fig. 4-16). La fibronectina es una proteína larga, adhesiva, secretada al espacio extracelular, que puede unir otras proteínas. Qué une y dónde se une depende de cuáles dominios se cortan y empalman entre sí. El gen de fibronectina contiene numerosos exones agrupados en diferentes regiones, que corresponden a dominios específicos de la proteína. Los fibroblastos producen mRNA de fibronectina que contienen los exones EIIIA y EIIIB; estos exones codifican secuencias de aminoácidos que se unen estrechamente a las proteínas de la membrana plasmática del fibroblasto. En consecuencia, esta isoforma de la fibronectina adhiere los fibroblastos a la matriz extracelular. El corte y empalme alternativo del transcripto primario de la fibronectina de los hepatocitos, el principal tipo celular del hígado, produce mRNA que carece de los exones EIIIA y EIIIB. El resultado es que la fibronectina secretada por los hepatocitos a la sangre no adhiere fuertemente a los fibroblastos o a la mayoría de los otros tipos celulares, permitiéndoles circular. Durante la formación de los coágulos sanguíneos, sin embargo, los dominios de la fibronectina de los hepatocitos que unen fibrina se une a la fibrina, uno de los principales constituyentes de los coágulos. Entonces, la fibronectina unida interactúa con las integrinas de la membrana de las plaquetas que pasan, expandiendo el coágulo por la adición de plaquetas.

Se han identificado más de 20 isoformas distintas de fibronectina, cada una de ellas codificada por un mRNA distinto, cortado y empalmado en forma alternativa, compuesto por una combinación única de exones de genes de fibronectina. La secuenciación de gran número de mRNA aislados de varios tejidos y la comparación de sus secuencias con el DNA genómico, ha revelado que casi el 90% de todos los genes humanos se expresan como mRNA cortado y empalmado en forma alternativa.

Claramente, el corte y empalme alternativo del RNA expande en gran medida el número de proteínas codificadas por los genomas de organismos superiores multicelulares.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 4.2

Transcripción de los genes que codifican proteínas y formación del mRNA funcional

- La transcripción del DNA es llevada a cabo por la RNA polimerasa, que añade un ribonucleótido cada vez al extremo 3' terminal de una hebra creciente de RNA (véase la Fig. 4-11). La secuencia de la cadena molde de DNA determina el orden en el cual se polimerizan los ribonucleótidos para formar una cadena de RNA.
- Durante la iniciación de la transcripción, la RNA polimerasa se une a un sitio específico en el DNA (el promotor), localmente separa el DNA de hebra doble para dejar la hebra molde no apareada y polimeriza los primeros dos nucleótidos complementarios a la hebra molde. La región separada de 12-14 pares de bases se conoce como burbuja de transcripción.
- Durante la elongación de la hebra, la RNA polimerasa se mueve hacia abajo del DNA separando el DNA que se encuentra por delante de la polimerasa, de modo tal que la hebra molde puede entrar al sitio activo de la enzima, y permitiendo que las hebras complementarias de la región se transcriban para volver a anillarse detrás de él. La burbuja de transcripción se mueve con la polimerasa a medida que la enzima añade ribonucleótidos complementarios a la hebra molde al extremo 3' terminal de la cadena creciente de RNA.
- Cuando la RNA polimerasa alcanza una secuencia de terminación en el DNA, la enzima detiene la transcripción conduciendo a la liberación del RNA completo y a la disociación de la enzima desde el DNA molde.
- En el DNA procarionte, varios genes que codifican proteínas normalmente están agrupados en una región funcional, un operón, que se transcribe a partir de un promotor único en un mRNA que codifica múltiples proteínas con funciones relacionadas (véase la Fig. 4-13a). La traducción de un mRNA bacteriano puede iniciarse antes de que la síntesis del mRNA se haya completado.

- En el DNA eucarionte, cada gen que codifica proteínas se transcribe a partir de su propio promotor. Con frecuencia, el transcrito primario inicial contiene regiones no codificantes (intrones) interpuestas entre regiones codificantes (exones).
- Los transcritos primarios eucariontes deben sufrir procesamiento del RNA para obtener RNA funcionales. Durante el procesamiento, los extremos de casi todos los transcritos primarios de los genes que codifican proteínas se modifican por la adición de un casquete 5' y una cola de poli(A). Los transcritos de los genes que contienen intrones sufren corte y empalme, la eliminación de los intrones y la unión de los exones (véase la Fig. 4-15).
- Los dominios individuales de las proteínas multidominio que se encuentran en los eucariontes superiores, con frecuencia son codificados por exones individuales o por un pequeño número de exones. Con frecuencia, distintas isoformas de estas proteínas se expresan en tipos celulares específicos, como resultado del corte y empalme alternativo de los exones.

4.3 La decodificación de los mRNA por los tRNA

Si bien el DNA almacena la información para la síntesis proteica y el mRNA lleva las instrucciones codificadas en el DNA, la mayoría de las actividades biológicas son realizadas por las proteínas. Como vimos en el Capítulo 3, el orden lineal de los aminoácidos de cada proteína determina su estructura tridimensional y su actividad. Por esta razón, el ensamblado de los aminoácidos en el orden correcto, tal como está codificado en el DNA, resulta crítico para la producción de proteínas funcionales y así para el adecuado funcionamiento de las células y de los organismos.

La traducción es el proceso completo mediante el cual la secuencia de nucleótidos de un mRNA se usa como molde para unir los aminoácidos en una cadena polipeptídica en el orden correcto (véase la Fig. 4-1, paso 3). En las células eucariontes, la síntesis proteica ocurre en el citoplasma, lugar en que los tres tipos de moléculas de RNA se reúnen para desempeñar funciones distintas pero cooperativas (Fig. 4-17):

1. **El RNA mensajero (mRNA)** lleva la información genética transcrita a partir del DNA en forma lineal. El mRNA se lee en conjuntos de secuencias de tres nucleótidos, llamadas **codones**, cada uno de los cuales especifica un aminoácido en particular.

2. **El RNA de transferencia (tRNA)** es la clave para descifrar los codones del mRNA. Cada tipo de aminoácido tiene su propio subconjunto de tRNAs que unen el aminoácido y lo llevan al extremo creciente de una cadena polipeptídica donde el siguiente codón del mRNA lo requiere. El tRNA adecuado, con su aminoácido unido, es seleccionado en cada paso, porque cada molécula de tRNA específica contiene una secuencia de tres nucleótidos, un **anticodón**, que se aparea con las bases de su codón complementario presente en el mRNA.

3. **El RNA ribosómico (rRNA)** se asocia con un conjunto de proteínas para formar los **ribosomas**. Estas estructuras complejas que se mueven físicamente a lo largo de una molécula de mRNA, catalizan el ensamblaje de los aminoácidos en las cadenas polipeptídicas. También unen tRNA y varias proteínas accesorias, necesarias para la síntesis

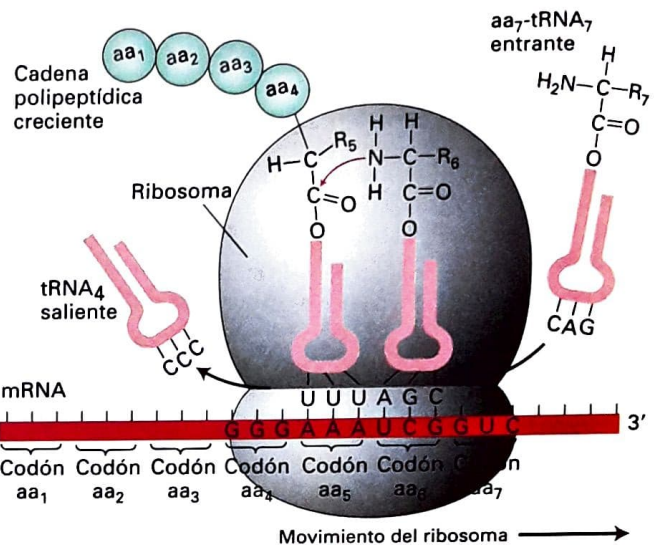


FIGURA 4-17 Los tres papeles del RNA en la síntesis proteica. El RNA mensajero (mRNA) se traduce a proteínas por la acción conjunta del RNA de transferencia (tRNA) y el ribosoma, que está compuesto por numerosas proteínas, y tres (en las bacterias) o cuatro (en los eucariontes) moléculas de RNA ribosómico (rRNA) (no se muestran). Nótese el apareamiento de bases entre los anticodones del tRNA y los codones complementarios en el mRNA. La formación de un enlace peptídico entre el grupo amino N en el aa-tRNA entrante y el C carboxi-terminal en la cadena de proteína creciente (en verde) está catalizado por uno de los rRNA. aa = aminoácido; R = grupo lateral. (Adaptado de A. J. Griffiths y cols., 1999, *Modern Genetic Analysis*, W. H. Freeman and Company.)

proteica. Los ribosomas están compuestos por una subunidad grande y una pequeña, cada una de las cuales contiene su propia molécula o moléculas de rRNA.

Estos tres tipos de RNA participan en la síntesis de proteínas en todos los organismos. En esta sección, nos centraremos en la decodificación del mRNA por los tRNA adaptadores y de qué manera la estructura de cada uno de estos RNA se relaciona con su tarea específica. De qué manera operan en conjunto con el rRNA, los ribosomas y otros factores proteicos para sintetizar proteínas está detallado en la sección siguiente. Dado que la traducción es esencial para la síntesis proteica, los dos procesos comúnmente se refieren como intercambiables. Sin embargo, las cadenas polipeptídicas resultantes de la traducción atraviesan un plegamiento postraduccional y con frecuencia otros cambios (p. ej., modificaciones químicas, asociación con otras cadenas) necesarios para la producción de proteínas maduras funcionales (Cap. 3).

El RNA mensajero lleva información desde el DNA en un código genético de tres letras

Como se mencionó previamente, el **código genético** empleado por las células es un código de **tripletes**, en el que cada secuencia de tres nucleótidos, o codón, es "leída" a partir de un punto de iniciación especificado en el mRNA. De los 64 codones posibles en el código genético, 61 especifican aminoácidos individuales y tres son codones de terminación. El Cuadro 4-1 muestra que la mayoría de los aminoácidos está codificada

Cuadro 4-1 El código genético (codones a aminoácidos)*

		Segunda posición				
		U	C	A	G	
Primera posición (5' terminal)	U	Phe	Ser	Tyr	Cys	Tercera posición (3' terminal)
		Phe	Ser	Tyr	Cys	
		Leu	Ser	Tyr	Terminación	
		Leu	Ser	Terminación	Trp	
	C	Leu	Pro	Terminación	Arg	
		Leu	Pro	His	Arg	
		Leu	Pro	His	Arg	
		Leu (Met)*	Pro	Gln	Arg	
	A	Ile	Thr	Gln	Ser	
		Ile	Thr	Asn	Ser	
		Ile	Thr	Asn	Arg	
		Met (Iniciación)	Thr	Lys	Arg	
G	Val	Ala	Lys	Gly		
	Val	Ala	Asp	Gly		
	Val	Ala	Asp	Gly		
	Val (Met)*	Ala	Glu	Gly		

* AUG es el codón iniciador más común; GUG habitualmente codifica para valina y CUG para leucina, pero en raras ocasiones estos codones pueden codificar para metionina para iniciar una cadena de proteínas.

por más de un codón. Solo dos —la metionina y el triptófano— tienen un único codón; en el otro extremo, la leucina, la serina y la arginina son especificados cada uno por seis codones diferentes. Los diferentes codones para un aminoácido dado se denominan sinónimos. El código en sí se llama *degenerado*, lo que significa que un aminoácido en particular puede ser especificado por múltiples codones.

La síntesis de todas las cadenas polipeptídicas de una célula eucarionte o procarionte comienza con el aminoácido metionina. En las bacterias se emplea una forma especializada de la metionina con un grupo formilo unido a su grupo amino. En la mayoría de los mRNA, el *codón de iniciación* (*iniciador*) que especifica esta metionina amino terminal es el AUG. En unos pocos mRNA bacterianos, el codón iniciador es GUG y ocasionalmente se usa como codón iniciador para metionina en los eucariontes CUG. Los tres codones UAA, UGA y UAG no especifican aminoácidos sino que constituyen *codones de detención* (*terminación*) que marcan el extremo carboxilo de las cadenas polipeptídicas de la mayoría de las células. La secuencia de codones que va entre un codón de iniciación específico hasta un codón de terminación se llama un **marco de lectura**. Esta disposición lineal precisa de ribonucleótidos en grupos de tres, en el mRNA, es-

pecifica la secuencia lineal precisa de aminoácidos en una cadena polipeptídica, y también señala dónde se inicia y termina la síntesis de la cadena.

Dado que el código genético es un código de tripletes que no se superponen, sin divisiones entre ellos, un mRNA particular, en teoría, debería traducirse en tres marcos de lectura distintos. De hecho, algunos mRNA mostraron contener información que se superpone y puede traducirse en diferentes marcos de lectura, dando como resultado diferentes polipéptidos (Fig. 4-18). La gran mayoría de mRNA, sin embargo, puede leerse en solo un marco, porque los codones de detención que se encuentran en los otros dos posibles marcos de lectura terminan la traducción antes de que se produzca una proteína funcional. En muy raras ocasiones ocurre otra configuración codificante inusual por un *corrimiento del marco de lectura*. En este caso, la maquinaria de síntesis proteica puede leer cuatro nucleótidos como un aminoácido y luego continuar leyendo tripletes, o puede retroceder la base y leer todos los tripletes que se continúan en el nuevo marco, hasta la terminación de la cadena. Se conoce solo una docena de casos de este tipo.

El significado de cada codón es el mismo en la mayoría de los organismos conocidos —un fuerte argumento en favor de que la vida

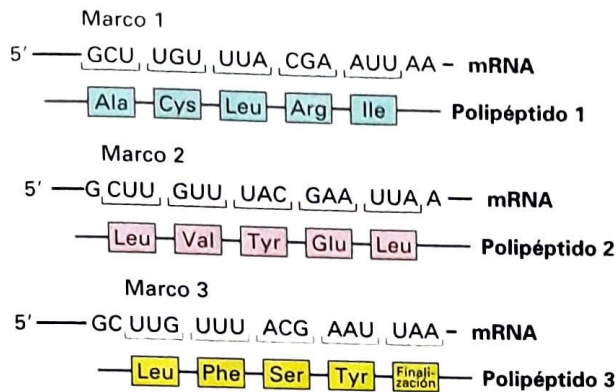


FIGURA 4-18 Múltiples marcos de lectura en una secuencia de mRNA. Si la traducción de la secuencia de mRNA mostrada comienza en tres sitios corriente arriba diferentes (que no se muestran), entonces son posibles tres marcos de lectura superpuestos. En este ejemplo, los codones están corridos una base a la derecha en el marco del medio y dos bases a la derecha en el tercer marco que finaliza en un codón de detención. Como resultado, la misma secuencia de nucleótidos especifica diferentes aminoácidos durante la traducción. Si bien las regiones de secuencia que se traducen en dos de los tres marcos de lectura posibles son raras, hay ejemplos tanto en procariontes como en eucariontes y, en especial, en sus virus, en los que la misma secuencia se emplea en dos mRNA alternativos expresados a partir de la misma región del DNA y la secuencia se lee en un marco de lectura en un mRNA y en un marco de lectura alternativo en otro. Hay incluso pocos casos en los que la misma secuencia corta se lee en los tres marcos de lectura posibles.

sobre la tierra evolucionó solo una vez—. De hecho, el código genético que se muestra en el Cuadro 4-1 se conoce como código *universal*. Sin embargo, el código genético difiere en unos pocos codones en muchas mitocondrias, en los protozoarios ciliados y en *Acetabularia*, una planta unicelular. Como se muestra en el Cuadro 4-2, la mayoría de estos cambios implican la lectura de codones normales de terminación como si fuesen aminoácidos, no un intercambio de un aminoácido por otro. Estas excepciones al código universal, probablemente fueron desarrollos evolutivos tardíos; es decir, en ningún momento el código quedó fijo de manera inmutable, aunque no se toleraron cambios masivos una vez que se comenzó a funcionar un código general en los inicios de la evolución.

La estructura plegada de los tRNA promueve sus funciones de decodificación

La traducción o decodificación del lenguaje de cuatro nucleótidos del DNA y el mRNA al lenguaje de 20 aminoácidos de las proteínas requiere tRNA y enzimas llamadas *aminoacil-tRNA sintetetas*. Para participar en la síntesis de proteínas, la molécula de tRNA debe ligarse químicamente a un aminoácido particular mediante un enlace de alta energía formando un **aminoacil-tRNA** (Fig. 4-19). El anticodón del tRNA se aparea luego con las bases de un codón del mRNA, de modo tal que el aminoácido activado pueda añadirse a la cadena polipeptídica creciente (véase la Fig. 4-17).

Se han identificado alrededor de 30-40 tRNA diferentes en las bacterias, y hasta 50-100 en las células animales y vegetales. Así, el número de tRNA de la mayoría de las células es mayor que el número de aminoácidos empleados en la síntesis de proteínas, y también difiere del número de codones de aminoácidos del código genético (61). En consecuencia, muchos aminoácidos tienen más de un tRNA al que pueden unirse (lo cual explica que pueda haber más tRNA que aminoácidos); además, muchos tRNA pueden aparearse con más de un codón (lo cual explica por qué puede haber más codones que tRNA).

La función de las moléculas de tRNA que tienen 70-80 nucleótidos de largo depende de sus estructuras tridimensionales precisas. En solución, todas las moléculas de tRNA se pliegan en una estructura similar de tallo y bucle, lo cual se asemeja a una hoja de trébol cuando se lo transporta a dos dimensiones (Fig. 4-20a). Los cuatro tallos son doble hélices cortas estabilizadas por apareamiento de bases de Watson-Crick; tres de los cuatro tallos tienen bucles que contienen siete u ocho bases en sus extremos, mientras que el resto del tallo que no forma bucles, contiene los extremos 3' y 5' de la cadena. Los tres nucleótidos que constituyen el anticodón se encuentran localizados en el medio del bucle central, en una posición accesible que facilita el apareamiento de bases codón-anticodón. En todos los tRNA, el extremo 3' del *tallo aceptor* del aminoácido que no participa en el bucle tiene la secuencia CCA que, en la mayoría de los casos, se añade después de que la síntesis y el procesamiento del tRNA están completos. Algunas bases, en la mayoría de los tRNA, también se modifican después de la transcripción, creando nucleótidos no estándar como la inosina, dihidouridina y la pseudouridina. Como veremos brevemente, algunas de estas bases modificadas tienen papeles importantes conocidos en

Cuadro 4-2 Desviaciones conocidas del código genético universal

Codón	Código universal	Código inusual *	Se encuentra en
UAG	Terminación	Trp	<i>Mycoplasma</i> , <i>Spiroplasma</i> , mitocondrias de muchas especies
CUG	Leu	Thr	Las mitocondrias de las levaduras
UAA, UAG	Terminación	Gln	<i>Acetabularia</i> , <i>Tetrahymena</i> , <i>Paramecium</i> , etc.
UGA	Terminación	Cys	<i>Euplotes</i>

*Se encuentra en los genes nucleares de los organismos que aparecen en la lista y en los genes de las mitocondrias según se indican.
FUENTE: S. Osawa y cols., 1992, *Microbiol. Rev.* 56:229.

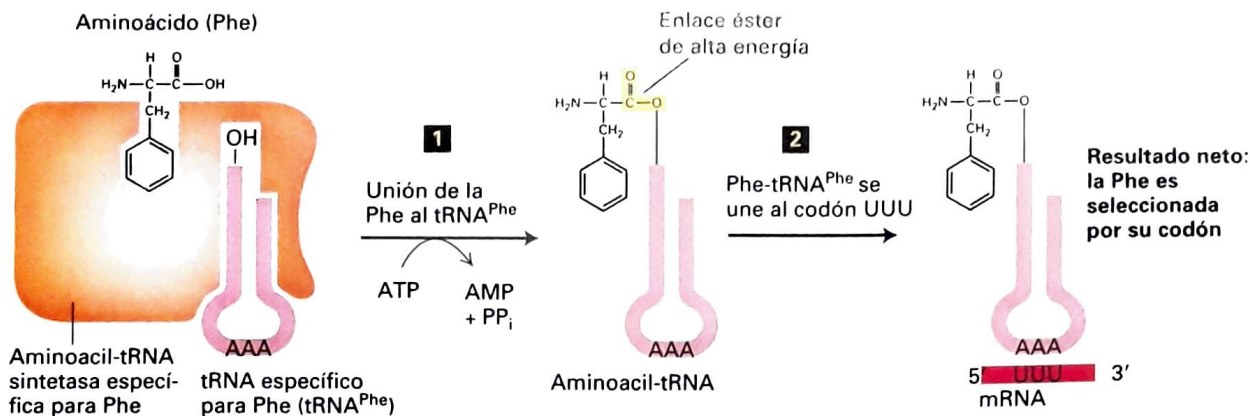
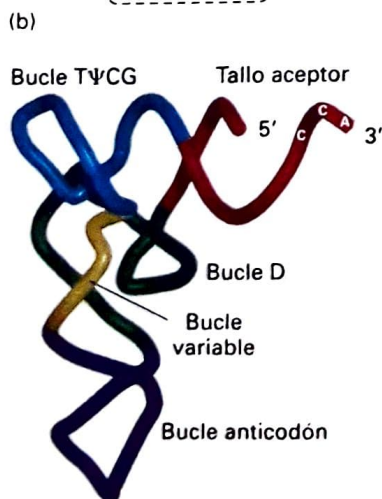
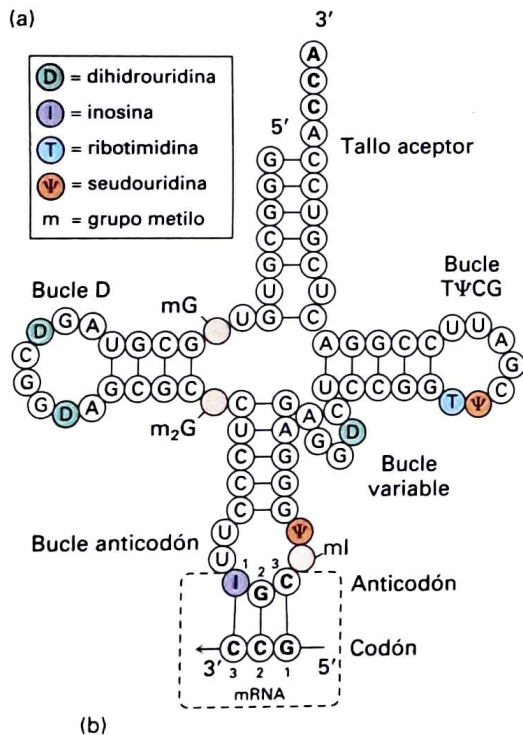


FIGURA 4-19 Decodificación de la secuencia de ácidos nucleicos a la secuencia de aminoácidos. El proceso para la traducción de las secuencias de ácidos nucleicos del mRNA a secuencias de aminoácidos de las proteínas involucra dos pasos. Paso 1: una aminoacil-tRNA sintetasa se acopla en primer término a un aminoácido específico por medio de un enlace éster de alta

energía (en amarillo) a un 2' o 3' hidroxilo de la adenosina terminal en el tRNA correspondiente. Paso 2: una secuencia de tres bases en el tRNA (el anticodón) se aparea luego por las bases con un codón presente en el mRNA que especifica el aminoácido unido. Si ocurre un error en cualquier paso, el aminoácido incorrecto puede incorporarse a una cadena polipeptídica. Phe = fenilalanina.



la síntesis proteica. Vista en tres dimensiones, la molécula plegada de tRNA tiene forma de L, en la que el bucle con el anticodón y el tallo aceptor forman los extremos de los dos brazos (Fig. 4-20b).

Entre los codones y los anticodones con frecuencia ocurre el apareamiento de bases no estándar

Si fuera imperativo el apareamiento perfecto de bases Watson-Crick entre los codones y los anticodones, las células deberían contener al menos 61 tipos diferentes de tRNA, uno para cada codón que especifica un aminoácido. Sin embargo, como se indicó previamente, muchas células contienen menos de 61 tRNA. La explicación para el menor número, radica en la capacidad de un único anticodón de tRNA de reconocer más de un codón, pero no necesariamente cada codón que corresponda a un aminoácido dado. Este reconocimiento más amplio puede ocurrir por el apareamiento no estándar entre las bases de la así llamada posición de *balanceo*: es decir, la tercera base (3') en un codón de mRNA y la primera base correspondiente (5') en su anticodón de tRNA.

La primera y segunda bases de un codón casi siempre forman pares de bases estándar de Watson-Crick y las tercera y segunda bases, respectivamente, del anticodón correspondiente, pero pueden ocurrir interacciones no estándar en la cuarta posición, entre las bases en la

FIGURA 4-20 Estructura de los tRNA. (a) Si bien la secuencia de nucleótidos exacta varía entre los tRNA, todos se pliegan en tallos de cuatro pares de bases y tres bucles. La secuencia CCA en el extremo 3' también está presente en todos los tRNA. La unión de un aminoácido al A 3' da un aminoacil-tRNA. Algunos de los residuos A, C, G y U se modifican postranscripcionalmente en la mayoría de los tRNA (véase la clave). La dihidrouridina (D) casi siempre está presente en el bucle D; de modo similar, la ribotimidina (T) y la pseudouridina (Ψ) casi siempre están presentes en el bucle TΨCG. El tRNA de la alanina de las levaduras, que se representa aquí, contiene también otras bases modificadas. El triplete que se encuentra en el extremo del bucle del anticodón se aparea por sus bases con el codón correspondiente en el mRNA. (b) Modelo tridimensional de la estructura general de todos los tRNA. Nótese la forma de L de la molécula. (Parte [a], véase R. W. Holly y cols., 1965, *Science*, **147**, 1462. Parte [b] adaptada de J. A. Arnez y D. Moras, 1997, *Trends Biochem. Sci.* **22**, 211.)

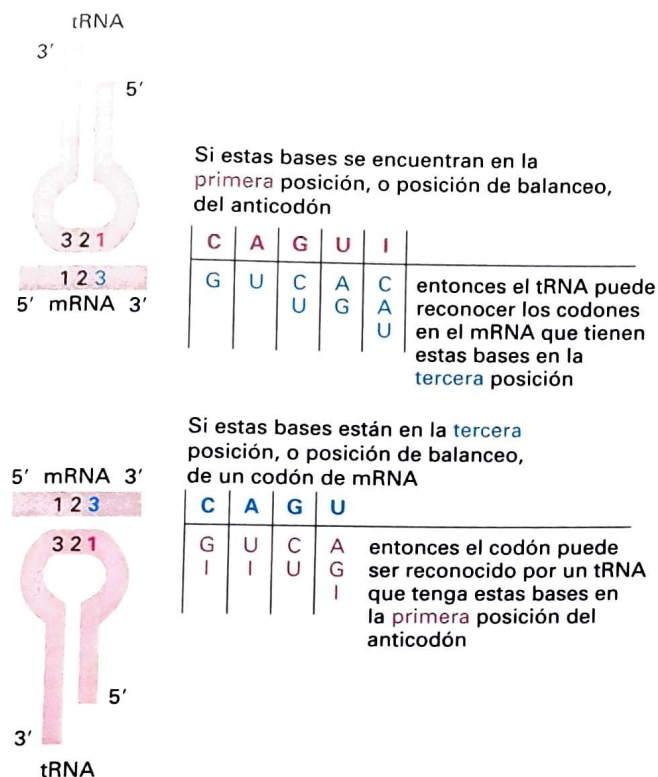


FIGURA 4-21 Apareamiento de bases no estándar en la posición de balanceo. La base en la tercera posición (de balanceo) de un codón de mRNA con frecuencia forma un par de bases no estándar con la base en la primera posición (o posición de balanceo) del anticodón del tRNA. El apareamiento de balanceo permite que el tRNA reconozca más de un codón de mRNA (arriba); reciprocamente, permite que el codón sea reconocido por más de un tipo de tRNA (abajo), aunque cada tRNA llevará el mismo aminoácido. Nótese que un tRNA con I (inosina) en la posición de balanceo puede "leer" (aparearse con) tres codones distintos, y un tRNA con G o U en la posición de balanceo puede leer dos codones. Aunque A es en teoría posible en la posición de balanceo del anticodón, casi nunca se la encuentra en la naturaleza.

posición de balanceo. Es de particular importancia el par de bases G-U, que estructuralmente se adecua casi tan bien como el par estándar G-C. Así, un anticodón dado en el tRNA con G en la primera posición (balanceo) puede formar un par de bases con los dos codones correspondientes que tengan una pirimidina (C o U) en la tercera posición (Fig. 4-21). Por ejemplo, los codones de fenilalanina UUU y UUC (5' → 3') son reconocidos ambos por el tRNA que tiene como anticodón GAA (5' → 3'). De hecho, cualquiera dos anticodones del tipo NNPir (N = cualquier base; Pir = pirimidina) codifica un aminoácido único y es decodificado por un tRNA único, con una G en la primera posición (balanceo) del anticodón.

Si bien en raras ocasiones se encuentra adenina en la posición de balanceo del anticodón, muchos tRNA de plantas y animales contienen inosina (I), un producto desaminado de la adenina, en esta posición. La inosina puede formar pares de bases no estándar con A, C y U. Un tRNA con la inosina en la posición de balanceo, puede así reconocer los codones correspondientes en el mRNA que tengan A, C o U en la tercera posición (de balanceo) (véase la Fig. 4-21). Por esta razón, los

tRNA que contienen inosina se emplean mucho en la traducción de los codones sinónimos que especifican un único aminoácido. Por ejemplo, cuatro de los seis codones para la leucina (CUA, CUC, CUU y UUA) son reconocidos por el mismo tRNA con el anticodón 3'-GAI-5'; la inosina en la posición de balanceo forma pares de bases no estándar con la tercera base de los cuatro codones. En el caso del codón UUA, también se forma un par no estándar G-U entre la posición 3 del anticodón y la posición 1 del codón.

Los aminoácidos se activan cuando se unen en forma covalente a los tRNA

El reconocimiento del codón o de los codones que especifican un aminoácido dado por un tRNA en particular es, de hecho, el segundo paso en la decodificación del mensaje genético. El primer paso, la unión del aminoácido apropiado a un tRNA, es catalizado por una *aminoacil-tRNA-sintetasa*. Cada una de las 20 diferentes sintetetas reconoce un aminoácido y *todos* sus tRNA compatibles o afines. Estas enzimas acopladas unen un aminoácido al hidroxilo libre 2' o 3' de la adenosina, en el 3' terminal de las moléculas de tRNA mediante una reacción que requiere ATP. En esta reacción, el aminoácido es unido al tRNA mediante un enlace de alta energía, por lo que se dice que está *activado*. La energía de este enlace, posteriormente, es la que impulsa la formación del enlace peptídico que mantiene unidos a los aminoácidos adyacentes de la cadena polipeptídica creciente. El equilibrio de la reacción de aminoacilación es impulsado adicionalmente hacia la activación del aminoácido por la hidrólisis del enlace fosfoanhidrido de alta energía del pirofosfato liberado (véase la Fig. 4-19).

Las aminoacil-tRNA sintetetas reconocen sus tRNA afines al interactuar principalmente con el bucle del anticodón y el tallo aceptor, si bien, en algunos casos, las interacciones con otras regiones de un tRNA también contribuyen al reconocimiento. Además, las bases específicas en los tRNA incorrectos, que son de estructura similar a un tRNA afin, inhibirán la carga del tRNA incorrecto. Así, el reconocimiento del tRNA correcto depende de ambas, las interacciones positivas y la ausencia de interacciones negativas. Aun así, dado que algunos aminoácidos son de estructura muy similar, las aminoacil-tRNA sintetetas en ocasiones cometen errores. Estos, sin embargo, se corrigen por acción de las propias enzimas que tienen una actividad de *verificación de lectura* que controla la corrección en su bolsillo de unión de aminoácidos. Si se ha unido un aminoácido incorrecto al tRNA, la sintetasa unida cataliza la eliminación del aminoácido desde el tRNA. Esta función crucial ayuda a garantizar que el tRNA entregue el aminoácido correcto a la maquinaria de síntesis proteica. La tasa global de errores de traducción en *E. coli* es muy baja, aproximadamente 1 por cada 50 000 codones, evidencia tanto de la fidelidad del reconocimiento del tRNA como de la importancia de la verificación de la lectura por las aminoacil-tRNA sintetetas.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 4.3

La decodificación del mRNA por los tRNA

- La información genética se transcribe del DNA al mRNA en forma de un código de tripletes superpuestos degenerado.

- Cada aminoácido está codificado por una o más secuencias de tres nucleótidos (codones) del mRNA. Cada codón especifica un aminoácido, pero la mayoría de los aminoácidos están codificados por múltiples codones (véase el Cuadro 4-1).
- El codón AUG para la metionina es el codón de iniciación más común que especifica el aminoácido en el extremo NH₂-terminal de una cadena proteica. Tres codones (UAA, UAG, UGA) funcionan como codones de terminación y no especifican aminoácidos.
- Un marco de lectura, la secuencia ininterrumpida de codones del mRNA desde un codón de iniciación específico hasta un codón de terminación, se traduce en la secuencia lineal de aminoácidos de una cadena polipeptídica.
- La decodificación de la secuencia de nucleótidos del mRNA a la secuencia de aminoácidos de las proteínas depende de los tRNA y de las aminoacil-tRNA sintetasas.
- Todos los tRNA tienen estructura tridimensional semejante, que incluye un brazo aceptor para la unión de un aminoácido específico y un tallo-bucle con una secuencia de anticodón de tres bases en sus extremos (véase la Fig. 4-20). El anticodón puede aparear sus bases con su codón correspondiente en el mRNA.
- Dadas las interacciones no estándar, un tRNA puede aparear sus bases con más de un codón del mRNA; recíprocamente, un codón particular puede aparearse por sus bases con múltiples tRNA. Sin embargo, en cada caso solo el aminoácido adecuado se insertará en la cadena polipeptídica creciente.
- Cada una de las 20 aminoacil-tRNA sintetasas reconoce un único aminoácido y lo une de manera covalente a un tRNA afin, formando un aminoacil-tRNA (véase la Fig. 4-19). Esta reacción activa el aminoácido, de modo que puede participar en la formación del enlace peptídico.

4.4 Síntesis escalonada de las proteínas en los ribosomas

Las secciones previas han presentado dos de los principales participantes en la síntesis proteica —el mRNA y el tRNA aminoacilado. Aquí, describimos por primera vez el tercer jugador clave en la síntesis de proteínas —el ribosoma que contiene rRNA— antes de hacer un detalle de cómo estos tres componentes se unen para llevar a cabo los eventos bioquímicos que conducen a la formación de las cadenas polipeptídicas en los ribosomas. De modo similar a la transcripción, el complejo proceso de la traducción puede dividirse en tres etapas —la iniciación, la elongación y la terminación—, que consideraremos de manera ordenada. Centraremos nuestra descripción sobre la traducción en las células eucariontes, aunque el mecanismo de la traducción es fundamentalmente el mismo en todas las células.

Los ribosomas son máquinas de síntesis proteica

Si los muchos componentes que participan en la traducción del mRNA debiesen interactuar libres en solución, la probabilidad de que ocurrieran colisiones simultáneas sería tan baja que la tasa de polimerización de los aminoácidos sería también muy baja. La eficiencia de la traducción aumenta, en gran medida, por la unión del mRNA y los aminoacil-tRNA

individuales dentro de un ribosoma. El ribosoma, el complejo celular con mayor abundancia de RNA y proteínas, dirige el alargamiento de un polipéptido a una tasa de entre tres y cinco aminoácidos adicionales por segundo. Por lo tanto, se sintetizan pequeñas proteínas de 100-200 aminoácidos en un minuto o menos. Por otra parte, tarda entre dos y tres horas sintetizar la proteína más grande conocida, la titina, presente en el músculo, que contiene alrededor de 30 000 residuos de aminoácidos. La máquina celular que lleva a cabo esta tarea debe ser precisa y persistente.

Con ayuda del microscopio electrónico, los ribosomas se descubrieron como pequeñas partículas individuales, ricas en RNA presentes en las células, que secretan grandes cantidades de proteínas. Sin embargo, su papel en la síntesis proteica no se identificó hasta que se obtuvieron preparados razonablemente puros de ribosomas. Los experimentos *in vitro*, con radiomarcaje de preparados de este tipo, mostraron que los aminoácidos radiactivos se incorporaban en primer lugar en las cadenas polipeptídicas crecientes asociadas con los ribosomas, antes de aparecer en las cadenas terminadas.

Si bien hay diferencias entre los ribosomas procariontes y eucariontes, las grandes similitudes estructurales y funcionales entre los ribosomas de todas las especies reflejan un origen evolutivo común de la mayoría de los constituyentes básicos de las células vivas. Un ribosoma está compuesto por tres (en las bacterias) o cuatro (en los eucariontes) moléculas distintas de rRNA y hasta 83 proteínas, organizados en una subunidad grande y una subunidad pequeña (Fig. 4-22). Las subunidades ribosómicas y las moléculas de rRNA se designan comúnmente en unidades Svedberg (S), una medida de la velocidad de sedimentación de las macromoléculas centrifugadas en condiciones estándar —esencialmente una medida de su tamaño—. La subunidad ribosómica pequeña contiene una única molécula de rRNA, conocida como *rRNA pequeña*. La subunidad grande contiene una molécula de *rRNA grande* y una molécula de rRNA 5S, más una molécula adicional de rRNA 5,8S en los vertebrados. Las longitudes de las moléculas de rRNA, la cantidad de proteínas en cada subunidad y, en consecuencia, los tamaños de las subunidades difieren entre las células bacterianas y eucariontes. El ribosoma ensamblado es de 70S en las bacterias y 80S en los vertebrados.

Actualmente se conocen las secuencias de los rRNA pequeño y grande de varios miles de organismos. Aunque las secuencias primarias de nucleótidos de estos rRNA varían considerablemente, las mismas partes de cada tipo de rRNA, en teoría, pueden formar tallos-bucles con bases apareadas, que generarían una estructura tridimensional similar para cada rRNA en todos los organismos. Las estructuras tridimensionales de los rRNA bacterianos se han determinado por cristalografía de rayos X para las subunidades aisladas 50S y 30S, y para los ribosomas completos 70S (Fig. 4-23). Las múltiples proteínas ribosómicas, mucho más pequeñas en casi todo, están asociadas con los rRNA de superficie. Si bien el número de moléculas proteicas de los ribosomas en gran medida excede el número de moléculas de RNA, éste constituye aproximadamente el 60% de la masa de un ribosoma. Los sitios en los que los tRNA se unen a los ribosomas se conocen como *sitio A*, *sitio P* y *sitio E*. Como veremos en breve, el tRNA se mueve entre estos sitios a medida que se desarrolla la síntesis proteica. Las estructuras cristalinas del ribosoma 80S de las levaduras, una subunidad 40S de un protozooario y la microscopía crioelectrónica de los ribosomas de plantas se han descrito hace poco tiempo. Generalmente, son similares a los ribosomas bacterianos, pero aproximadamente el 50% más grandes por las inserciones específicas, presentes en los eucariontes, de segmentos de RNA en regiones de los rRNA bacterianos, así como por la presencia de un número más grande de

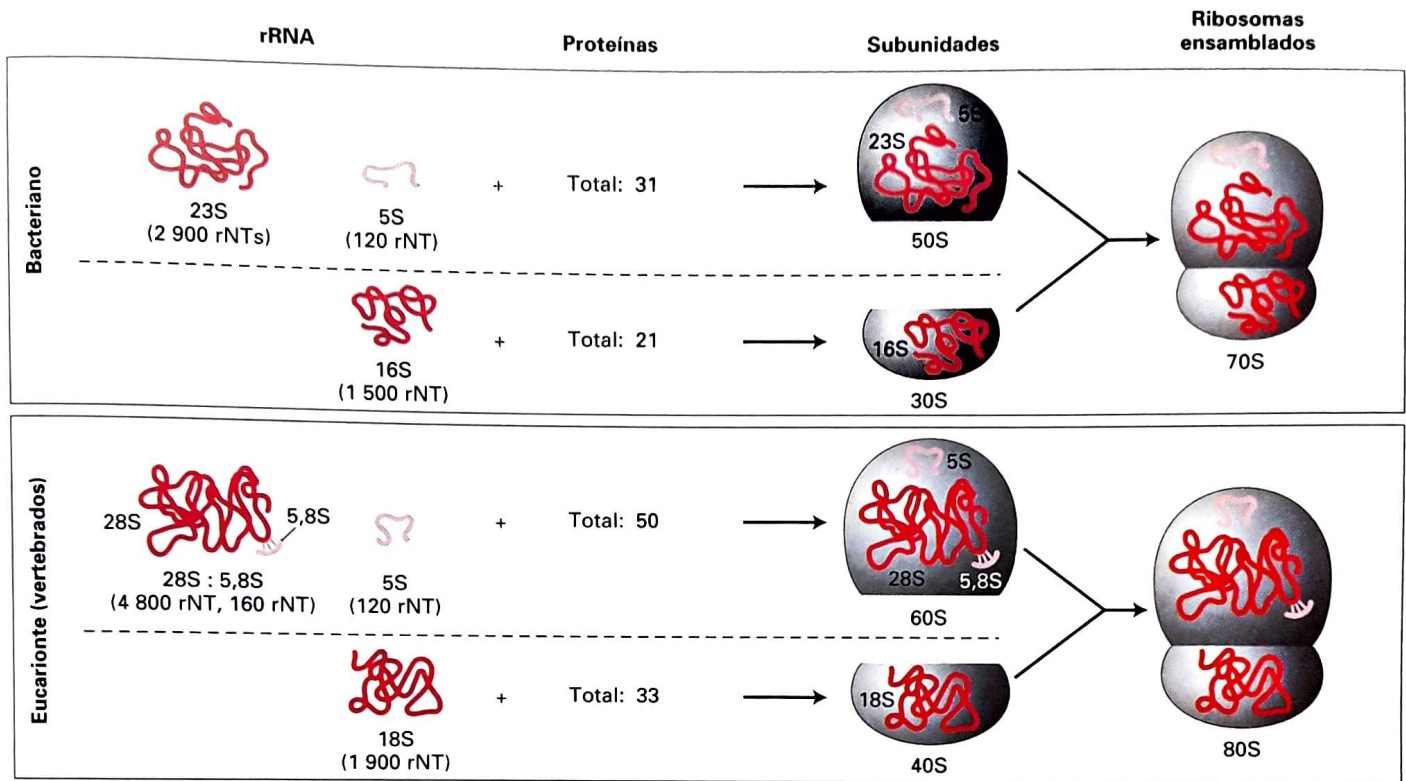


FIGURA 4-22 Componentes de los ribosomas procariontes y eucariontes. En todas las células, cada ribosoma consiste en una subunidad grande y una subunidad pequeña. Las dos subunidades contienen rRNA (en rojo) de diferentes longitudes, así como un conjunto de proteínas diferentes. Todos los ribosomas contienen dos moléculas de rRNA principales (rRNA 23S y 16S en

las bacterias; rRNA 28S y 18S en los vertebrados) y un rRNA 5S. La subunidad grande de los ribosomas de los vertebrados contiene también un rRNA 5,8S apareado por sus bases al rRNA 28S. El número de ribonucleótidos (rNT) de cada tipo de rRNA está indicado.

proteínas (véase la Fig. 4-22). Se cree que los aspectos básicos de la síntesis proteica son semejantes, si bien la iniciación de la traducción de los eucariontes, que trataremos más adelante, es más compleja y está sujeta a mecanismos de regulación adicionales.

Durante la traducción, un ribosoma se mueve a lo largo de una cadena de mRNA, interactúa con varios factores proteicos y tRNA y sufre grandes cambios de conformación. A pesar de la complejidad del ribosoma, se han hecho grandes progresos en la determinación de la estructura general de los ribosomas bacterianos y del modo en que funcionan en la síntesis proteica. Más de 50 años después del descubrimiento inicial de los ribosomas, finalmente están siendo esclarecidos su estructura general y su funcionamiento durante la síntesis proteica.

El metionil-tRNA^{Met} reconoce el codón de iniciación AUG

Como se mencionó previamente, el codón AUG para metionina funciona como el codón de iniciación para la gran mayoría de los mRNA. Un aspecto crítico de la iniciación de la traducción es comenzar la síntesis de proteínas en el codón de iniciación, estableciendo de este modo el marco de lectura apropiado para todo el mRNA. Tanto los procariontes como los eucariontes contienen dos tRNA de metionina diferentes: el tRNA^{Met}_i, que puede iniciar la síntesis proteica, y el tRNA^{Met}, que puede incorporar

metionina solo a una cadena de proteína creciente. La misma aminoacil tRNA sintetasa (MetRS) carga ambos tRNA con metionina. Pero solo la Met-tRNA^{Met}_i (es decir, la metionina activada unida al tRNA^{Met}_i) puede unirse al sitio apropiado en la subunidad ribosómica pequeña, el *sitio P*, para iniciar la síntesis de una cadena polipeptídica. El Met-tRNA^{Met}_i y otros tRNA cargados se unen solamente al *sitio A*, como se describirá más adelante. Los tRNA entran al sitio de salida o *sitio E* después de transferir su aminoácido unido covalentemente a la cadena polipeptídica creciente.

La iniciación de la traducción en los eucariontes generalmente ocurre en el primer AUG cercano al extremo 5' de un mRNA

Durante la primera etapa de la traducción, las subunidades ribosómicas pequeña y grande se ensamblan alrededor de un mRNA que tiene un tRNA iniciador activado, ubicado correctamente en el codón de iniciación en el sitio ribosómico P. En los eucariontes, este proceso está mediado por un conjunto especial de proteínas conocidas como **factores de iniciación** de la traducción **eucarionte (eIF)**. A medida que cada componente individual se une al complejo, es guiado por interacciones con eIF específico. Varios de estos factores de iniciación unen GTP y la hidrólisis de GTP a GDP funciona como un interruptor de verificación de la lectura que solamente permite que los pasos posteriores ocurran si el paso previo se desarrolló en forma correcta.

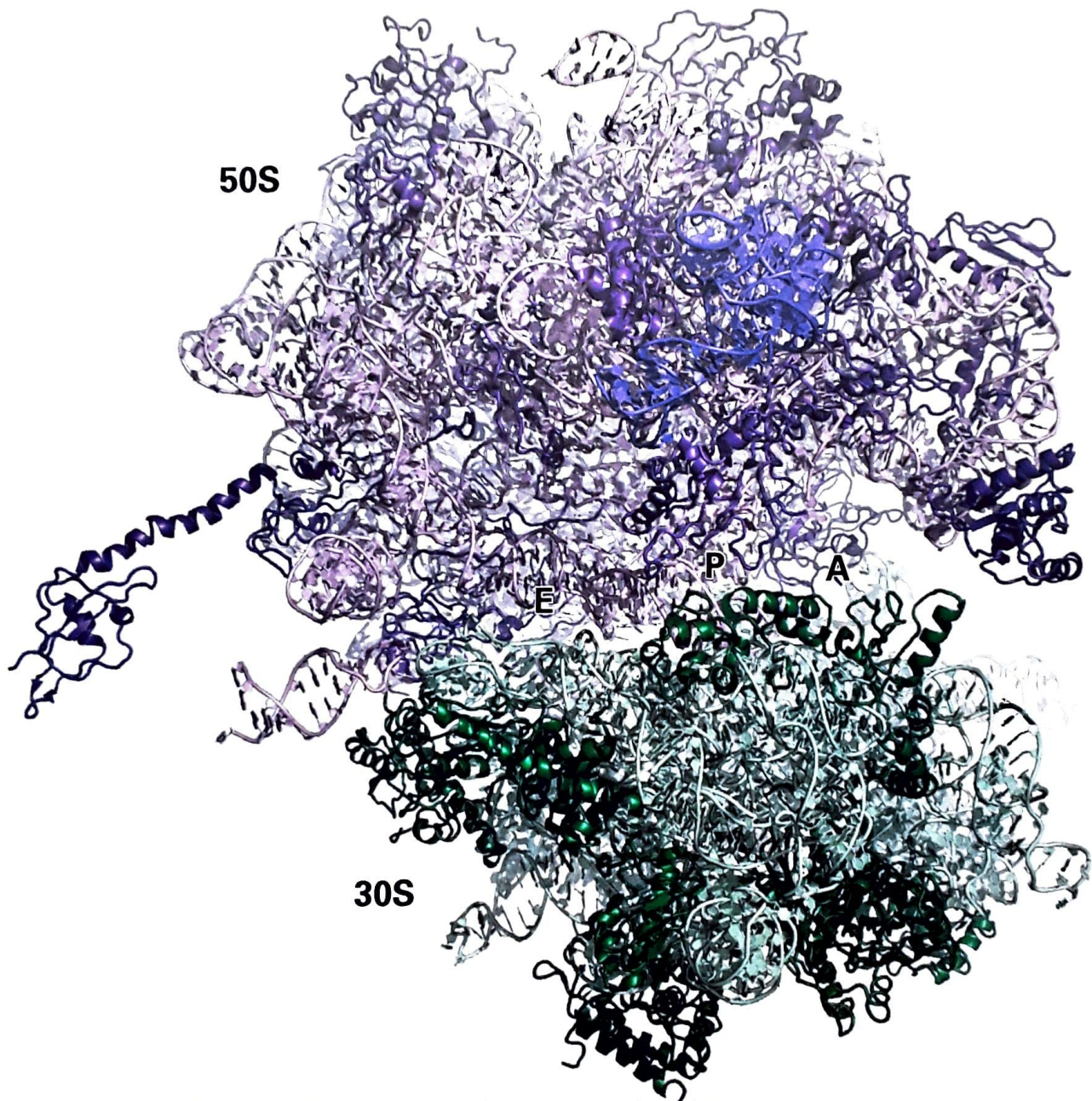
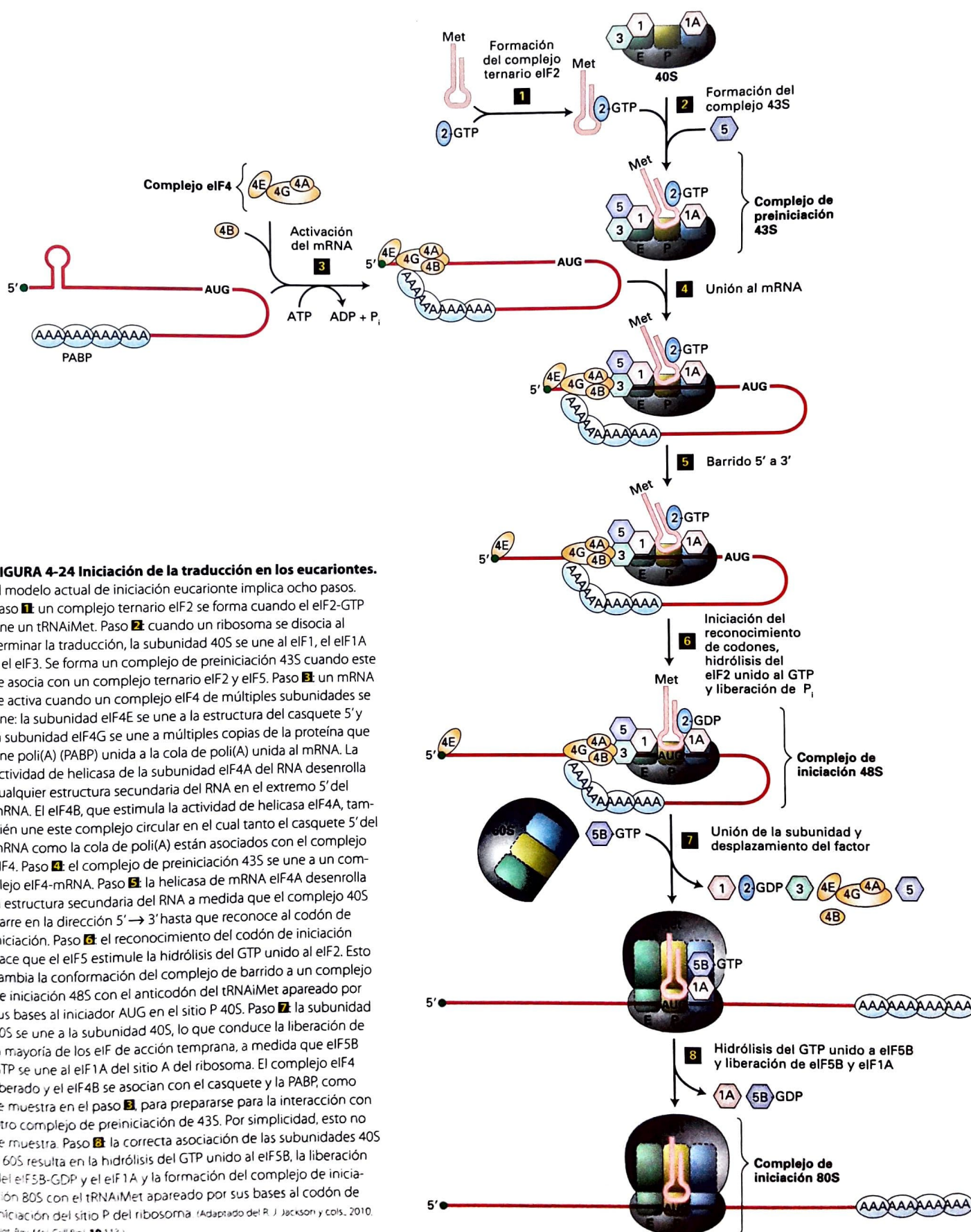


FIGURA 4-23 Estructura del ribosoma 70S de *E. coli* determinado por cristalografía de rayos X. Modelo del ribosoma visto en la interface entre las subunidades grande (50S) y pequeña (30S). El rRNA 16S y las proteínas de la subunidad pequeña están coloreados en verde claro y verde oscuro, respectivamente; el rRNA 23S y las proteínas de la subunidad grande están coloreados

en púrpura claro y oscuro, respectivamente, y el rRNA 5S está coloreado en azul oscuro. Se indican las posiciones ribosómicas de los sitios A, P y E. Note que las proteínas ribosómicas se localizan principalmente en la superficie del ribosoma y los rRNA en el interior, cubriendo los sitios A, P y E. (De B. S. Schuwirth y cols., 2005, *Science* **310**:827.)

Antes de la hidrólisis del GTP, el complejo es inestable y permite un segundo intento en la formación del complejo, hasta que se ensamble el complejo correcto, lo que da como resultado la hidrólisis del GTP y la estabilización del complejo apropiado. En los últimos años se han hecho notables avances en la comprensión de la iniciación de la traducción en los vertebrados.

El modelo actual sobre iniciación de la traducción en los vertebrados se representa en la **Figura 4-24**. Las subunidades ribosómica grande y pequeña, liberadas de un ciclo previo de traducción, se mantienen separadas por la unión de los eIF 1, 1A y 3 a la subunidad pequeña 40S (**Fig. 4-24, arriba**). El primer paso de la iniciación de la traducción es la formación del *complejo de preiniciación 43S*. Este complejo



de preiniciación se forma cuando la subunidad 40S con eIF 1, 1A y 3 se asocia con eIF5 y un complejo ternario formado por el Met-tRNA_i^{Met} y eIF2 unido a GTP (Fig. 4-24, pasos 1 y 2). El factor de iniciación eIF2 alterna entre asociarse con GTP y GDP; solo puede unirse al Met-tRNA_i^{Met} cuando se encuentra asociado con GTP. Las células pueden regular la síntesis proteica al fosforilar un residuo de serina en el eIF2 unido a GDP; el complejo fosforilado no puede intercambiar el GDP unido por GTP y, de este modo, no puede unir Met-tRNA_i^{Met} con lo que inhibe la síntesis de proteínas.

El mRNA que debe traducirse se une al complejo eIF4 de múltiples subunidades, que interactúa tanto con la estructura del casquete 5' como con la proteína que se une a poli(A) (PABP) en múltiples copias a la cola de poli(A) del mRNA. Se requieren ambas interacciones para la traducción de la mayoría de los mRNA. Esto resulta en la formación de un complejo circular (Fig. 4-24, paso 3). El complejo eIF4 que se une al casquete consiste en varias subunidades con diferentes funciones. La subunidad eIF4E se une a la estructura del casquete 5' sobre los mRNA (Fig. 4-14). La subunidad grande eIF4G interactúa con la proteína PABP unida a la cola de poli(A) del mRNA y forma de este modo un andamiaje sobre el cual se unen las otras subunidades del eIF4. El complejo mRNA-eIF4 se asocia luego con el complejo de preiniciación por medio de una interacción entre el eIF4G y el eIF3 (paso 4).

El complejo de iniciación luego se desliza o *barre* el mRNA asociado, a medida que la actividad de **helicasa** del eIF4A, estimulada por el eIF4B, usa la energía de la hidrólisis del ATP para desenrollar la estructura secundaria del RNA (paso 5). Este barrido se detiene cuando el anticodón tRNA_i^{Met} reconoce al codón de iniciación que es el primer AUG corriente abajo a partir del extremo 5' terminal, en la mayoría de los mRNA eucariontes. El reconocimiento del codón de iniciación lleva a la hidrólisis del GTP asociado con el eIF2, un paso irreversible que evita el barrido adicional, dando como resultado la formación del **complejo de iniciación 48S** (paso 6). Este direccionamiento al codón de iniciación correcto se ve facilitado por el eIF5, una proteína eIF2 activadora de la GTPasa (GAP; véase la Fig. 3-32). La selección del AUG iniciador se ve facilitada por los nucleótidos que lo rodean, específicos, llamados *secuencia de Kozak*, por Marilyn Kozak, quien la definió: (5') ACCAUGG (3'). La A que precede al AUG (en negritas) y la G inmediatamente posterior a él son los nucleótidos más importantes que afectan la eficiencia de la iniciación de la traducción.

La asociación de la subunidad grande (60S) está mediada por la unión de eIF5B al GTP, y resulta en el desplazamiento de muchos de los factores de iniciación (paso 7). La asociación correcta entre las subunidades del ribosoma resulta en la hidrólisis del eIF5B unido al GTP, que se transforma en GDP y la liberación de eIF5B-GDP y del eIF1A (paso 8), con lo que se completa la formación de un **complejo de iniciación 80S**. El acoplamiento de la subunidad ribosómica, al unir la reacción a la hidrólisis de GTP por el eIF5B, permite que el proceso de iniciación continúe solo cuando ha ocurrido correctamente la interacción de la subunidad. Esto también lo transforma en un paso irreversible, de tal modo que las subunidades ribosómicas no se disocian hasta que todo el mRNA se haya traducido y se haya terminado la síntesis proteica. La maquinaria de síntesis proteica eucarionte comienza la traducción de la mayoría de los mRNA celulares a una distancia de aproximadamente 100 nucleótidos del extremo 5' con casquete, como se acaba de describir. Sin embargo, algunos mRNA celulares contienen un sitio de entrada de ribosomas interno (IRES), localizado corriente abajo, lejos del extremo 5' terminal. Se piensa que los IRES celulares forman estructuras de RNA que interactúan con un complejo de eIF4A

y eIF4G que luego se asocia con el eIF3 unido a las subunidades 40S, con eIF1 y eIF1A. Este ensamble se une posteriormente a un complejo ternario eIF2 para ensamblarse a un complejo de iniciación directamente sobre un codón AUG vecino. Además, la traducción de algunos RNA virales de cadena positiva, que carecen de casquete 5' terminal, se inicia en secuencias IRES virales. Estas caen en clases diferentes, dependiendo de cuántos eIF estándar se requieran para la iniciación. En el caso del virus de la parálisis del grillo, el IRES de ≈ 200-nt de largo se pliega en una estructura compleja que interactúa en forma directa con el ribosoma 40S y lleva a la iniciación sin los eIF e incluso sin el iniciador Met-tRNA_i^{Met}!

En las bacterias, la unión de la subunidad ribosómica pequeña a un ciclo de iniciación ocurre mediante un mecanismo distinto que permite la iniciación en sitios internos en el mRNA policistrónico transcrito a partir de los operones. En los mRNA de las bacterias, una secuencia de ≈ 6 bases, complementaria al extremo 3' terminal de rRNA pequeño, precede al codón de iniciación AUG en 4-7 nucleótidos. El apareamiento de bases entre esta secuencia del mRNA, llamada secuencia de Shine-Dalgarno, por sus descubridores, y el rRNA pequeño, ubican a la subunidad ribosómica pequeña en la posición adecuada para la iniciación. Los factores de iniciación comparables a eIF1A, eIF2, eIF3, f-Met-tRNA_i^{Met} se asocian luego con la subunidad pequeña, seguida de la asociación de la subunidad grande para formar el ribosoma bacteriano completo.

Durante la elongación de la cadena cada aminoacil-tRNA entrante se mueve a través de tres sitios ribosómicos

El complejo ribosoma-Met-tRNA_i^{Met} adecuadamente ubicado ahora está listo para comenzar la tarea de la adición secuencial de aminoácidos para la traducción del mRNA dentro del marco. Como en el caso de la iniciación, un conjunto de proteínas especiales llamadas **factores de elongación (EF)** son necesarias para llevar a cabo el proceso de elongación de la cadena. Los pasos clave en la elongación son la entrada de cada aminoacil tRNA posterior con un tRNA complementario al siguiente codón, la formación de un enlace peptídico y el movimiento o *translocación* del ribosoma un codón por vez a lo largo del mRNA.

Cuando se completa la iniciación de la traducción, como ya se indicó, el Met-tRNA_i^{Met} se une al sitio P en el ribosoma 80S ensamblado (Fig. 4-25, arriba). Esta región del ribosoma se llama sitio P porque el tRNA químicamente unido a la cadena polipeptídica se localiza allí. El segundo aminoacil-tRNA es llevado al ribosoma en forma de un complejo ternario, asociado con EF1α-GTP y se une al sitio A, llamado de este modo porque es donde el tRNA aminoacilado se une a él (paso 1). El EF1α-GTP unido a varios aminoacil-tRNA difunde al sitio A pero el siguiente paso en la traducción ocurre solo cuando el anticodón del tRNA aparea sus bases con el segundo codón de la región codificante. Cuando eso ocurre adecuadamente, el GTP en el EF1α-GTP asociado se hidroliza. La hidrólisis de GTP promueve un cambio de conformación en el EF1α que lleva a la liberación del complejo EF1α-GDP y la estrecha unión del aminoacil-tRNA en el sitio A (paso 2). Este cambio de conformación también ubica al extremo aminoacilado 3' del tRNA en el sitio A en la cercanía del extremo 3' terminal del Met-tRNA_i^{Met} en el sitio P. La hidrólisis de GTP, y así la unión estrecha, no ocurren si el anticodón del aminoacil-tRNA entrante no puede aparear sus bases con el codón del sitio A. En este

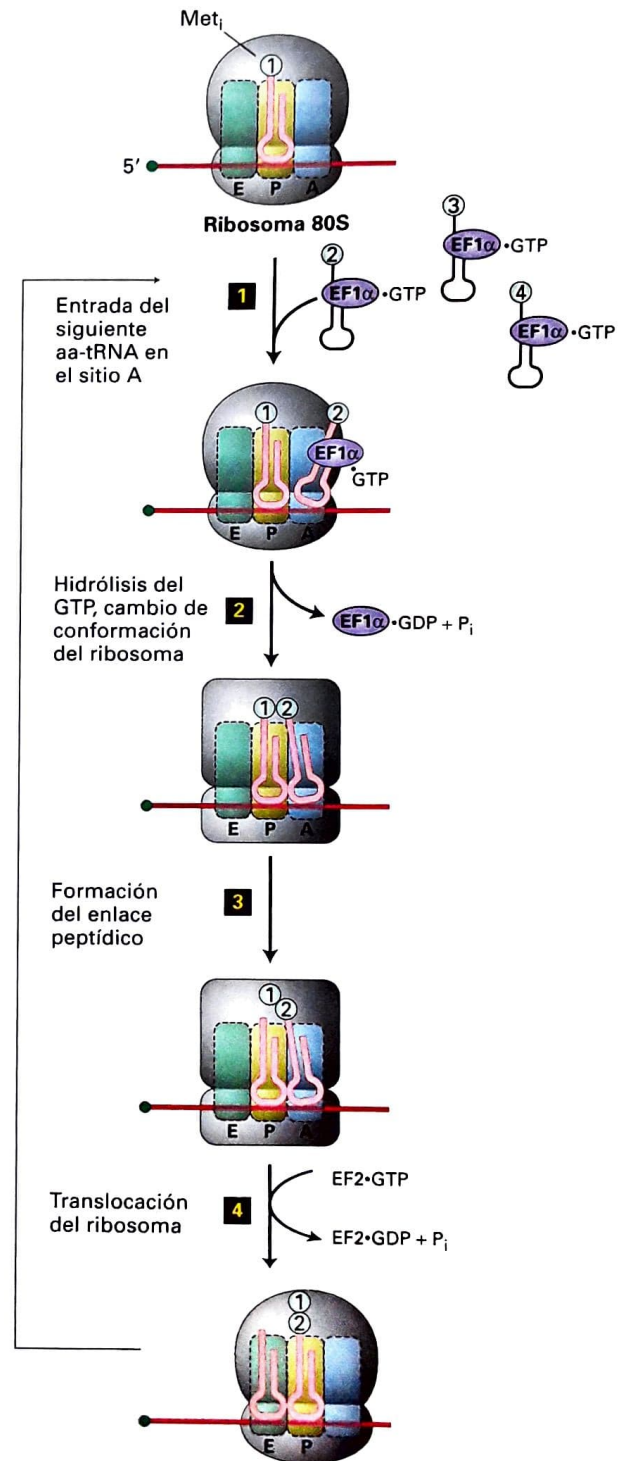
FIGURA 4-25 Elongación de la cadena peptídica en los eucariontes.

Una vez que se ensambla el ribosoma 80S con Met-tRNA^{Met} en el sitio P del ribosoma (*arriba*), un complejo ternario que lleva el segundo aminoácido (aa₂) codificado por el mRNA se une al sitio A (paso 1). Después de un cambio de conformación en el ribosoma inducido por la hidrólisis de GTP en el EF1α·GTP (paso 2), el rRNA grande cataliza la formación del enlace peptídico entre el Met y el aa₂ (paso 3). La hidrólisis del GTP en el EF2·GTP causa otro cambio de conformación en el ribosoma que resulta en su translocación un codón a lo largo del mRNA y el corrimiento del tRNA^{Met} no acilado al sitio E y el tRNA con el péptido unido al sitio P (paso 4). El ciclo puede comenzar nuevamente con la unión de un complejo ternario que lleva el aa₃ al sitio A ahora abierto. En el segundo ciclo de elongación y ciclos posteriores, el tRNA en el sitio E se expulsa durante el paso 2 como resultado del cambio de conformación inducido por la hidrólisis del GTP en el EF1α·GTP. (Adaptado de K. H. Nierhaus y cols., 2000, en R. A. Garrett y cols., eds., *The Ribosome: Structure, Function, Antibiotics, and Cellular Interactions*, ASM Press, p. 319.)

caso, el complejo ternario difunde dejando un sitio A vacío que puede asociarse con otros complejos aminoacil-tRNA-EF1α·GTP hasta que se una un tRNA con bases que se apareen correctamente. Así, la hidrólisis de GTP por EF1α es otro paso en la verificación de lectura que permite que la síntesis proteica avance solo cuando el tRNA aminoacilado correcto se una al sitio A. Este fenómeno contribuye a la fidelidad de la síntesis proteica.

Con el Met-tRNA^{Met} iniciador en el sitio P y el segundo aminoacil-tRNA fuertemente unido en el sitio A, el grupo amino-α del segundo aminoácido reacciona con la metionina "activada" (con enlace éster) del tRNA iniciador formando un enlace peptídico (Fig. 4-25, paso 3; véase la Fig. 4-17). Esta *reacción de peptidil transferasa* está catalizada por el rRNA grande que orienta con precisión a los átomos que interactúan, permitiendo que la reacción avance. El 2'-hidroxilo del A terminal del peptidil-tRNA del sitio P participa también en la catálisis. La capacidad catalítica del rRNA grande de las bacterias se demostró eliminando cuidadosamente la gran mayoría de las proteínas de las subunidades ribosómicas grandes. El rRNA 23S bacteriano casi puro puede catalizar una reacción de peptidil transferasa entre análogos de tRNA aminoacilados y el peptidil-tRNA. El apoyo adicional al papel catalítico del rRNA grande en la síntesis proteica proviene de estudios cristalográficos de alta resolución que muestran que no hay proteínas cerca del sitio de síntesis del enlace peptídico en la estructura cristalina de la subunidad grande en las bacterias.

Después de la síntesis del enlace peptídico, el ribosoma se transloca a lo largo del mRNA a una distancia equivalente a la de un codón. Este paso de translocación está controlado por la hidrólisis de GTP en el complejo EF2·GTP en los eucariontes. Ya ocurrida la translocación correctamente, el GTP unido se hidroliza, otro proceso irreversible que evita que el ribosoma se mueva a lo largo del RNA en la dirección incorrecta o que se transloque un número incorrecto de nucleótidos. Como resultado de los cambios de conformación en el ribosoma, que acompañan a la translocación adecuada y la hidrólisis resultante de GTP por el EF2, el tRNA^{Met}, ahora sin la metionina activada, se mueve al sitio E (salida, en inglés *exit*) sobre el ribosoma; al mismo tiempo, un segundo tRNA unido ahora en forma covalente a un dipéptido (un peptidil-tRNA) se mueve al sitio P (Fig. 4-25, paso 4). La translocación hace que el ribosoma retorne su conformación a un



estado en el cual el sitio A queda abierto y es capaz de aceptar otro tRNA aminoacilado que forma complejo con un EF1α·GTP, comenzando otro sitio de elongación de la cadena. La repetición del ciclo de elongación que se muestra en la Figura 4-25 añade un aminoácido

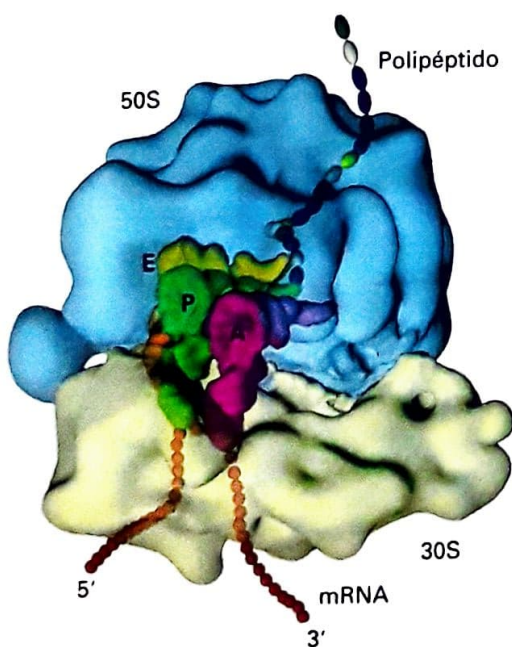
En ausencia del ribosoma, el híbrido de tres pares de bases RNA-RNA entre los anticodones del tRNA y los codones del mRNA en los sitios A y P no sería estable; los dúplex RNA-RNA entre las moléculas separadas de RNA deberían ser considerablemente más largos para resultar estables en condiciones fisiológicas. Sin embargo, múltiples interacciones entre los rRNA grandes y pequeños y los dominios generales de los tRNA (p. ej., los bucles D y T Ψ CG, véase la Fig. 4-20) estabilizan los tRNA en los sitios A y P, mientras que otras interacciones RNA-RNA controlan el correcto apareamiento de bases codón-anticodón, asegurando la correcta lectura del código genético. Luego, las interacciones entre los rRNA y los dominios generales de todos los tRNA dan como resultado el movimiento de los tRNA entre los sitios A, P y E a medida que los ribosomas se translocan a lo largo del mRNA en grupos de codones de tres nucleótidos a la vez.

Las etapas finales de la traducción, al igual que la iniciación y la elongación, requieren señales moleculares de alta especificidad que de-

La liberación de la proteína completa deja un tRNA libre en el sitio P y el mRNA aún asociado con el ribosoma 80S y eRF1 y eRF3-GDP unido en el sitio A. En los eucariontes ocurre un reciclado de ribosomas cuando este complejo postterminación se une a una proteína llamada ABCE1, que emplea energía procedente de la hidrólisis del ATP para separar las subunidades y liberar al mRNA. Los factores de iniciación eIF1, eIF1A y eIF3 también se requieren y se cargan en la subunidad 40S, dejándola lista para otra ronda de iniciación (Fig. 4-24, *arriba*). En realidad, nunca se libera un mRNA libre como se representa en la Figura 4-27, por simplicidad. Más bien, el mRNA tiene otros ribosomas asociados con él en varias etapas de elongación, PABP unidas a la cola de poliA y complejo eIF4 asociado con el casquete 5', listo para unirse con otro complejo de preiniciación 43S (Fig. 4-24).

La traducción de una molécula eucarionte de mRNA individual para dar como resultado una proteína de tamaño típico toma entre uno y dos minutos. Hay dos fenómenos que incrementan de modo significativo la tasa global a la cual las células pueden sintetizar una proteína: la traducción simultánea de una molécula única de mRNA por múltiples ribosomas y el rápido reciclado de subunidades ribosómicas después que se sueltan del extremo 3' terminal de un mRNA. La traducción simultánea de un mRNA por ribosomas múltiples es fácilmente observable en fotomicrografías electrónicas y por análisis de sedimentación que muestran el mRNA unido a múltiples ribosomas que sostienen cadenas polipeptídicas nacientes en crecimiento. Estas estructuras denominadas **polirribosomas** o *polisomas* tenían aspecto circular, en las fotomicrografías electrónicas de algunos tejidos. Estudios posteriores con factores de iniciación purificados explicaron la forma circular de los polirribosomas y sugirieron los mecanismos por los cuales los ribosomas reciclan de manera eficiente.

Estos estudios revelaron que múltiples copias de la proteína que se une a poli(A) (PABP) interactúan tanto en la cola de poli(A) del mRNA como con la subunidad eIF4G del eIF4. Dado que la subunidad eIF4E del eIF4 se une a la estructura de casquete del extremo 5' terminal de un mRNA, los dos extremos de una molécula de mRNA están unidos por un puente mediante las proteínas intervinientes, formando un mRNA "circular" (Fig. 4-28a). Dado que los dos extre-



El modelo se basa en estudios de crío-ME. Los tres tRNA están superpuestos en los sitios A (rosado) P (verde) y E (amarillo). La cadena polipeptídica naciente está enterrada en un túnel en la subunidad ribosómica grande que comienza a crecer cerca del tallo aceptor del tRNA en el sitio P (Wease y cols., 2000).

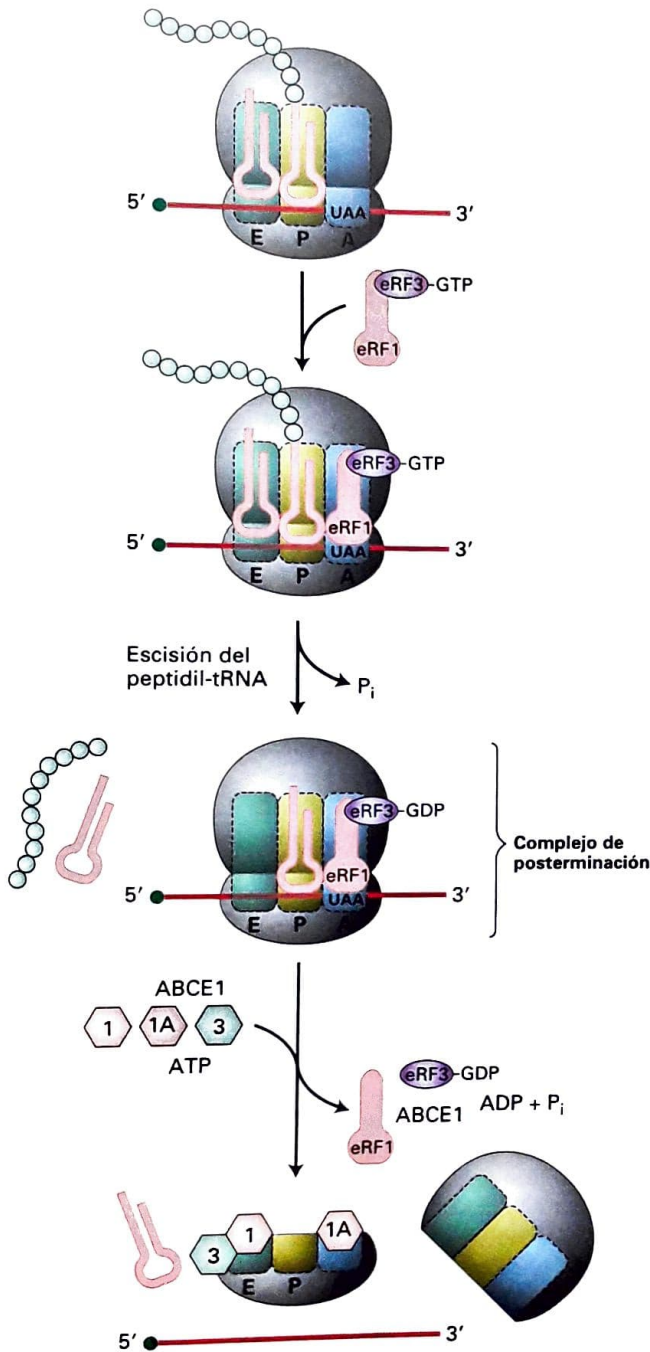


FIGURA 4-27 Terminación de la traducción en eucariotes. Cuando un ribosoma que lleva una cadena proteica nascente llega a un codón de terminación (UAA, UGA, UAG), el factor de liberación eRF1 entra al sitio A junto con el eRF3-GTP. La hidrólisis del GTP unido es acompañada por la escisión de la cadena peptídica desde el tRNA del sitio P y la expulsión del tRNA del sitio E, formando un complejo de postterminación. Las subunidades del ribosoma se separan por acción de la ATPasa ABCE1 junto con los eIF1, eIF1A y eIF3. La subunidad 40S se libera unida a estos eIF, lista para iniciar otro ciclo de traducción (véase la Fig. 4-24).

mos de un polisoma están relativamente cercanos, las subunidades ribosómicas que se desprenden del extremo 3' se ubican cerca del extremo 5', facilitando la reiniciación por la interacción con la su-

bunidad 40S y sus factores de iniciación asociados con el eIF4 unido al casquete 5'. La forma circular que se muestra en la Figura 4-28b se piensa que incrementa el reciclado ribosómico y así aumenta la eficiencia de la síntesis de proteínas.

La superfamilia de las proteínas GTPasa funciona en varios pasos del control de calidad de la traducción

Vemos ahora que una o más proteínas que unen GTP participan en cada etapa de la traducción. Estas proteínas pertenecen a la **superfamilia de las GTPasa** de proteínas interruptoras que ciclan entre una forma activa unida a GTP y una forma inactiva unida a GDP (véase la Fig. 3-32). La hidrólisis del GTP unido provoca un cambio de conformación en la GTPasa y otras proteínas asociadas que resultan críticas para varios procesos moleculares complejos. En la iniciación de la traducción, por ejemplo, la hidrólisis del eIF2-GTP al eIF2-GDP evita un barrido ulterior del mRNA una vez que se encuentra el sitio de iniciación y permite la unión de la subunidad ribosómica grande a la subunidad pequeña (véase la Fig. 4-24, paso 6). De modo similar, la hidrólisis de EF1α-GTP a EF1α-GDP durante la elongación de la cadena ocurre solamente cuando el sitio A está ocupado por un tRNA cargado con un anticodón que aparea sus bases con el codón del sitio A. La hidrólisis del GTP provoca un cambio de conformación en el EF1α que da como resultado la liberación de su tRNA unido, permitiendo que el extremo 3' terminal aminoacilado del tRNA cargado se mueva a la posición requerida para la formación del enlace peptídico (Fig. 4-26, paso 2). La hidrólisis de EF2-GTP a EF2-GDP lleva a la correcta translocación del ribosoma a lo largo del mRNA (véase la Fig. 4-26, paso 4), y la hidrólisis de eRF3-GTP a eRF3-GDP asegura la correcta terminación de la traducción (Fig. 4-27). Dado que la hidrólisis del enlace fosfodiéster de alta energía β-γ del GTP es irreversible, el acoplamiento de estos pasos en la síntesis proteica a la hidrólisis del GTP evita que avancen en la dirección inversa.

Las mutaciones sin sentido provocan la terminación prematura de la síntesis proteica

Un tipo de mutación que puede inactivar un gen en cualquier organismo es un cambio en un par de bases que convierte a un codón que normalmente codifica para un aminoácido en un codón de detención, p. ej., UAC (que codifica tirosina) → UAG (detención). Cuando esto ocurre precozmente en el marco de lectura, la proteína truncada resultante habitualmente no es funcional. Estas mutaciones se llaman *sin sentido* porque cuando el código genético que iguala cada triplete de codones con un aminoácido fue descifrado por los investigadores, se encontró que los tres codones de detención no codificaban aminoácido alguno —no “tenían sentido”—.

En estudios genéticos con la bacteria *E. coli* se descubrió que el efecto de una mutación sin sentido puede suprimirse por una segunda mutación en un gen de tRNA. Esto ocurre cuando la secuencia que codifica el anticodón en el gen de tRNA cambia a un triplete complementario con el codón de detención original, p. ej., una mutación en el tRNA^{Tyr} que cambia su anticodón de GUA a CUA, que puede aparear las bases con el codón de detención UAG. El tRNA mutante puede ser reconocido por la aminoacil sintetasa de tirosina y acoplarse a la tirosina. Las células que tienen tanto la mutación sin sentido original como la segunda mutación en el anticodón del gen de tRNA^{Tyr} en consecuen-

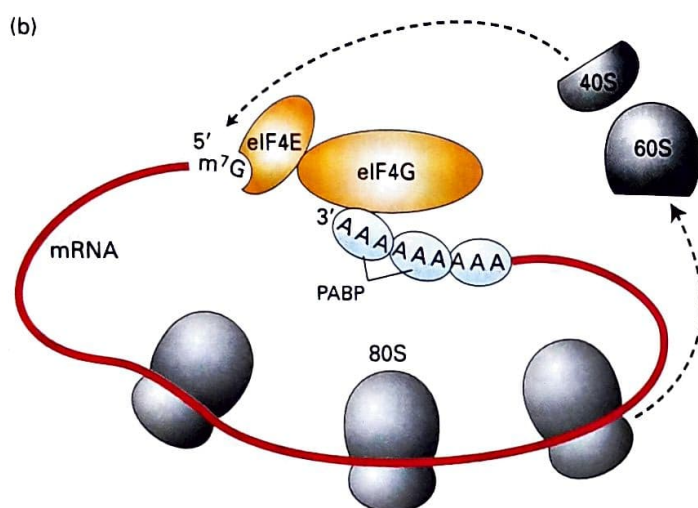


FIGURA EXPERIMENTAL 4-28 La estructura circular del mRNA incrementa la eficiencia de la traducción. El mRNA eucarionte forma una estructura circular debido a las interacciones de tres proteínas. (a) En presencia de la proteína que une poli(A) purificada (PABP), eIF4E y eIF4G, los mRNA eucariontes forman estructuras circulares, visibles en esta fotomicrografía electrónica de campo de fuerzas. En estas estructuras, las interacciones proteína-proteína y proteína-mRNA forman un puente entre los extremos 5' y 3' del mRNA. (b) Modelo de la síntesis proteica sobre polisomas circulares y subunidades ribosómicas en reciclado. Los ribosomas individuales múltiples pueden traducir de forma simultánea un mRNA eucarionte y se muestran aquí en forma circular estabilizados por interacciones entre proteínas unidas entre los extremos 3' y 5'. Cuando un ribosoma completa la traducción y se disocia desde el extremo 3', las subunidades separadas pueden encontrar rápidamente el casquete 5' cercano (m^7G) y la PABP unida a la cola de poli(A) e iniciar otro ciclo de síntesis. (Parte [a] cortesía de A. Sachs.)

cia pueden insertar una tirosina en la posición del codón de detención mutante, permitiendo que la síntesis proteica continúe más allá de la mutación sin sentido original. Este mecanismo de supresión no es altamente eficiente, de modo tal que la traducción de los mRNA normales con un codón de detención UAG termina en la posición normal en la

mayoría de los casos. Si se produjera suficiente proteína codificada por el gen original con la mutación sin sentido como para mantener sus funciones esenciales, el efecto de la primera mutación se diría que fue *suprimido* por la segunda mutación en el anticodón del gen de tRNA.

Este mecanismo de *supresión sin sentido* es una herramienta poderosa en los estudios genéticos de las bacterias. Por ejemplo, pueden aislarse virus bacterianos mutantes que no pueden crecer en células normales pero sí pueden hacerlo en células que expresan un tRNA supresor sin sentido porque el virus mutante tiene una mutación sin sentido en un gen esencial. Estos virus mutantes crecidos en las células con la supresión sin sentido, luego pueden ser usados en experimentos para analizar la función del gen mutante al infectar células normales que no suprimen la mutación y analizar qué paso en el ciclo de vida del virus es defectuoso en ausencia de la proteína mutante.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 4.4

Síntesis secuencial de proteínas en los ribosomas

- Tanto los ribosomas procariontes como eucariontes —los grandes complejos de ribonucleoproteínas sobre los cuales ocurre la traducción— consisten en una subunidad pequeña y una grande (véase la Fig. 4-22). Cada subunidad contiene numerosas proteínas diferentes y una molécula de rRNA (pequeña o grande). La subunidad grande contiene también un rRNA 5S accesorio en las bacterias y dos rRNA accesorios en los eucariontes (5S y 5.8S en los vertebrados).
- Los rRNA análogos de muchas especies distintas se pliegan en estructuras tridimensionales bastante similares que contienen numerosos tallo-bucles y sitios de unión para las proteínas, los mRNA y los tRNA. Las proteínas ribosómicas de mucho menor tamaño se asocian con la periferia de los rRNA.
- De los dos tRNA de metionina presentes en las células, solo uno ($tRNA_i^{Met}$) funciona en la iniciación de la traducción.
- Cada etapa de la traducción —la iniciación, la elongación de la cadena y la terminación— requiere factores proteicos específicos que incluyen la unión de proteínas al GTP que hidrolizan su GTP unido a GDP cuando se ha completado un paso en forma exitosa.
- Durante la iniciación, las subunidades ribosómicas se ensamblan cerca del sitio de iniciación de la traducción en una molécula de mRNA con el tRNA que lleva la metionina amino terminal ($Met-tRNA_i^{Met}$) apareado por sus bases con el codón de iniciación (Fig. 4-24).

• La elongación de la cadena implica un ciclo repetitivo de cuatro pasos: la unión laxa de un aminoacil-tRNA entrante al sitio A del ribosoma; la unión estrecha del aminoacil-tRNA correcto al sitio A acompañado de la liberación del tRNA usado previamente desde el sitio E; la transferencia de la cadena peptídil creciente al sitio del aminoácido entrante catalizado por el rRNA grande y la translocación del ribosoma al codón siguiente, moviendo por lo tanto el peptídil-tRNA del sitio A al sitio P y del tRNA ahora no acilado del sitio P al sitio E (véase la Fig. 4-25).

- En cada ciclo de elongación de la cadena, el ribosoma sufre dos cambios de conformación controlados por las proteínas que se unen al GTP. El primero (EF1 α) permite la unión estrecha del aminoacil-tRNA entrante al sitio A y la expulsión de un tRNA desde el sitio E, y el segundo (EF2) conduce a la translocación.

- La terminación de la traducción es llevada a cabo por dos tipos de factores de terminación: los que reconocen los codones de terminación y los que promueven la hidrólisis del peptidil-tRNA (véase la Fig. 4-27). Una vez más, el reconocimiento correcto de un codón de terminación es controlado por una GTPasa (eRF3).

- La eficiencia de la síntesis proteica se incrementa por la traducción simultánea de un único mRNA por múltiples ribosomas formando un polirribosoma, o simplemente polisoma. En las células eucariontes, las interacciones mediadas por proteínas acercan los dos extremos de un polirribosoma y promueven así el rápido reciclado de las subunidades ribosómicas, lo cual incrementa adicionalmente la eficiencia de la síntesis proteica (véase la Fig. 4-28b).

4.5 Replicación del DNA

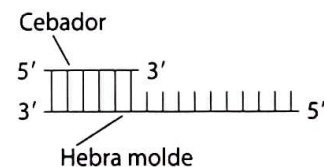
Ahora que hemos visto de qué manera la información genética codificada en la secuencia de nucleótidos del DNA se traduce a las proteínas que desempeñan la mayoría de las funciones celulares, podemos apreciar la necesidad de copiar con precisión las secuencias de DNA durante la replicación de éste en la preparación para la división celular (véase la Fig. 4-1, paso 4). El apareamiento regular de bases en la estructura de doble hélice del DNA sugirió a Watson y Crick que se sintetizaran nuevas hebras empleando las hebras existentes (*parentales*) como moldes para la formación de hebras nuevas *hijas*, complementarias a las hebras parentales.

Este modelo de apareamiento de bases con el molde, teóricamente podría proceder por un mecanismo *conservador* o *semiconservador*. En un mecanismo conservador, las dos hebras hijas formarían una nueva molécula de DNA de dos hebras (*dúplex*) y el dúplex parental permanecería intacto. En un mecanismo semiconservador, las hebras parentales se separan en forma permanente y cada una de ellas forma una molécula dúplex en la que la hebra hija se aparea por sus bases con ella. La evidencia definitiva de que el dúplex de DNA se replicaba por un mecanismo semiconservador provino del que ahora es un experimento clásico llevado a cabo por M. Meselson y W. F. Stahl, que se esquematiza en la Figura 4-29.

El copiado de una hebra molde de DNA a una hebra complementaria es así una característica común de la replicación del DNA, la transcripción del DNA a RNA y, como veremos más tarde en este capítulo, la reparación y recombinación del DNA. En todos los casos, la información en el molde en forma de una secuencia específica de nucleótidos se preserva. En algunos virus, las moléculas de DNA de una sola hebra funcionan como moldes para la síntesis de RNA complementario o para hebras de DNA. Sin embargo, la amplia preponderancia de RNA y DNA en las células se sintetiza a partir del DNA dúplex preexistente.

Las DNA polimerasas requieren un cebador para iniciar la replicación

De manera análoga al RNA, el DNA se sintetiza a partir de precursores desoxinucleósido 5'-trifosfato (dNTP). También, al igual que la síntesis de RNA, la síntesis de DNA procede siempre en la dirección 5' $\rightarrow$ 3' porque el crecimiento de la cadena resulta de la formación de un enlace fosfoéster entre el oxígeno 3' de una hebra creciente y el fosfato α de un dNTP (véase la Fig. 4-10a). Como se analizó previamente, una RNA polimerasa puede encontrar un sitio de iniciación de transcripción adecuado en un dúplex de DNA e iniciar la síntesis de un RNA complementario a la hebra molde de DNA (véase la Fig. 4-11). Por el contrario, las **DNA polimerasas** no pueden iniciar la síntesis de la cadena de novo; en lugar de ello, requieren una hebra corta preexistente de RNA o DNA, llamada un **cebador**, para iniciar el crecimiento de la cadena. Con cebador apareado por sus bases a la hebra molde, la DNA polimerasa añade desoxinucleótidos al grupo hidroxilo libre del extremo 3' terminal del cebador según está dirigido por la secuencia de la hebra molde:



Cuando el cebador es el RNA, la hebra hija que se forma es RNA en el extremo 5' terminal y DNA en el extremo 3' terminal.

El DNA dúplex se desenrolla y las hebras hijas se forman en la horquilla de replicación del DNA

Para que el DNA dúplex funcione como molde durante la replicación, las dos hebras enrolladas deben desenrollarse o separarse para que las bases queden accesibles con el fin de aparearse con las bases de los dNTP que se polimerizarán en las hebras hijas recién sintetizadas. Este desenrollamiento de las hebras de DNA parentales está a cargo de **helicases** específicas, y comienza en segmentos únicos en la molécula de DNA llamados *orígenes de replicación* o simplemente *orígenes*. Las secuencias de nucleótidos de los orígenes de diferentes organismos varían extensamente aunque, por lo habitual, contienen secuencias ricas en A-T. Una vez que las helicases han desenrollado el DNA parental en un origen, una polimerasa de RNA especializada llamada **primasa** forma un cebador de RNA corto complementario a las hebras de molde desenrolladas. El cebador, aún apareado por sus bases a la hebra complementaria de DNA, luego se elonga por acción de una DNA polimerasa formando una nueva hebra hija.

La región de DNA en la cual estas proteínas se juntan para llevar a cabo la síntesis de hebras hijas se llama **horquilla de replicación**. A medida que la replicación avanza, la horquilla de replicación y las proteínas asociadas se alejan del origen. Como se indicó previamente, el desenrollamiento local del DNA dúplex produce estrés de torsión que se alivia por acción de la topoisomerasa I. Para que las DNA polimerasas se muevan y copien un DNA dúplex, la helicasa debe desenrollar secuencialmente el dúplex y la topoisomerasa debe eliminar los superenrollamientos que forma.

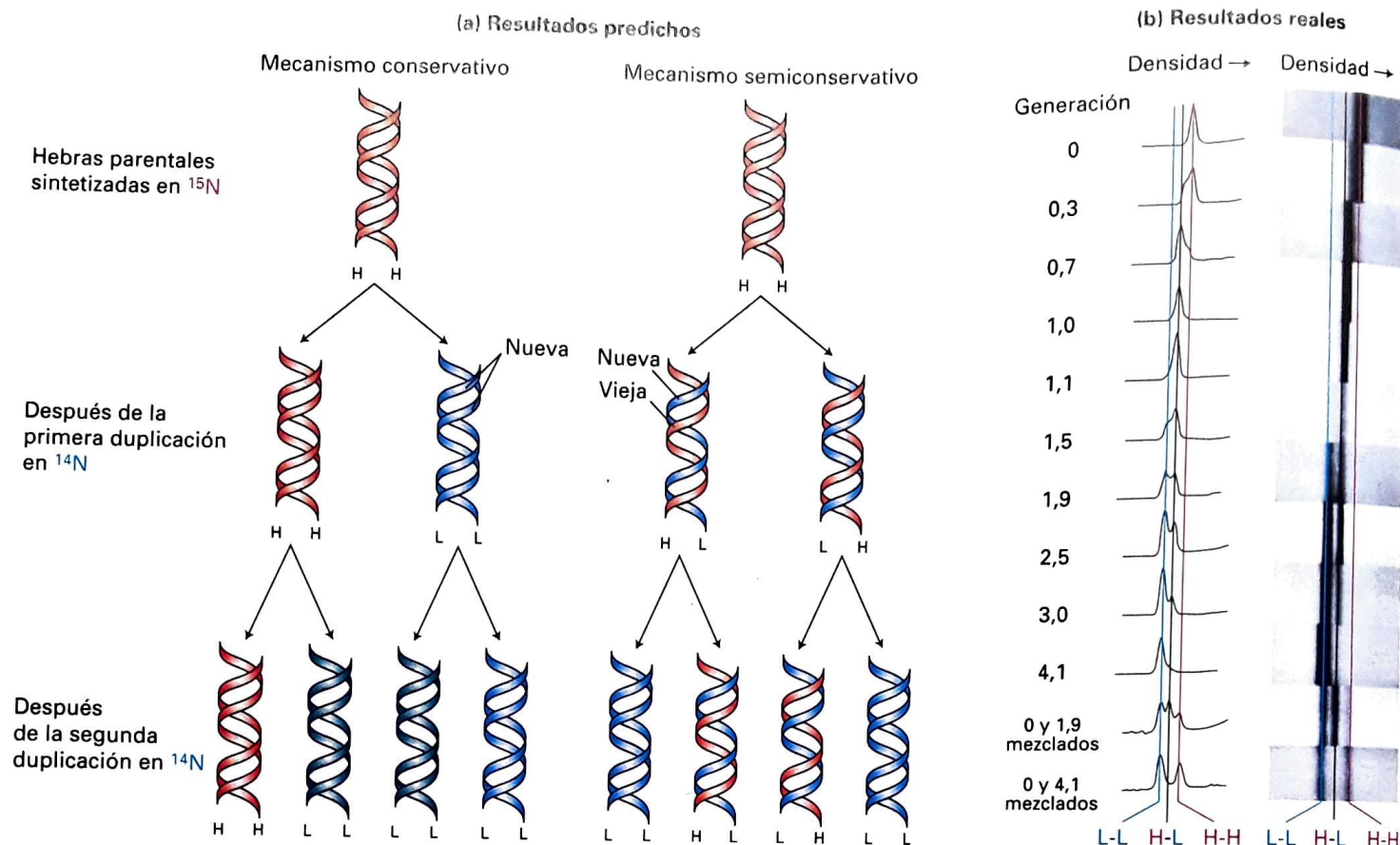


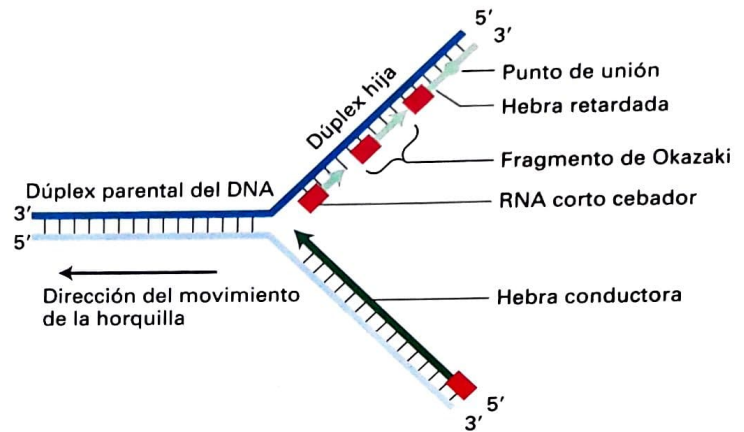
FIGURA EXPERIMENTAL 4-29 El experimento de Meselson-Stahl. Este experimento mostró que el DNA se replica mediante un mecanismo semiconservativo. Las células de *E. coli* se desarrollaron inicialmente en un medio con sales de amonio preparado con nitrógeno “pesado” (^{15}N) hasta que todo el DNA celular quedó marcado. Luego, las células se transfirieron a un medio que contenía el isótopo normal “ligero” (^{14}N), las muestras se removían periódicamente de los cultivos y el DNA de cada muestra se analizaba por centrifugación en equilibrio de gradiente de densidad, un procedimiento que separa las macromoléculas de acuerdo con su densidad. Esta técnica puede separar los dúplex pesado-pesado (H-H), ligero-ligero (L-L) y pesado-ligero (H-L) en distintas bandas. (a) La composición esperada de las moléculas dúplex hijas sintetizadas a partir del DNA marcado con ^{15}N a partir de las células de *E. coli* que se cambian a un medio que contiene ^{14}N si el DNA se replicara mediante un mecanismo conservativo o semiconservativo. Las cadenas parentales pesadas (H) aparecen en rojo; las cadenas ligeras (L) sintetizadas después del cambio al medio que contiene ^{14}N aparecen en azul. Nótese que el mecanismo conservativo nunca genera DNA H-L y que el mecanismo semiconservativo nunca genera DNA H-H, sino DNA H-L durante la primera y la segunda duplicación. En los ciclos de replicación adicionales, las hebras del DNA original marcado con ^{15}N (H) se diluyen, de modo tal que la gran masa de DNA consistirá en dúplex L-L cual-

quiera que sea el mecanismo. (b) Patrones de bandas reales del DNA sometido a centrifugación en equilibrio de gradiente de densidad antes y después del cambio de las células de *E. coli* marcadas con ^{15}N al medio que contiene ^{14}N . Las bandas de DNA se visualizaron con luz UV y se fotografiaron. Los trazos de la izquierda son una medida de la densidad de la señal fotográfica y por lo tanto de la concentración del DNA a lo largo de las células centrifugadas de izquierda a derecha. El número de generaciones (*extremo izquierdo*) que sigue al cambio al medio con ^{14}N fue determinado contando la concentración de células de *E. coli* en el cultivo. Este valor corresponde al número de ciclos de replicación que ocurrieron en el momento en que se tomó cada muestra. Después de una generación de cultivo, todo el DNA extraído tenía la densidad del DNA H-L. Después de 1,9 generaciones, aproximadamente la mitad del DNA tenía la densidad del DNA H-L y la otra mitad tenía la densidad del DNA L-L. En las generaciones adicionales, una fracción cada vez mayor del DNA extraído consistía en dúplex L-L; nunca aparecieron dúplex H-H. Estos resultados se adecuan al patrón predicho del mecanismo de replicación semiconservativo que se muestra en (a). Las dos centrifugaciones inferiores contienen mezclas de DNA H-H y DNA aislado en las generaciones 1,9 y 4,1 para mostrar con claridad las posiciones del DNA H-H, H-L y L-L en el gradiente de densidad. (Parte (b) tomada de M. Meselson y F. W. Stahl, 1958, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 44:671.)

Una complicación central en la operación de la horquilla de replicación del DNA surge de dos propiedades: las dos hebras del ADN dúplex parental son antiparalelas y las DNA polimerasas (tal como las RNA polimerasas) pueden añadir los nucleótidos a las nuevas hebras crecientes solo en la dirección $5' \rightarrow 3'$. La síntesis de una hebra hija, llamada la **hebra conductora**, puede proceder en forma continuada desde un cebador de RNA en dirección $5' \rightarrow 3'$, la misma dirección que el movimiento de la horquilla de replicación (Fig. 4-30). El problema tiene lugar en la síntesis de la otra hebra hija, llamada la **hebra retardada**.

Dado que el crecimiento de la hebra retardada debe ocurrir en la dirección $5' \rightarrow 3'$, el copiado de esta hebra molde debe ocurrir de algún modo en la dirección *opuesta* al movimiento de la horquilla de replicación. Una célula cumple su destino sintetizando un nuevo cebador cada pocos cientos de bases aproximadamente en la segunda hebra parental, a medida que la hebra queda expuesta por el desenrollamiento. Cada uno de estos cebadores, apareados por sus bases a la hebra molde, se alarga en la dirección $5' \rightarrow 3'$ formando segmentos discontinuos llamados **fragmentos de Okazaki** por su descubridor, Reiji Okazaki (véa-

FIGURA 4-30 Hebra conductora y hebra retardada en la síntesis del DNA. Los nucleótidos se añaden por la DNA polimerasa a cada hebra hija creciente en dirección 5' → 3' (indicado por el sentido de las flechas). La hebra conductora se sintetiza en forma continua a partir de un cebador de RNA único (en rojo) en su extremo 5' terminal. La hebra retardada se sintetiza de manera discontinua a partir de múltiples cebadores de RNA que se forman periódicamente a medida que cada nueva región del dúplex parental se desenrolla. La elongación de estos cebadores produce inicialmente fragmentos de Okazaki. A medida que cada fragmento creciente se aproxima al cebador previo, el cebador se elimina y estos fragmentos se unen. La repetición de este proceso finalmente resulta en la síntesis de la hebra retardada completa.



se la Fig. 4-30). El cebador de RNA de cada fragmento de Okazaki se elimina y se reemplaza por la cadena de RNA creciente del fragmento de Okazaki vecino; finalmente, una enzima llamada DNA *ligasa* une los fragmentos adyacentes.

Varias proteínas participan en la replicación del DNA

La comprensión detallada de las proteínas eucariontes que participan en la replicación del DNA provino inicialmente de estudios con DNA virales pequeños, en particular el DNA del SV40, el genoma circular de un virus pequeño que infecta a los monos. Las células infectadas por los virus replican grandes números del genoma simple de los virus en un período breve, haciéndolos sistemas modelo ideales para el estudio de aspectos básicos de la replicación del DNA. Dado que los virus simples como SV40 dependen en gran medida de la maquinaria de replicación de sus células huésped (en este caso las células de mono), ofrecen una oportunidad única para estudiar la replicación de múltiples moléculas de DNA pequeñas idénticas por proteínas celulares. La Figura 4-31 muestra las múltiples proteínas que coordinan el copiado del DNA del SV40 en una horquilla de replicación. Las proteínas ensambladas en una horquilla de replicación ilustran además el concepto de máquinas moleculares presentado en el Capítulo 3. Estos complejos de múltiples componentes permiten que la célula lleve a cabo una secuencia ordenada de eventos que desempeña funciones celulares esenciales.

La máquina molecular que replica el DNA de SV40 contiene solo una proteína del virus. Todas las demás proteínas implicadas en la replicación del DNA del SV40 son proporcionadas por la célula huésped. Esta proteína viral, el *antígeno T grande*, forma una *helicasa de replicación* hexamérica, una proteína que emplea la energía proveniente de la hidrólisis del ATP para desenrollar las hebras parentales en la horquilla de replicación. Los cebadores para las hebras hijas conductoras y retardadas del DNA son sintetizadas por un complejo de una

primasa, que sintetiza un cebador de RNA corto de ≈ 10 nucleótidos, y una DNA *polimerasa* α (Pol α), que extiende el cebador de RNA con desoxinucleótidos en otros ≈ 20 nucleótidos, formando un cebador mixto RNA-DNA.

El cebador se extiende en la hebra hija de DNA por acción de la DNA *polimerasa* δ (Pol δ) y la DNA *polimerasa* ϵ (Pol ϵ), que es menos probable que cometan errores durante el copiado de la hebra molde que la Pol α por su mecanismo de verificación de lectura (véase la Sección 4.7). Estudios recientes indican que durante la replicación del DNA celular la Pol δ sintetiza la hebra retardada del DNA, mientras que la Pol ϵ sintetiza la mayor parte de la longitud de la hebra conductora. La Pol δ y la Pol ϵ forman cada una un complejo con el Rfc (factor de replicación C, en inglés *replication factor C*) y un PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular, en inglés *proliferating cell nuclear antigen*) que desplaza al complejo primasa-Pol α después de la síntesis del cebador. Como se ilustró en la Figura 4-31b, el PCNA es una proteína homotrimérica que tiene un agujero central a través del cual pasa el ADN dúplex hijo, lo cual evita que los complejos PCNA-Rfc-Pol δ y PCNA-Rfc-Pol ϵ se disocien del molde. Como tal, el PCNA se conoce como una *pinza deslizante* que permite que la Pol δ y la Pol ϵ se asocien de manera estable con una única hebra molde durante miles de nucleótidos. El Rfc funciona abriendo el anillo de PCNA de modo tal que pueda rodear a la región corta de DNA de doble cadena sintetizado por la Pol α . En consecuencia, el Rfc se llama a menudo el *cargador de la pinza*.

Después de que el DNA parental se ha separado en moldes de hebras sencillas en la horquilla de replicación, se une con múltiples copias de RPA (proteína de replicación A, en inglés *replication protein A*), una proteína heterotrimérica (Fig. 4-31c). La unión de la RPA mantiene al molde en una conformación uniforme óptima para que el DNA sea copiado por polimerasas. Las proteínas RPA unidas se descargan de las hebras parentales por acción de las Pol α , Pol δ y Pol ϵ a medida que estas sintetizan las hebras complementarias apareadas por sus bases con las hebras parentales.

(a) Horquilla de replicación del DNA de SV40

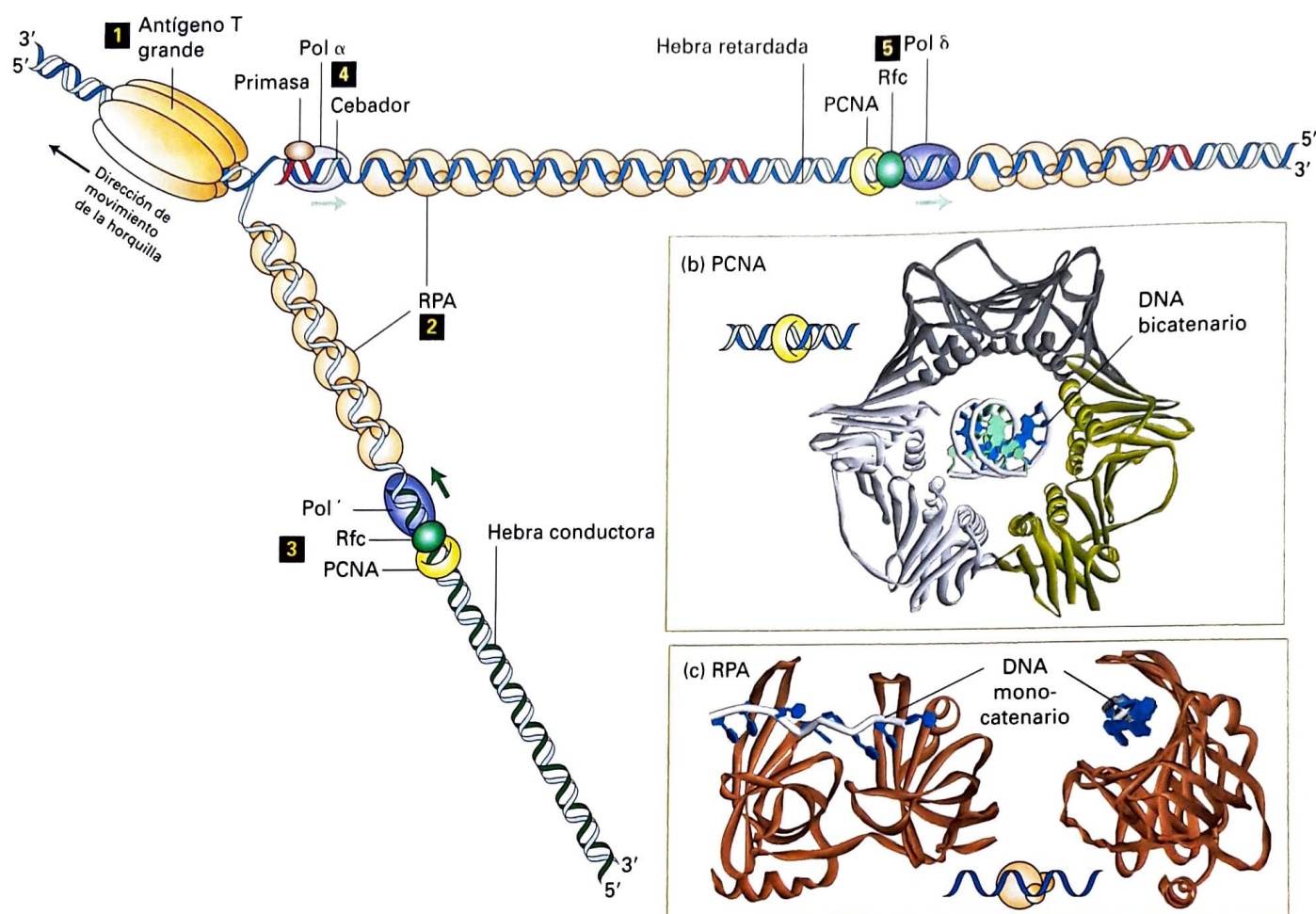


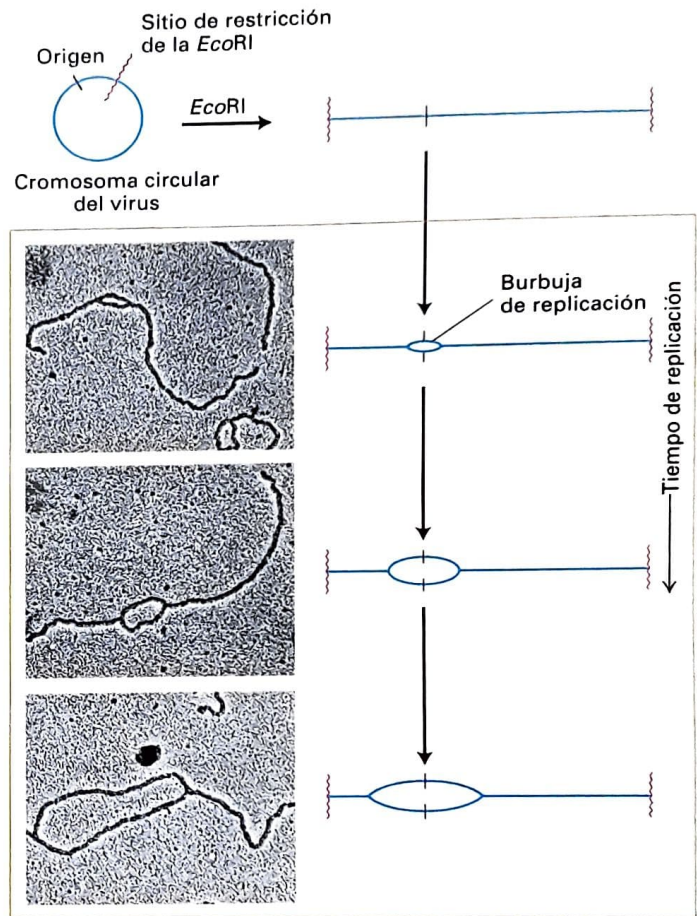
FIGURA 4-31 Modelo de una horquilla de replicación de un DNA de SV40. (a) Un hexámero de un antígeno T grande (1), una proteína viral, funciona como una helicasa para desenrollar las hebras de DNA parentales. Las regiones de hebra simple del molde parental que son desenrolladas por el antígeno T grande se unen a múltiples copias de una proteína RPA heterotrimérica (2). La hebra conductora es sintetizada por un complejo de DNA polimerasa ϵ (Pol ϵ), PCNA y Rfc (3). Los cebadores para la síntesis de la hebra retardada (en rojo, RNA; en azul claro, DNA) son sintetizados por un complejo de DNA polimerasa α (Pol α) y una primasa (4). Por el extremo 3' terminal de cada cebador sintetizado por la Pol α -primasa luego es unido por un complejo PCNA-Rfc-Pol δ que procede a extender el cebador y sintetiza la mayoría de cada fragmento de Okazaki (5). (b) Las tres subunidades de la PCNA que se muestran en diferentes colores forman una estructura circular con un agujero central a través del cual pasa el DNA de doble hebra. En el centro de un modelo de cintas del trímero

de la PCNA se muestra un diagrama del DNA. El diagrama que se encuentra arriba a la izquierda muestra un ícono que representa a la PCNA unida al DNA en (a). (c) La subunidad grande de la RPA contiene dos dominios que unen DNA de hebra simple. A la izquierda, la estructura determinada por los dos dominios que unen DNA de la subunidad grande que se unen al DNA de hebra simple se muestran con el esqueleto de DNA (esqueleto blanco con bases azules), paralelo al plano de la página. Nótese que la hebra de DNA simple se extiende con las bases expuestas, una conformación óptima para la replicación por la DNA polimerasa. A la derecha, la vista es hacia abajo en toda la longitud de la hebra simple de DNA, lo que revela el modo en que la RPA β se envuelve alrededor del DNA. El diagrama de la parte inferior muestra el ícono que representa la RPA unida al DNA en la parte (a). (Parte [a] adaptada de S. J. Flint y cols., 2000, *Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control*, ASM Press. Parte [b] adaptada de J. M. Gulbis y cols., 1996, *Cell* 87:297. Parte [c] adaptada de A. Bochkarev y cols., 1997, *Nature* 385:176.)

Otras varias proteínas eucariontes que funcionan en la replicación del DNA no se muestran en la Figura 4-31. Por ejemplo, la topoisomerasa I se asocia con el DNA parental más allá de la helicasa replicativa, es decir, a la izquierda del antígeno T en la Figura 4-31, para eliminar el estrés de torsión inducido por el desenrollamiento de las hebras pa-

rentales (véase la Fig. 4-8a). La ribonucleasa H y la FEN I remueven los ribonucleótidos en los extremos 5' de los fragmentos de Okazaki; estos son reemplazados por desoxinucleótidos añadidos por la DNA polimerasa δ a medida que extiende los fragmentos de Okazaki corriente arriba. Sucesivos fragmentos de Okazaki se acoplan por DNA ligasas a

FIGURA EXPERIMENTAL 4-32 Replicación bidireccional del DNA del SV40. La microscopía electrónica del DNA del SV40 en replicación indica el crecimiento bidireccional de las hebras del DNA desde un origen. El DNA viral en replicación de células infectadas por SV40 fue cortado por la enzima de restricción *EcoRI* que reconoce un sitio en el DNA circular. Esto se hizo para proporcionar una zona indicativa de una secuencia específica en el genoma de SV40: la secuencia de reconocimiento de la *EcoRI* ahora es fácilmente reconocida dado que los extremos de las moléculas de DNA lineal se visualizan por microscopía electrónica. Las fotomicrografías electrónicas de las moléculas de DNA del SV40 en replicación cortadas por la *EcoRI* mostraron una colección de moléculas cortadas con "burbujas" de replicación de longitudes crecientes, cuyos centros se encuentran a una distancia constante de cada extremo de las moléculas de corte. Este hallazgo es compatible con el crecimiento de la cadena en dos direcciones a partir de un origen común localizado en el centro de una burbuja, según se ilustró en los diagramas correspondientes. (Véase G. C. Fareed y cols., 1972, *J. Virol.* 10:484; las fotografías son cortesía de N. P. Salzman.)



través de enlaces fosfoéster $5' \rightarrow 3'$ estándar. Otras DNA polimerasas especializadas están implicadas en la reparación de los apareamientos incorrectos y las lesiones en el DNA (véase la Sección 4.7).

La replicación del DNA ocurre bidireccionalmente desde cada origen

Como se indicó en las Figuras 4-30 y 4-31, ambas hebras parentales de DNA que están expuestas por el desenrollamiento local en una horquilla de replicación, son copiadas a una hebra hija. En teoría, la replicación del DNA a partir de un origen único podría implicar una horquilla de replicación que se mueve en una dirección. En forma alternativa, dos horquillas de replicación podrían ensamblarse en un único origen y luego moverse en direcciones opuestas conduciendo a un crecimiento bidireccional de ambas hebras hijas. Varios tipos de experimentos, incluyendo el que se muestra en la Figura 4-32, proporcionaron evidencia inicial en apoyo del *crecimiento bidireccional* de las hebras.

El consenso general es que todas las células procariontes y eucariontes emplean un mecanismo bidireccional de replicación del DNA. En el caso del DNA del SV40, la replicación se inicia por la unión de dos helicasas hexaméricas del antígeno T grande a un origen único del SV40 y se ensamblan otras proteínas para formar dos horquillas de replicación. Estas luego se alejan del origen de SV40 en direcciones opuestas y la síntesis de la hebra conductora y de la hebra retardada ocurre en ambas horquillas. Como se muestra en la Figura 4-33, la horquilla de replicación izquierda extiende la síntesis de DNA hacia la izquierda; en forma semejante, la horquilla de replicación derecha, extiende la síntesis de DNA hacia la derecha.

A diferencia del DNA del SV40, las moléculas de DNA cromosómico eucarionte contienen múltiples orígenes de replicación separados por decenas a cientos de kilobases. Una proteína de seis subunidades llamada *ORC* (por su nombre en inglés *origin recognition complex*), o complejo de reconocimiento del origen, se une a cada origen y se asocia con otras proteínas requeridas para cargar las helicasas hexaméricas celulares compuestas por seis proteínas *MCM* homólogas. Dos helicasas *MCM* opuestas separan las hebras parentales en un origen y las protei-

nas RPA se unen al DNA resultante de una sola hebra. Las síntesis de los cebadores y los pasos posteriores en la replicación del DNA celular se creen análogos a los que ocurren en la replicación del DNA del SV40 (véanse las Fig. 4-31 y 4-33).

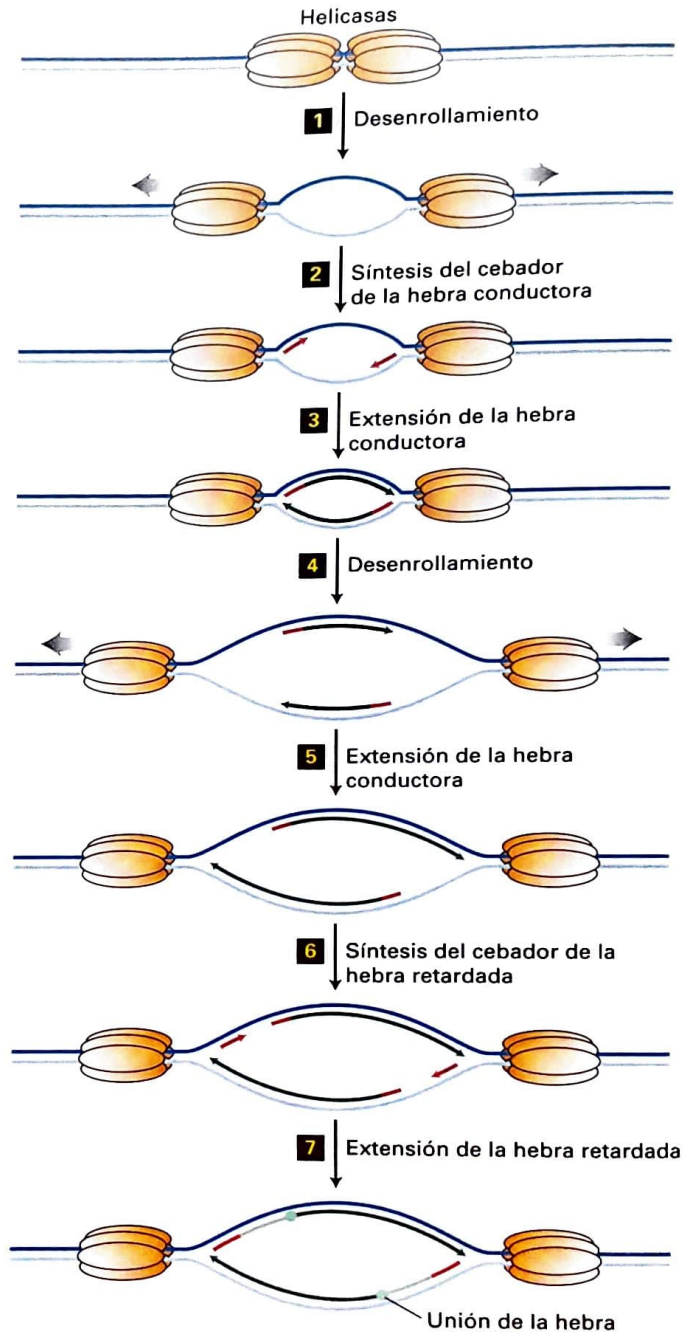
La replicación del DNA celular y otros eventos que conducen a la proliferación de las células están estrechamente regulados, de modo tal que se produce el número adecuado de células que constituyen cada tejido durante el desarrollo y durante la vida de un organismo. El control del paso de iniciación es el mecanismo primario para la regulación de la replicación celular del DNA. La activación de la actividad de la helicasa *MCM* que se requiere para iniciar la replicación del DNA celular está regulada por proteína-cinasas llamadas cinasas dependientes de ciclinas de la fase S. Otras **cinasas dependientes de ciclinas** regulan aspectos adicionales de la proliferación celular que incluyen el complejo proceso de la mitosis por el cual una célula eucarionte se divide en dos células hijas. La mitosis y otro tipo especializado de división celular llamado meiosis, que genera óvulos y espermatozoides haploides, se analizan en el Capítulo 5. En el Capítulo 20 tratamos los distintos mecanismos de regulación que determinan la velocidad de la división celular.

FIGURA 4-33 Mecanismo bidireccional de la replicación de DNA. La horquilla de replicación de la izquierda aquí es comparable a la horquilla de replicación representada en la Figura 4-31, que muestra también proteínas distintas del antígeno T grande. *Arriba:* dos helicasas hexaméricas, antígeno T grandes se unen primero al origen de replicación en orientaciones opuestas. Paso 1: empleando la energía provista por la hidrólisis del ATP, las helicasas se mueven en direcciones opuestas desenrollando el DNA parental y generando moldes de hebra simple que se unen a proteínas RTA. Paso 2: los complejos primasa-Pol α sintetizan cebadores cortos (en rojo) apareados por sus bases a cada una de las hebras parentales separadas. Paso 3: los complejos PCNA-Rfc-Pol δ/ϵ reemplazan a los complejos primasa-Pol α y extienden los cebadores cortos generando hebras conductoras (en verde oscuro) en cada horquilla de replicación. Paso 4: las helicasas desenrollan más lejos las hebras parentales y las proteínas RPA se unen a las regiones de hebra simple recién expuestas. Paso 5: los complejos PCNA-Rfc-Pol δ extienden las hebras conductoras más lejos. Paso 6: los complejos primasa-Pol α sintetizan los cebadores para la síntesis de la hebra retardada en cada horquilla de replicación. Paso 7: los complejos PCNA-Rfc-Pol δ desplazan a los complejos primasa-Pol α y extienden los fragmentos de Okazaki de la hebra retardada (en verde claro) que finalmente quedan unidos a los extremos 5' terminal de las hebras conductoras. La posición en la que ocurre la unión está representada por un círculo. La replicación continúa por el desenrollamiento más lejos de las hebras parentales y la síntesis de las hebras conductoras y retardadas como aparece en los pasos 4-7. Si bien se muestran como pasos individuales por razones de claridad, el desenrollamiento y la síntesis de las hebras conductora y retardada ocurren simultáneamente.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 4.5

Replicación del DNA

- Cada hebra de un dúplex parental de DNA actúa como molde para la síntesis de una hebra hija y permanece apareada por sus bases a la nueva hebra formando una dúplex hija ("mecanismo semiconservativo"). Las nuevas hebras se forman en la dirección 5' $\rightarrow$ 3'.
- La replicación se inicia en una secuencia llamada *origen*. Cada molécula de DNA cromosómico eucarionte contiene múltiples orígenes de replicación.
- Las DNA polimerasas, a diferencia de las RNA polimerasas, no pueden desenrollar las hebras del dúplex de DNA y no pueden iniciar la síntesis de hebras nuevas complementarias a las hebras molde.
- En una horquilla de replicación, una hebra hija (la hebra conductora) se elonga en forma continua. La otra hebra hija (la hebra retardada) se forma como una serie discontinua de fragmentos de Okazaki a partir de cebadores sintetizados cada pocos cientos de nucleótidos (Fig. 4-30).
- Los ribonucleótidos en el extremo 5' terminal de cada fragmento de Okazaki son eliminados y reemplazados por elongación del extremo 3' terminal del fragmento de Okazaki siguiente. Finalmente, los fragmentos de Okazaki adyacentes se unen por acción de la DNA ligasa.
- Las helicasas emplean la energía de la hidrólisis del ATP para separar las hebras parentales (molde) del DNA que inicialmente están unidas por múltiples copias de proteínas que unen el DNA de hebra simple,



RPA. La primasa sintetiza un cebador de RNA corto, que permanece apareado por sus bases al DNA molde. Éste inicialmente se extiende en el extremo 3' terminal por acción de la polimerasa de DNA α (Pol α), dando como resultado una hebra hija corta (5') RNA-(3')DNA.

- La mayoría del DNA en las células eucariontes es sintetizado por la Pol δ y la Pol ϵ que proviene de la Pol α y continúan la elongación de la hebra hija en la dirección $5' \rightarrow 3'$. La Pol δ sintetiza la mayor parte de la longitud de la hebra retardada, mientras que la Pol ϵ sintetiza la hebra conductora. La Pol δ y la Pol ϵ permanecen asociadas en forma estable con el molde uniéndose a la proteína Rfc, que a su vez se une a la PCNA, una proteína trimérica que rodea a la molécula de DNA dúplex hija, y funciona como una pinza deslizante (véase la Fig. 4-31).

- La replicación del DNA ocurre generalmente por un mecanismo bidireccional en el cual dos horquillas de replicación se forman en un origen y se mueven en direcciones opuestas, con ambas hebras molde copiadas en cada horquilla (véase la Fig. 4-33).

- La síntesis del DNA eucarionte in vivo está regulada por el control de la actividad de las helicasas MCM que inician la replicación del DNA en múltiples orígenes espaciados a lo largo del DNA cromosómico.

4.6 Reparación y recombinación del DNA

El daño al DNA es inevitable y surge de muchos modos. El daño al DNA puede ser provocado por escisión espontánea de los enlaces químicos presentes en la molécula, por agentes ambientales como la radiación ultravioleta o ionizante y por la reacción con productos químicos genotóxicos que son productos secundarios del metabolismo normal celular o que existen en el ambiente. Un cambio en la secuencia normal de DNA, llamado **mutación**, puede producirse durante la replicación cuando una DNA polimerasa inserta el nucleótido incorrecto a medida que lee un molde dañado. La mutación también puede ocurrir a una baja frecuencia como resultado de un error de copiado introducido por las DNA polimerasas cuando replican un molde que no tiene daños. Si no se corrigieran mutaciones de este tipo, las células podrían acumular tantas mutaciones que ya no podrían operar adecuadamente. Además, el DNA de las células germinales podría incurrir en tantas mutaciones que sería imposible que se formara una descendencia viable. De este modo, la prevención de los errores de secuencia en el DNA de todos los tipos de células es importante para la supervivencia y han evolucionado varios tipos de mecanismos celulares para la reparación del DNA dañado y para corregir errores de secuencia. Uno de estos mecanismos para reparar las roturas en el DNA de doble hebra es el proceso de recombinación, también usado por las células eucariontes para generar nuevas combinaciones de genes maternos y paternos en cada cromosoma mediante el intercambio de segmentos de estos durante la producción de células germinales (p. ej., espermatozoides y óvulos).

Resulta significativo que los defectos en los mecanismos de reparación del DNA y el cáncer estén estrechamente relacionados. Cuando los mecanismos de reparación se encuentran comprometidos, se acumulan mutaciones en el DNA de las células. Si estas mutaciones afectan genes que normalmente están implicados en la cuidadosa regulación de la división celular, las células pueden comenzar a dividirse de manera descontrolada llevando a la formación de tumores y al cáncer. El **Capítulo 25** muestra en detalle de qué manera surge el cáncer a partir de defectos en la reparación del DNA. Encontraremos algunos ejemplos también en esta sección y también consideraremos los modos en que

puede estar comprometida la integridad del DNA; luego analizaremos los mecanismos de reparación que han evolucionado en las células para asegurar la fidelidad de esta molécula tan importante.

Las DNA polimerasas introducen errores de copiado y también los corrigen

La primera línea de defensa en la prevención de las mutaciones es la propia DNA polimerasa. En ocasiones, cuando la DNA polimerasa replicativa avanza a lo largo del molde de DNA, se añade un nucleótido incorrecto al extremo $3'$ creciente de la hebra hija. Las DNA polimerasas de *E. coli*, por ejemplo, presentan aproximadamente un nucleótido incorrecto por cada 10^4 (diez mil) nucleótidos polimerizados. La tasa de mutación medida en las bacterias es mucho más baja: aproximadamente un error en 10^9 (mil millones) de nucleótidos incorporados a una hebra creciente. Esta notable precisión se debe en gran medida a la *verificación de lectura* hecha por las DNA polimerasas de *E. coli*. La Pol δ y Pol ϵ eucariontes emplean un mecanismo similar.

La verificación de la lectura depende de la *actividad $3' \rightarrow 5'$ exonucleasa* de algunas polimerasas de DNA. Cuando se incorpora alguna base incorrecta durante la síntesis de DNA, el apareamiento de bases entre el nucleótido $3'$ de la hebra naciente y la hebra molde no se produce. En consecuencia, la polimerasa hace una pausa, luego transfiere el extremo $3'$ de la cadena creciente al sitio de la exonucleasa donde la base apareada de manera incorrecta se elimina (Fig. 4-34). Luego, el extremo $3'$ se transfiere nuevamente al sitio de la polimerasa donde esta región se copia correctamente. Las tres polimerasas del DNA de *E. coli* tienen actividad de verificación de la lectura al igual que las dos polimerasas eucariontes de DNA, δ y ϵ , empleadas para la replicación de la mayoría del DNA cromosómico de las células animales. Parece probable que la verificación de la lectura sea indispensable para todas las células con el fin de evitar mutaciones excesivas.

El daño químico y por radiación al DNA pueden provocar mutaciones

El DNA está continuamente sujeto a un bombardeo de reacciones químicas dañinas; se estima que el número de eventos que pueden dañar al DNA en una célula humana individual va de 10^4 a 10^6 por día! Aun si el DNA no se expusiera a productos químicos dañinos, ciertos aspectos de la estructura del DNA son inherentemente inestables. Por ejemplo, el enlace que conecta una base púrica a la desoxirribosa es propenso a la hidrólisis a baja tasa en condiciones fisiológicas, dejando a un azúcar sin una base unida. Así, la información codificante se pierde y esto puede llevar a una mutación durante la replicación del DNA. Las reacciones celulares normales que incluyen el movimiento de electrones a lo largo de la cadena de transporte electrónico de las mitocondrias y la oxidación de los lípidos en los peroxisomas producen varias sustancias químicas que pueden reaccionar con el DNA y dañarlo, incluidos los radicales hidroxilo y el superóxido (O_2^-). Estos también pueden provocar mutaciones que incluyen a las que generan cánceres.

Muchas mutaciones espontáneas son **mutaciones puntuales**, que implican un cambio en un único par de bases de la secuencia de DNA. Esto puede introducir un codón de parada, provocando una mutación *sin sentido*, como se analizó previamente, o un cambio en la secuencia de una proteína codificada, llamada mutación de *sentido equivocado* (*missense*). Las mutaciones *silenciosas* no cambian la secuencia de aminoácidos (p. ej., GAG por GAA; ambas codifican glutamina). Las

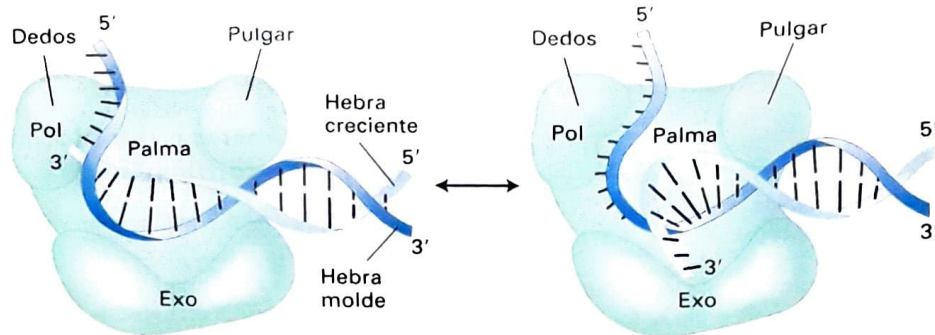


FIGURA 4-34 Verificación de lectura por la DNA polimerasa. Todas las DNA polimerasas tienen una estructura tridimensional similar, que se asemeja a una mano derecha semiabierta. Los "dedos" se unen al segmento de hebra simple de la hebra molde y la actividad catalítica de la polimerasa (Pol) se ubica en la unión entre los dedos y la palma. En tanto se añadan los nucleótidos correctos al extremo 3' de la hebra en crecimiento, permanecerá en el sitio de la polimerasa. La incorporación de una base incorrecta en el extremo 3' provoca

la fusión del extremo recién formado de este dúplex. Como resultado, la polimerasa se detiene y el extremo 3' de la cadena creciente se transfiere al sitio 3' → 5' exonucleasa (Exo) que se encuentra aproximadamente a 3 nm, donde la base desapareada y probablemente otras bases son eliminadas. Posteriormente, el extremo 3' retrocede al sitio de la polimerasa y se reanuda la elongación. (Adaptado de C. M. Joyce y T. T. Steitz, 1995, *J. Bacteriol.* **177**:6321, y S. Bell y T. Baker, 1998, *Cell* **92**:295.)

mutaciones puntuales también pueden presentarse en una secuencia de DNA que no codifique proteínas y funcione en la regulación de la transcripción génica, tal como se analiza en el Capítulo 7. Una de las mutaciones puntuales más frecuentes proviene de la *desaminación* de una base citosina (C), que la convierte en una base uracilo (U). Además, la base común modificada 5-metilcitosina forma timina cuando está desaminada. Si estas alteraciones no se corrigen antes que el DNA se replique, la célula usará la hebra que contiene U o T como molde

para formar un par de bases U·A o T·A, creando de este modo un cambio permanente en la secuencia de DNA (Fig. 4-35).

Los sistemas de reparación por escisión del DNA de alta fidelidad reconocen y reparan el daño

Además de la verificación de la lectura, las células tienen otros sistemas de reparación para prevenir mutaciones debido a los errores de copiado

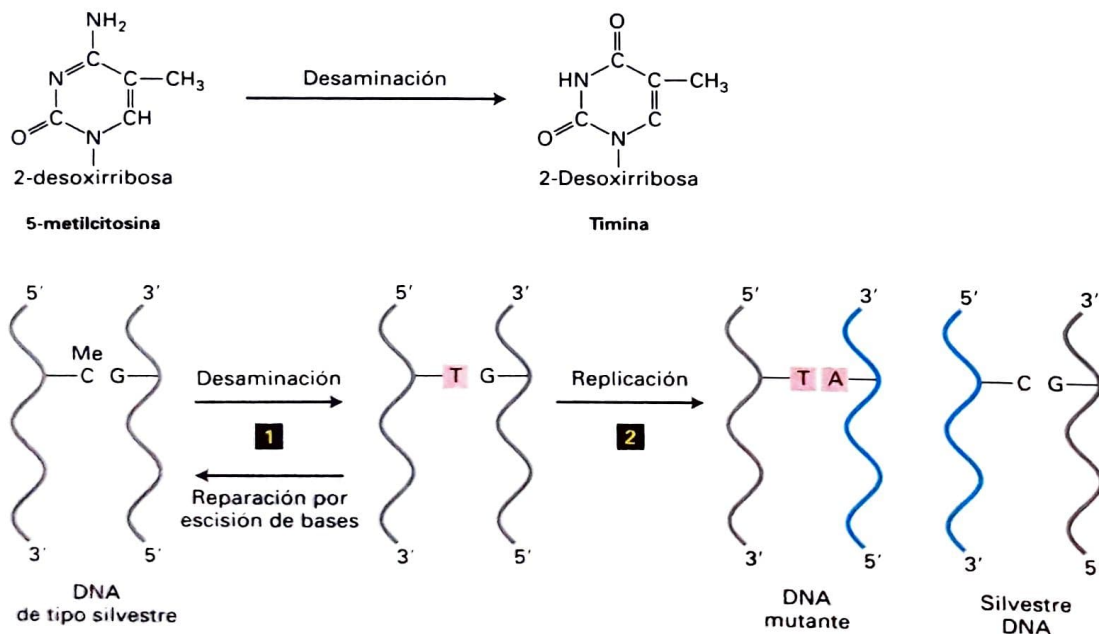


FIGURA 4-35 La desaminación conduce a mutaciones puntuales. Una mutación puntual espontánea puede formarse por desaminación de la 5-metilcitosina (C) para formar timina (T). Si el par de bases T·G resultante no se restaura al par de bases normal C·G por mecanismos de reparación por escisión

de bases (paso 1), llevará a un cambio permanente de secuencia (es decir, una mutación) después de la replicación del DNA (paso 2). Después de un ciclo de replicación, una molécula de DNA hija tendrá el par de bases mutante T·A y la otra tendrá el par de bases silvestre C·G.

y a la exposición a sustancias químicas y a la radiación. Se han estudiado bien varios **sistemas de reparación por escisión** del DNA que operan normalmente con un alto grado de precisión. Estos sistemas se elucidaron por primera vez mediante una combinación de estudios bioquímicos y genéticos en *E. coli*. Los homólogos de las proteínas bacterianas clave existen en los eucariontes, desde las levaduras hasta los seres humanos, lo cual indica que estos mecanismos libres de error surgieron temprano durante la evolución para proteger la integridad del DNA. Cada uno de estos sistemas opera de modo similar —un segmento de la hebra de DNA dañada se escinde y el hueco se llena por acción de una DNA polimerasa y de una DNA ligasa que usan la hebra complementaria de DNA como molde—.

Ahora miraremos con mayor detalle algunos de los mecanismos de reparación del DNA que van desde la reparación de una mutación en una sola base hasta la reparación del DNA a través de ambas hebras. Parte de estas se reparan con gran precisión y otras reparaciones son menos precisas.

La escisión de bases repara apareamientos erróneos de T-G y bases dañadas

En los seres humanos, el tipo de mutación puntual más común es una C por una T, lo que es provocado por la desaminación de la 5-metil C a T (véase la Fig. 4-35). El problema conceptual con una *reparación por escisión de base* en este caso consiste en determinar cuál es la hebra normal y cuál la mutante y reparar esta última de modo tal que se aparee de forma adecuada con la hebra normal. Pero dado que el apareamiento erróneo G-T casi invariablemente es provocado por la conversión química de C a U o de 5-metil C a T, el sistema de reparación evolucionó para eliminar la T y reemplazarla por una C.

El apareamiento incorrecto G-T es reconocido por una DNA glucosilasa que lanza una timina hacia el exterior de la hélice y luego hidroliza el enlace que la conecta al esqueleto de azúcar-fosfato del DNA. Siguiendo esta incisión inicial, una endonucleasa apurínica (AP) corta la hebra de DNA cerca del sitio sin base. La desoxirribosa fosfato que carece de la base, luego es eliminada y reemplazada por una C mediante una DNA polimerasa de reparación especializada que lee la G en la hebra molde (Fig. 4-36).

Como se mencionó previamente, esta reparación debe ocurrir antes de la replicación del DNA porque la base incorrecta de este par, la T, existe naturalmente en el DNA normal. En consecuencia, sería capaz de participar en el apareamiento de bases normal de Watson-Crick durante la replicación, generando una mutación puntual estable que ahora no podrá ser reconocida por los mecanismos de reparación (véase la Fig. 4-35, paso 2).

Las células humanas contienen una batería de glucosilasas cada una de las cuales es específica para un conjunto diferente de bases de DNA modificadas químicamente. Por ejemplo, una remueve la 8-oxiguanina, una forma oxidada de la guanina, lo que permite su reemplazo por una G no dañada, y otras eliminan bases modificadas por agentes alquilantes. Los nucleótidos resultantes de reparación que analizamos recién. También funciona un mecanismo similar para reparar las lesiones que resultan de la *despurinación*, la pérdida de una guanina o de una adenina de un DNA resultante de la hidrólisis del enlace glucosílico entre la desoxirribosa y la base. La despurinación ocurre espontáneamente y es bastante común en los mamíferos. Los sitios resultantes carentes de base, si no se aparean, generan mutaciones durante la replicación del DNA porque no pueden especificar el apareamiento de bases adecuado.

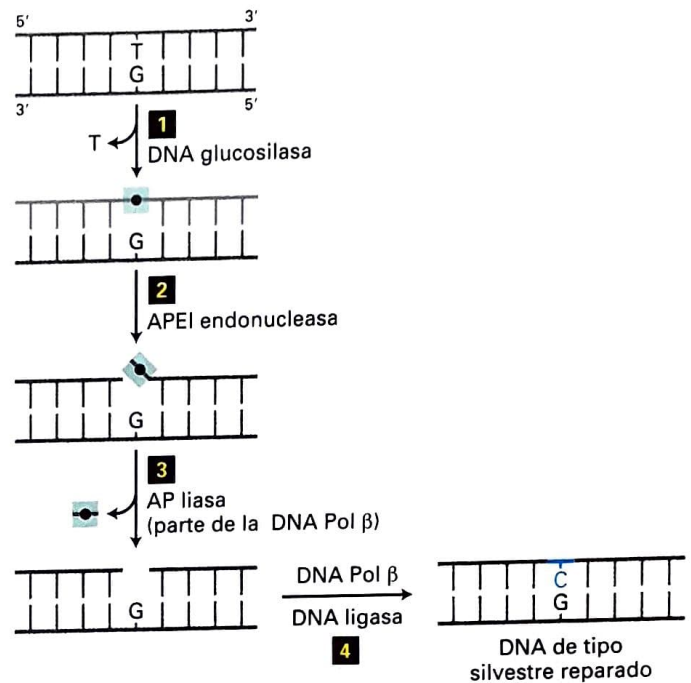


FIGURA 4-36 Reparación por escisión de bases de un apareamiento incorrecto T-G. Una DNA glucosilasa específica para apareamientos incorrectos G-T, formada habitualmente por desaminación de residuos 5-mC (véase la Fig. 4-35) saca la timina fuera de la hélice y luego la corta eliminándola del esqueleto azúcar-fosfato del DNA (paso 1), dejando solamente la desoxirribosa (punto negro). Una endonucleasa específica para el sitio resultante carente de base (endonucleasa apurínica I, APE1) corta luego el esqueleto de DNA (paso 2) y la desoxirribosa fosfato es eliminada por una endonucleasa, la liasa apurínica (AP liasa) asociada con la DNA polimerasa β, una polimerasa especializada de DNA usada en la reparación (paso 3). Este espacio luego es llenado por la DNA Pol β y sellado por una DNA ligasa (paso 4), con lo que se restablece el par de bases original G-C. (Adaptado de O. Schärer, 2003, *Angewandte Chemie* 42:2946.)

La escisión por apareamiento incorrecto repara otros apareamientos incorrectos y pequeñas inserciones y deleciones

Otro proceso también conservado desde las bacterias hasta los seres humanos elimina principalmente los apareamientos de bases incorrectos y las inserciones o deleciones de un nucleótido o de unos pocos nucleótidos introducidos accidentalmente por las DNA polimerasas durante la replicación. Como ocurre con la reparación por escisión de bases de una T en un apareamiento incorrecto T-G, el problema conceptual con una reparación por escisión de un apareamiento incorrecto es determinar cuál es la hebra normal y cuál la mutante en el DNA y reparar la mutante. No se sabe con exactitud el modo en que esto ocurre en las células humanas. Se cree que las proteínas que se unen al segmento apareado incorrectamente en el DNA distinguen las hebras molde e hijas; entonces, el segmento mal apareado de la hebra hija —el que tiene el error de replicación— se escinde y se repara para transformarse en un complemento exacto de la hebra molde (Fig. 4-37). Por oposición a lo que ocurre en la reparación por escisión de bases, la escisión por apareamiento incorrecto ocurre después de la replicación del DNA.



La predisposición a un cáncer de colon denominado cáncer colorrectal hereditario no polipósico resulta de una mutación hereditaria con pérdida de la función en una copia del gen *MLH1* o *MSH2*. Las

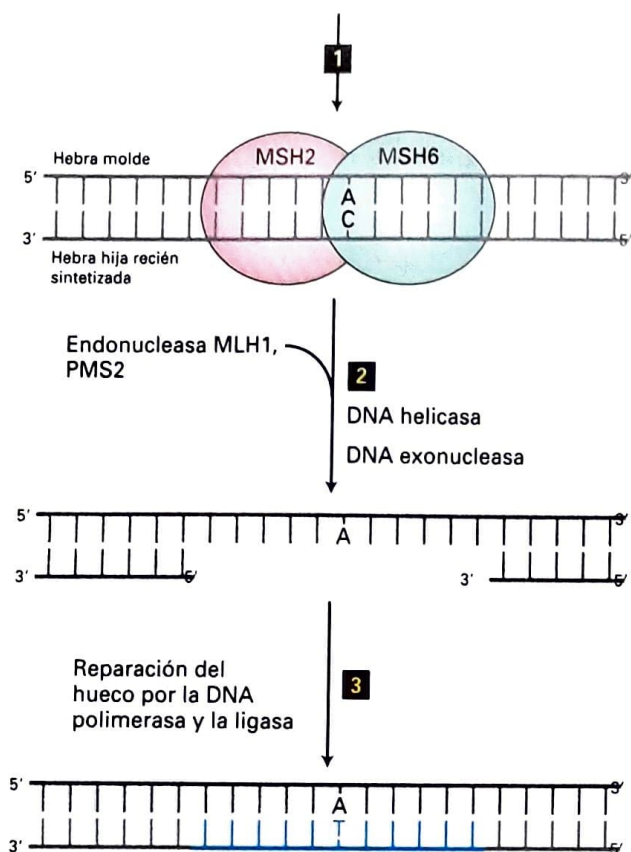


FIGURA 4-37 Reparación por escisión del apareamiento incorrecto en las células humanas. La vía de reparación por escisión del apareamiento incorrecto repara errores introducidos durante la replicación. Un complejo de las proteínas MSH2 y MSH6 (homólogos bacterianos *MutS* 1 y 6) se une a un segmento mal apareado de DNA, de modo tal que permite distinguir entre el molde y las hebras hijas recién sintetizadas (paso 1). Esto desencadena la unión de MLH1 y PMS2 (ambas homólogas de la *MutL* bacteriana). El complejo DNA-proteína resultante se une luego a una endonucleasa que corta la hebra hija recién sintetizada. Luego, una DNA helicasa desenrolla la hélice y una exonucleasa elimina a varios nucleótidos desde el extremo cortado de la hebra hija, incluida la base mal apareada (paso 2). Finalmente, como ocurre con la reparación por escisión de bases, el hueco es llenado luego mediante una DNA polimerasa (Pol δ , en este caso) y sellado por una DNA ligasa (paso 3).

proteínas MSH2 y MLH1 son esenciales para la reparación del apareamiento erróneo del DNA (véase la Fig. 4-37). Las células con al menos una copia funcional de cada uno de estos genes muestran reparación del apareamiento erróneo normal. Sin embargo, las células tumorales con frecuencia surgen a partir de aquellas células que experimentaron una mutación al azar en la segunda copia; cuando ambas copias de un gen son no funcionales, el sistema de reparación del mal apareamiento se pierde. Las mutaciones inactivantes de estos genes también son comunes en las formas no hereditarias de cáncer de colon. ■

La escisión de nucleótidos repara los aductos químicos que distorsionan la forma normal del DNA

Las células emplean la *reparación por escisión de nucleótidos* para fijar regiones de DNA que contienen bases modificadas químicamente, llamadas con frecuencia aductos químicos, que distorsionan localmente la forma normal del DNA. Una clave para este tipo de reparación es la

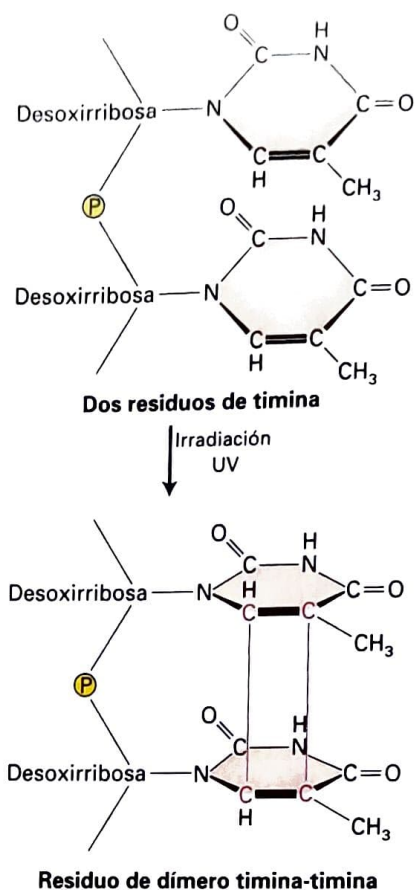


FIGURA 4-38 Formación de dímeros timina-timina. El tipo más común de daño al DNA provocado por la irradiación UV, la formación de dímeros timina-timina, puede repararse por el mecanismo de reparación mediante escisión.

habilidad de ciertas proteínas de deslizarse sobre la superficie de una molécula de DNA de doble hebra mirando en busca de protuberancias u otras irregularidades en la forma de la doble hélice. Por ejemplo, este mecanismo repara los *dímeros timina-timina*, un tipo de daño común provocado por la luz UV (Fig. 4-38); estos dímeros interfieren tanto con la replicación como con la transcripción del DNA.

La Figura 4-39 ilustra el modo en que el sistema de escisión-reparación de nucleótidos repara el DNA dañado. En este proceso de reparación participan alrededor de 30 proteínas, la primera de las cuales se identificó mediante el estudio de defectos en la reparación del DNA en células en cultivo obtenidas de individuos con xeroderma pigmentoso, una enfermedad hereditaria asociada con una predisposición al cáncer. Los individuos con esta enfermedad con frecuencia desarrollan cánceres de piel llamados melanomas y carcinomas espinocelulares si su piel se expone a los rayos UV de la luz solar. Las células de los pacientes afectados carecen de un sistema de reparación por escisión de nucleótidos funcional. Las mutaciones en cualquiera de al menos siete genes diferentes llamados XP-A hasta XP-G llevan a la inactivación de este sistema de reparación y provocan xeroderma pigmentoso; todos producen el mismo fenotipo y tienen las mismas consecuencias. En la actualidad están claros los papeles de la mayoría de estas proteínas XP en la reparación por escisión de los nucleótidos (véase la Fig. 4-39). ■

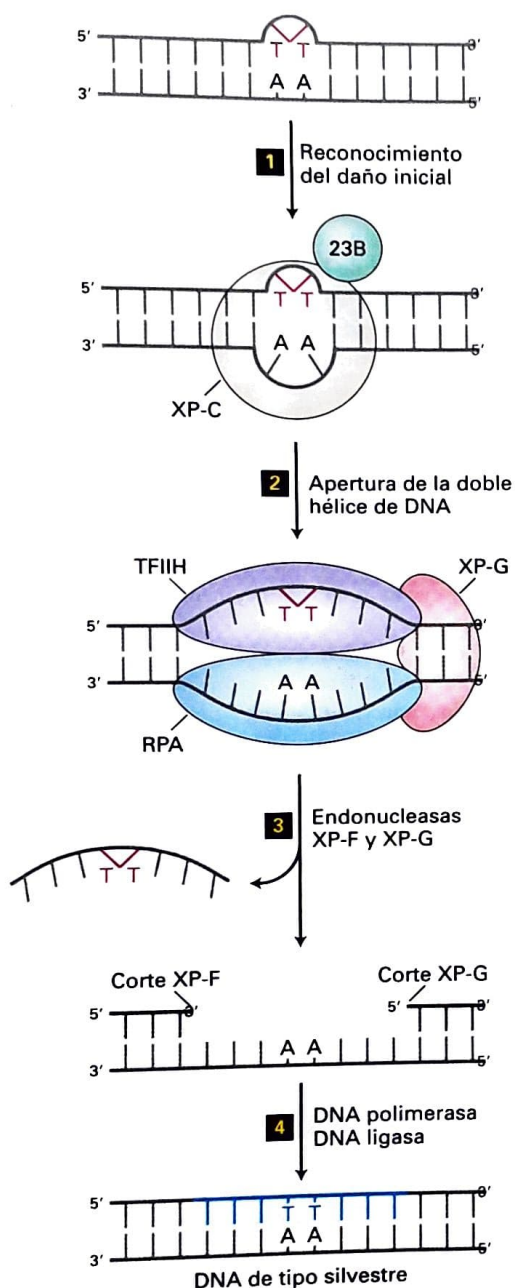


FIGURA 4-39 Reparación por escisión de nucleótidos en las células humanas. Una lesión al DNA que causa distorsión de la doble hélice, como un dímero de timina, inicialmente es reconocida por un complejo de la proteína XP-C (proteína C de xeroderma pigmentoso) y las proteínas 23B (paso 1). Este complejo recluta luego al factor de transcripción TFIIH, cuyas subunidades helicasa, impulsadas por la hidrólisis de ATP, desenrollan parcialmente la doble hélice. Las proteínas XP-G y RPA luego se unen al complejo y desenrollan más lejos la hélice, estabilizándola hasta que se forma una burbuja de ≈ 25 bases (paso 2). Luego, la XP-G (que actúa ahora como una endonucleasa) y la XP-F, (paso 3). Esto libera el fragmento de DNA con las bases dañadas, que es degradado a mononucleótidos. Finalmente, el espacio se llena por acción de la DNA polimerasa, exactamente como en la replicación del DNA, y la muesca restante se sella por acción de la DNA ligasa (paso 4). (Adaptado de J. Hoeijmakers, 2001, *Nature* 411:366, y O. Schärer, 2003, *Angewandte Chemie* 42:2945.)

Notablemente, las cinco subunidades polipeptídicas de TFIIH, un factor de transcripción general necesario para la transcripción de todos los genes (véase la Fig. 7-16), son necesarias también para la reparación por escisión de nucleótidos en las células eucariotes. Dos de estas subunidades tienen homología con las helicasas como se muestra en la Figura 4-39. En la transcripción, la actividad de helicasa de la TFIIH desenrolla la hélice de DNA en el sitio de iniciación permitiendo a la RNA polimerasa iniciar (véase la Fig. 7-16). Parece que la naturaleza ha empleado un sistema de ensamblaje similar para proteínas en dos procesos celulares distintos que requieren la actividad de la helicasa.

El empleo de subunidades compartidas en la transcripción y reparación del DNA puede ayudar a explicar la observación de que el daño al DNA en los eucariotes superiores se repara a una velocidad mucho mayor en las regiones del genoma que se transcriben activamente que en las regiones no transcritas (la llamada reparación acoplada a la transcripción). Dado que solo una pequeña fracción del genoma se transcribe en cualquier célula de los eucariotes superiores, la reparación acoplada a la transcripción dirige de manera eficiente los esfuerzos de reparación a las regiones más críticas. En este sistema, si una RNA polimerasa se detiene en una lesión del DNA (p. ej., un dímero timina-timina) se une a la RNA polimerasa una proteína pequeña, la CSB; esto desencadena la apertura de la hélice de DNA en este punto, el reclutamiento de la TFIIH y las reacciones de los pasos 2 a 4 que se ilustran en la Figura 4-39.

Dos sistemas emplean la recombinación para reparar las roturas del DNA de doble hebra

La radiación ionizante (p. ej., los rayos X y los rayos γ) y algunos fármacos oncológicos hacen que las dobles hebras se rompan en la molécula de DNA. Estas son lesiones particularmente graves porque si la nueva unión de estas dos hebras se realizara en forma incorrecta podría haber reordenamientos cromosómicos importantes que afectarían el funcionamiento de los genes. Por ejemplo, la unión incorrecta podría crear un gen "híbrido" que codificara para la porción N-terminal de una secuencia de aminoácidos fusionada a la porción C-terminal de una secuencia de aminoácidos completamente distinta; o bien, un reordenamiento cromosómico podría llevar al promotor de un gen a la vecindad de una región codificante de otro gen, cambiando el nivel o el tipo celular en el cual este gen se expresara.

Hay dos sistemas que evolucionaron para reparar estas roturas en la doble hebra: la *recombinación homóloga*, que se analizará en la siguiente sección, y la *unión de extremos no homólogos (UENH)*, que es propensa a errores dado que varios nucleótidos se pierden invariablemente en el punto de reparación.

Reparación propensa a errores por unión de extremos no homólogos El mecanismo predominante para la reparación de roturas en la doble cadena de organismos multicelulares implica la nueva unión de los extremos no homólogos de dos moléculas de DNA. Aun si los fragmentos de DNA unidos proviniesen del mismo cromosoma, el proceso de reparación resultaría en la pérdida de varios pares de bases en el punto de unión (Fig. 4-40). La formación de tal delección posiblemente mutagénica es un ejemplo de la manera en la cual la reparación de un daño en el DNA puede introducir mutaciones.

Dado que el movimiento del DNA dentro del núcleo denso en proteínas es relativamente mínimo, los extremos correctos generalmente

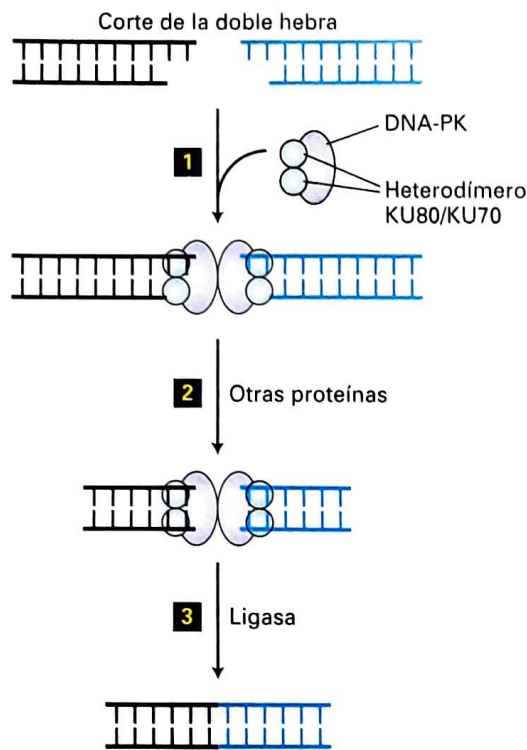


FIGURA 4-40 Unión de extremos no homólogos. Cuando las cromátidas hermanas no están disponibles para ayudar a reparar los cortes de la doble hebra, las secuencias de nucleótidos que no estaban juntas en el DNA intacto quedan ahora una al lado de la otra. Estos extremos de DNA habitualmente provienen del mismo locus cromosómico y cuando se unen se pierden varios pares de bases. En ocasiones, los extremos de diferentes cromosomas se unen en forma accidental. Un complejo de dos proteínas, Ku y una proteína-cinasa dependiente de DNA (DNA-PK) se une a los extremos del corte de doble hebra (paso 1). Después de la formación de una sinapsis, los extremos se procesan más lejos por acción de nucleasas, lo que resulta en la eliminación de unas pocas bases (paso 2) y las dos moléculas de doble hebra se unen (paso 3). Como resultado de ello, se reparan los cortes en la doble hebra pero quedan eliminados varios pares de bases en el sitio del corte. (Adaptado de G. Chu, 1997, *J. Biol. Chem.* **272**:24097; M. Lieber y cols., 1997, *Curr. Opin. Genet. Devel.* **7**:99; y D. van Gant y cols., 2001, *Nature Rev. Genet.* **2**:196.)

vuelven a unirse aunque con pérdida de pares de bases. Sin embargo, en ocasiones, los extremos rotos de diferentes cromosomas se unen entre sí, llevando a la translocación de trozos del DNA de un cromosoma a otro. Estas translocaciones pueden generar genes quiméricos que pueden tener efectos drásticos en el funcionamiento normal de las células, tales como un crecimiento celular descontrolado que es el hito del cáncer (véase la Fig. 6-42). Los efectos devastadores de las roturas de la doble hebra hace que estos sean los “cortes más crueles de todos”, por tomar prestada una frase del *Julio César* de Shakespeare.

La recombinación homóloga puede reparar el daño al DNA y generar diversidad genética

En cierto momento se creyó que la recombinación homóloga era un proceso de reparación menor en las células humanas. Esto cambió cuando se notó que varios cánceres humanos se potencian por mutaciones heredadas en genes esenciales para la reparación por recombinación homóloga (véase el Cuadro 25-1). Por ejemplo, algunas mujeres con susceptibilidad hereditaria al cáncer de mama tienen una muta-

ción en un alelo en alguno de los dos genes *BRCA1* o *BRCA2* que codifican proteínas que participan en este proceso de reparación. La pérdida o la inactivación del segundo alelo inhibe la vía de reparación por recombinación homóloga y tiende así a inducir el cáncer en las células epiteliales de la mama o del ovario. Las levaduras pueden reparar los cortes en la doble hebra inducidos por la irradiación γ . El aislamiento y el análisis de los mutantes sensibles a la radiación (*RAD*) deficientes en este sistema de reparación facilitó el estudio del proceso. Virtualmente todas las proteínas Rad de las levaduras tienen sus homólogos en el genoma humano y las proteínas de los seres humanos y de las levaduras funcionan esencialmente de la misma manera.

Una diversidad de lesiones del DNA que no se reparan mediante los mecanismos que se analizaron previamente pueden repararse por otros mecanismos en los cuales la secuencia dañada se copia a partir de una copia no dañada de la misma secuencia de DNA o una secuencia con una elevada homología con ella en el cromosoma homólogo de los organismos diploides, o en el cromatidio hermano después de la replicación del DNA en los organismos haploides o diploides. Estos mecanismos implican un intercambio de hebras entre moléculas de DNA distintas y que hasta aquí se han mencionado como **recombinación del DNA**.

Además de proporcionar un mecanismo para la reparación del DNA, los mecanismos de recombinación similares generan diversidad genética entre los individuos de una especie, haciendo que ocurra el intercambio de grandes regiones de los cromosomas entre los pares de cromosomas homólogos maternos y paternos durante la *meiosis*, el tipo especial de división celular que genera las células germinales (espermatozoides y óvulos) (Fig. 5-3). De hecho, el intercambio de regiones de los cromosomas homólogos, llamado *entrecruzamiento*, es necesario para que se produzca la adecuada segregación de los cromosomas durante la primera división celular de la meiosis. La meiosis y las consecuencias de la generación de nuevas combinaciones de genes maternos y paternos en un cromosoma mediante recombinación se analizan adicionalmente en el Capítulo 5. Los mecanismos que conducen a la segregación adecuada de los cromosomas durante la meiosis se tratan en el Capítulo 20. Aquí, nos centraremos en los mecanismos moleculares de la recombinación del DNA, resaltando el intercambio de las hebras de DNA entre dos moléculas de DNA recombinantes.

Reparación de una horquilla de replicación colapsada Un ejemplo de reparación del DNA por recombinación es la reparación de una horquilla de replicación “colapsada”. Si no se repara una rotura en el esqueleto fosfodiéster de una hebra de DNA antes de que pase la horquilla de replicación, la porción replicada de los cromosomas hijos se separará cuando la helicasa de replicación llegue a la rotura en la hebra parental de DNA porque no habrá enlaces covalentes entre los dos fragmentos de la hebra parental a cada lado de la muesca. Este proceso se llama *colapso de la horquilla de replicación* (Fig. 4-41, paso 1). Si no se repara, esto generalmente es letal al menos para una célula hija después de la división celular, dada la pérdida de información genética entre la rotura y el final del cromosoma. El proceso de recombinación que repara la rotura de la doble hebra resultante y regenera una horquilla de replicación implica múltiples enzimas y otras proteínas, solo algunas de las cuales mencionaremos aquí.

El primer paso en la reparación de la rotura de la doble cadena es la digestión exonucleolítica de la cadena con su extremo 5' en el extremo roto del DNA, dejando como hebra simple a la cadena que tiene el extremo 3' en la zona del corte (Fig. 4-41, paso 2). La cadena naci-

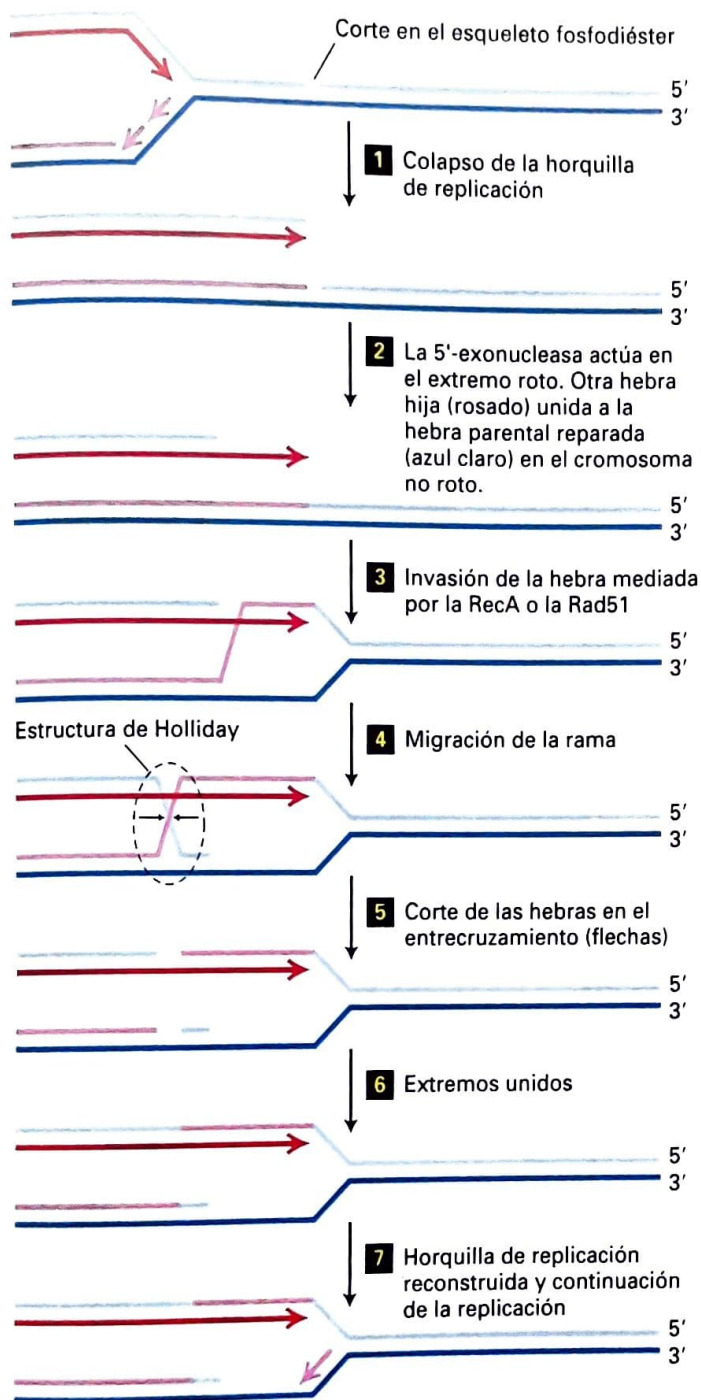


FIGURA 4-41 Reparación por recombinación de la horquilla de replicación colapsada. Las hebras parentales son azul claro y azul oscuro. La hebra hija conductora es rojo oscuro y la hebra hija retardada es rosada. Las líneas diagonales del paso 3 y posteriores representan un enlace fosfodiéster simple entre la hebra de DNA del color correspondiente. Las pequeñas flechas negras después del paso 4 representan el corte de los enlaces fosfodiéster en las hebras de entrecruzamiento del DNA de la estructura de Holliday. Véase <http://www.sheffield.ac.uk/mbb/ruva> en busca de animación de la migración de las ramas catalizada por las proteínas de *E. coli* RuvA y RuvB. Véase el texto para un análisis. (Adaptado de D. L. Nelson y M. M. Cox, 2005, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4th ed., W. H. Freeman and Company.)

4-41, paso 2. Se requiere una proteína crítica para el siguiente paso, la RecA en las bacterias o su homóloga Rad51 en *S. cerevisiae* y otros eucariontes. Múltiples moléculas RecA/Rad51 se unen al DNA de una sola hebra y catalizan su hibridación a una secuencia perfectamente o casi perfectamente complementaria en otra molécula homóloga de DNA bicatenario. La hebra complementaria de este DNA diana de doble hebra (azul oscuro) se desplaza como un bucle de DNA de una sola hebra por encima de la región de hibridación a la hebra invasora (Fig. 4-41, paso 3). Esta *invasión* catalizada por la RecA/Rad51 de un DNA dúplex por una sola hebra complementaria de una de las hebras es clave para el proceso de recombinación. Dado que no se pierden ni se ganan pares de bases en este proceso llamado **invasión de hebras**, no se requiere ingreso de energía.

El paso siguiente es que la región híbrida entre el DNA diana y la hebra invasora se extiende alejándose del corte con proteínas que emplean la energía proveniente de la hidrólisis del ATP. Este proceso se llama *migración de la rama* (Fig. 4-41, paso 4), porque la posición en la que la hebra de DNA diana cruza de una hebra complementaria (azul oscuro) a su complemento en la molécula de DNA rota (rojo), es decir, la línea diagonal rosada después del paso 3, se denomina una *rama* en la estructura del DNA. En este diagrama, las líneas diagonales representan solo al enlace fosfodiéster. Los modelos moleculares y otros estudios muestran que la primera base a cada lado de la rama está apareada mediante otra base a un nucleótido complementario. A medida que esta rama *migra* hacia la izquierda, el número de pares de bases permanece constante; se forma un nuevo par de bases con la hebra invasora (en rojo) apareándose por la pérdida de un par de bases con la hebra parental (azul).

Cuando la región del híbrido se extiende más allá del extremo 5' de la hebra rota (azul claro), la hebra de DNA parental simple generada (azul claro) se aparea por las bases con la región complementaria de la otra hebra parental (azul oscuro) que se transforma en una molécula de una sola hebra a medida que la rama migra hacia la izquierda (Fig. 4-41, paso 4). La estructura resultante se llama, **estructura de Holliday**, por Robin Holliday, el genetista que propuso por primera vez que éste era un intermediario en la recombinación genética. Nuevamente las líneas diagonales del diagrama del paso 4 representan enlaces fosfodiéster sencillos y todas las bases de la estructura de Holliday están apareadas con bases complementarias en las hebras parentales. La escisión de los enlaces fosfodiéster que se *entrecruzan* de una hebra parental a la otra (paso 5) y el enlace de los extremos 5' y 3' apareados por las bases a las mismas hebras parentales (paso 6) dan como resultado la generación de una estructura similar a una horquilla de replicación. Al volver a unir las proteínas de la horquilla de replicación, resulta una extensión de la hebra conductora más allá del punto del corte original en la hebra y la reiniciación de la síntesis de la cadena retardada (paso 7), y se genera de este modo una horquilla de replicación. El proceso global permite que la cadena superior unida en la molécula inferior después del paso 2 sirva como molde para la extensión de la cadena conductora en el paso 7.

Reparación de corte en el DNA de hebra doble por recombinación homóloga Un mecanismo similar llamado **recombinación homóloga** puede reparar un corte en una hebra doble de un cromosoma y también intercambiar segmentos grandes de dos moléculas de DNA de doble hebra (Fig. 4-42). En primer lugar, los extremos cortados de la molécula de DNA son eliminados por exonucleasas que dejan una región del DNA de una sola hebra con un extremo 3' terminal (paso

te retardada (rosado) se aparea por sus bases con la cadena parental que no está cortada (azul oscuro), se liga a la porción sin replicar del cromosoma parental (azul claro), según se muestra en la Figura

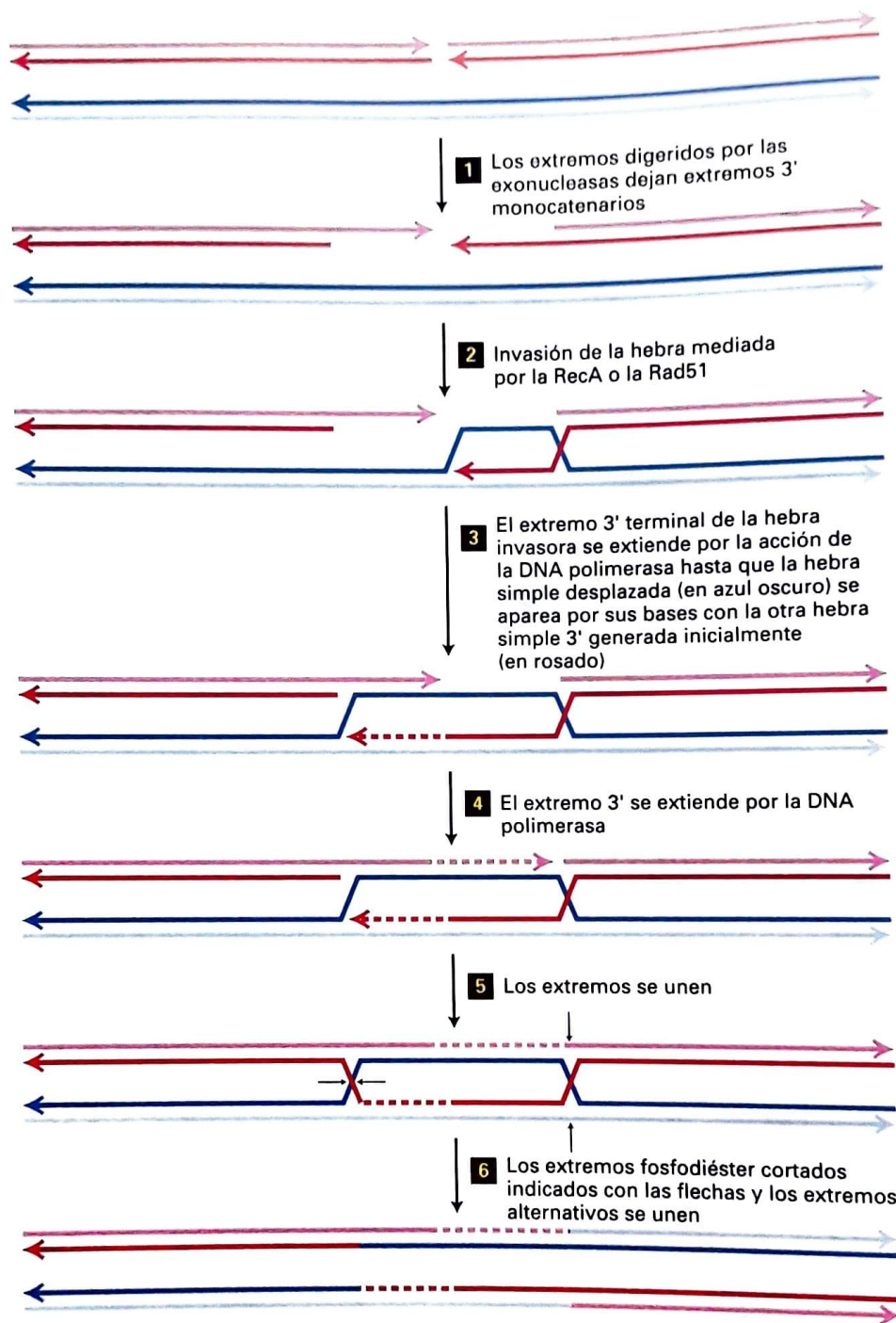


FIGURA 4-42 Reparación por corte del DNA de doble hebra mediante recombinación homóloga. Por simplicidad, cada DNA de doble hélice está representado por dos líneas paralelas con las polaridades de las hebras indicadas por las cabezas de las flechas en los extremos 3'. La molécula de la parte superior tiene un corte en la doble hebra. Nótese que en el diagrama de

la molécula de DNA superior, la hebra con su extremo 3' terminal a la derecha se encuentra arriba, mientras que en el diagrama de la molécula de DNA de la parte inferior, esta hebra se dibuja en la parte inferior. Véase el texto para un análisis. (Adaptado de T. L. Orr-Weaver y J. W. Szostak, 1985, *Microbiol. Rev.* **49**: 33.)

1). La RecA de las bacterias y la Rad51 de los eucariontes cataliza luego la invasión de la hebra de uno de estos extremos 3' terminales a la región homóloga de un cromosoma homólogo según se analizó previamente para la reparación de una horquilla de replicación colapsada (paso **2**). El extremo 3' de la hebra de DNA invasora luego se extiende por acción de una DNA polimerasa desplazando la he-

bra parental como un bucle de DNA de hebra simple que aumenta de tamaño (azul oscuro) (paso **3**). Cuando el bucle se extiende a una secuencia complementaria al otro extremo cortado del DNA (el fragmento que se encuentra a la izquierda, después del paso **1**), las secuencias complementarias se aparean con sus bases (diagrama que sigue al paso **3**). Este extremo 3' luego se extiende por acción de una

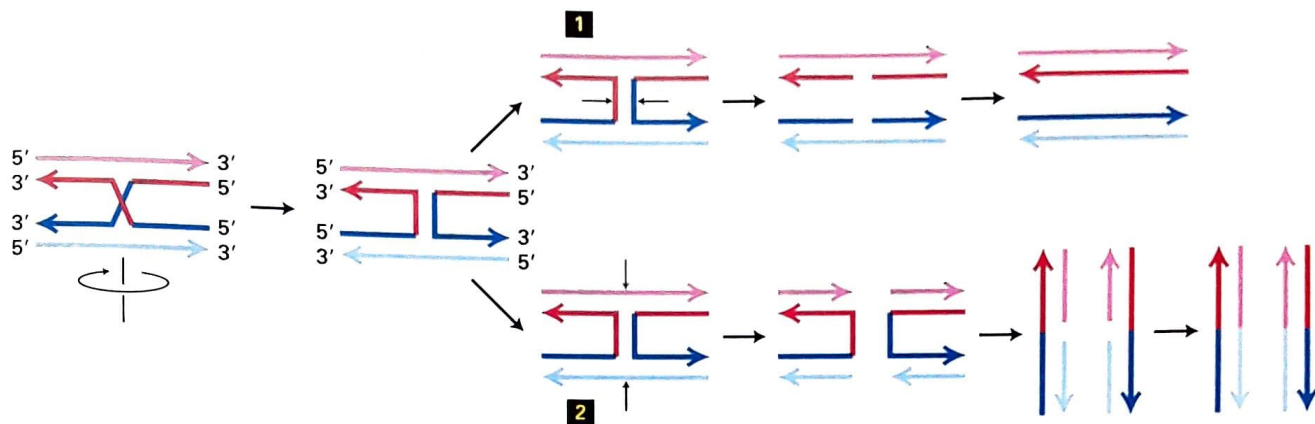


FIGURA 4-43 Resolución alternativa de una estructura de Holliday. Las líneas diagonales verticales representan un enlace fosfodiéster simple. Es más sencillo representar el proceso rotando el diagrama de la molécula inferior 180°, de modo tal que las moléculas en la parte superior e inferior tengan la misma orientación de las hebras. Al cortar los enlaces como se muestra en **1** y

unir los extremos como está indicado, se regeneran los cromosomas originales. Al cortar las hebras como se muestra en **2** y volverlas a unir como se muestra en la parte inferior, se generan los cromosomas recombinantes. Véase <http://engels.genetics.wisc.edu/Holliday/holliday3D.html> para una animación tridimensional de la estructura de Holliday y su resolución.

DNA polimerasa empleando el bucle desplazado de hebra simple del DNA parental (azul oscuro) como molde (paso **4**).

Luego, los nuevos extremos 3' se unen (paso **5**) a los extremos 5' digeridos por las exonucleasas. Esto genera dos estructuras de Holliday en las moléculas apareadas (paso **5**). La migración de la rama de estas estructuras de Holliday puede ocurrir en cualquier dirección (no se ilustra). Finalmente, la escisión de las hebras en las posiciones que muestran las flechas y la unión de los extremos alternativos 5' y 3' en cada estructura de Holliday que se escinde genera dos cromosomas recombinantes que contienen DNA de una molécula de DNA parental en un lado del punto de corte (hebras rosada y roja) y el DNA de la otra molécula parental sobre el otro lado del punto de corte inicial (azul claro y azul oscuro) (paso **6**). La región en la inmediata vecindad del punto de corte inicial forma un *heterodúplex* en el cual una hebra de un padre se aparea por sus bases a la hebra complementaria del otro padre (hebra rosada o roja apareada por sus bases a la hebra azul claro o azul oscuro). Los errores en los apareamientos de bases entre las dos hebras parentales habitualmente se reparan mediante mecanismos analizados previamente para generar un par de bases complementarias. En el proceso, las diferencias de secuencias entre las dos hebras parentales se pierden, un proceso conocido como **conversión génica**.

La Figura 4-43 diagrama el modo en que la escisión de uno u otro par de hebras en la unión de cuatro hebras de la estructura de Holliday genera moléculas parentales o recombinantes. Este proceso, denominado **resolución** de la estructura de Holliday, separa las moléculas de DNA unidas inicialmente por la invasión de hebras catalizadas por RecA/Rad51. Cada estructura de Holliday en el intermediario de acuerdo con la Figura 4-42, paso **5**, puede ser escindida y vuelta a unir de las dos maneras posibles que se muestran con los dos conjuntos de pequeñas flechas negras de la Figura 4-43. En consecuencia, hay cuatro productos posibles del proceso de recombinación que se muestran en la Figura 4-42. Dos de estos regeneran los cromosomas parentales (con excepción de la región heterodúplex en el punto de corte reparada en la secuencia de una hebra parental o la otra [conversión génica]). Los otros dos posibles productos generan cromosomas recombinantes como se muestra en la Figura 4-42.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 4.6

Reparación y recombinación del DNA

- Los cambios en la secuencia del DNA resultan de errores de copiado y de los efectos de varios agentes físicos y químicos.
- Muchos errores de copia que ocurren durante la replicación del DNA se corrigen por la función de verificación de lectura de las DNA polimerasas, que reconocen las bases apareadas en forma incorrecta (mal apareadas) en el extremo 3' terminal de la hebra creciente y luego los eliminan por una actividad exonucleasa 3' → 5' inherente (véase la Fig. 4-34).
- Las células eucariontes tienen tres sistemas de reparación por escisión para corregir las bases incorrectamente apareadas y para eliminar los dímeros timina-timina inducidos por la UV o grandes aductos químicos del DNA. La reparación por escisión de bases, la reparación del apareamiento incorrecto y la reparación por escisión de nucleótidos operan con alta precisión y, por lo general, no introducen errores.
- La reparación de los cortes de la doble hebra por la vía de la unión de extremos no homólogos puede unir segmentos de DNA de diferentes cromosomas formando posiblemente una translocación oncogénica. El mecanismo de reparación produce también una pequeña delección, aun cuando se hayan unido segmentos del mismo cromosoma.
- La reparación sin errores de cortes en la doble hebra de DNA se lleva a cabo por la recombinación homóloga empleando como molde la cromátida hermana no dañada.
- Los efectos heredados en la vía de reparación por escisión de los nucleótidos, como ocurre en los individuos con xeroderma pigmentoso, los predisponen al cáncer de piel. El cáncer de colon hereditario con frecuencia se asocia con formas mutantes de las proteínas esenciales para la vía de reparación del apareamiento incorrecto. Los defectos en la reparación por recombinación de homólogos se asocian con la herencia de un alelo mutante del gen *BRCA-1* o *BRCA-2* y resultan en la predisposición al cáncer de mama y útero.

4.7 Los virus: los parásitos del sistema genético celular

Los **virus** son parásitos intracelulares obligados. No pueden reproducirse por sí mismos y deben comandar la maquinaria celular del huésped para que sintetice las proteínas virales y en algunos casos replique el genoma del virus. Los virus de RNA que habitualmente se replican en el citoplasma de la célula huésped tienen un genoma de RNA y los virus de DNA, que por lo común se replican en el núcleo de la célula huésped, tienen un genoma de DNA (véase la Fig. 4-1). Los genomas virales pueden ser de una sola hebra o de doble hebra, lo que depende del tipo específico de virus. Una partícula viral infecciosa completa llamada **virión** consiste en el ácido nucleico y una cubierta proteica externa que tanto protege al ácido nucleico del virus como funciona en el proceso de infección a la célula huésped. Los virus más simples contienen solo suficiente RNA o DNA para codificar cuatro proteínas; los más complejos pueden codificar ≈ 200 proteínas. Además de su importancia obvia como causa de enfermedad, los virus son de gran utilidad como herramientas de investigación en el estudio de los procesos biológicos básicos, como los que analizaremos en este capítulo.

La mayoría de los rangos de hospedadores virales son estrechos

La superficie de un virión contiene muchas copias de un tipo de proteína que se une específicamente a múltiples copias de una proteína receptora sobre una célula huésped. Esta interacción determina el *rango de hospedador* (el grupo de tipos celulares que un virus puede infectar) y comienza el proceso infeccioso. La mayoría de los virus tienen un espectro de huéspedes bastante limitado.

Un virus que infecta solo bacterias se llama **bacteriófago**, o simplemente *fago*. Los virus que infectan células vegetales o animales se conocen como virus vegetales o virus animales. Unos pocos virus pueden desarrollarse tanto en plantas como en animales y en los insectos que se alimentan de ellos. Los insectos con alta movilidad sirven como vectores para transferir estos virus entre los animales o plantas huéspedes susceptibles. Los huéspedes de amplio espectro también son característicos de algunos virus estrictamente animales como el virus de la estomatitis vesiculada que se desarrolla en insectos vectores y en muchos tipos diferentes de mamíferos. Sin embargo, la mayoría de los virus animales no atraviesan los filos y algunos (p. ej., el poliovirus) infecta solo a las especies muy relacionadas como los primates. El espectro celular de huéspedes de algunos virus animales está restringido adicionalmente a un número limitado de tipos celulares porque solo estas células tienen receptores de superficie adecuados a los cuales pueden unirse los viriones. Un ejemplo es el poliovirus, que solo infecta las células intestinales y, lamentablemente, las neuronas motoras de la médula espinal provocando parálisis. Otro es el HIV-1, analizado con más detalle más adelante, que infecta células esenciales para la respuesta inmune llamadas linfocitos T CD4⁺, provocando sida (véase el Cap. 23) y ciertas neuronas y otras células del sistema nervioso central llamadas células de la glía.

Las cápsides virales son disposiciones regulares de uno o unos pocos tipos de proteínas

El ácido nucleico de un virión está encerrado dentro de una cubierta proteica o **cápside**, compuesta por múltiples copias de una proteína o de unas pocas proteínas diferentes, cada una de las cuales está codifi-

cada por un gen individual del virus. Dada su estructura, un virus es capaz de codificar toda la información para sintetizar una cápside relativamente grande en un pequeño número de genes. Este uso eficiente de la información genética es importante, dado que solo una cantidad limitada de DNA o RNA y, por lo tanto, un número limitado de genes, puede encajar en una cápside de un virión. La cápside más el ácido nucleico que encierra se llama **nucleocápside**.

La naturaleza ha encontrado dos formas básicas de disponer las múltiples subunidades proteicas en la cápside y el genoma viral en una nucleocápside. En algunos virus, las múltiples copias de una proteína única de cubierta forman una estructura *helicoidal* que encierra y protege el RNA o DNA del virus, el cual se encuentra en un surco helicoidal dentro del tubo de la proteína. Los virus con esta nucleocápside helicoidal como el virus mosaico del tabaco tienen la forma de un bastón (Fig. 4-44a). El otro tipo estructural principal se basa en el *icosaedro*, un objeto aproximadamente esférico sólido construido con 20 caras idénticas, cada una de las cuales es un triángulo equilátero (Fig. 4-44b). Durante la infección, algunos virus icosaédricos interactúan con receptores de la superficie del huésped mediante surcos que se encuentran entre las subunidades de la cápside y otros interactúan a través de proteínas fibroides que se extienden desde la nucleocápside.

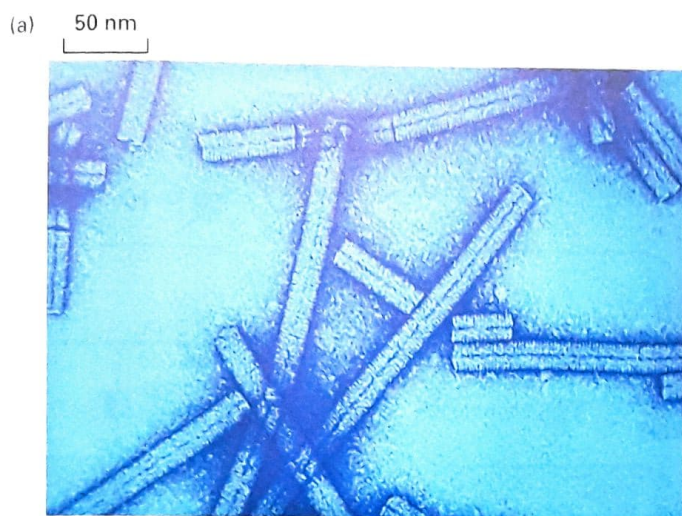
En muchos bacteriófagos de DNA, el DNA del virus se localiza dentro de una "cabeza" icosaédrica que se encuentra unida a una "cola" con forma de bastón. Durante la infección, las proteínas del virus que se encuentran en el extremo de la cola se unen a los receptores de la célula huésped y luego el DNA del virus pasa hacia abajo en la cola hasta el interior del citoplasma de la célula huésped (Fig. 4-44c).

En algunos virus la disposición simétrica de la nucleocápside está cubierta por una membrana externa o **envoltura** que consiste principalmente en una bicapa fosfolipídica pero también contiene uno o dos tipos de glucoproteínas codificadas por el virus (Fig. 4-44d). Los fosfolípidos de la envoltura viral son similares a los de la membrana plasmática de una célula huésped infectada. La envoltura viral, de hecho, deriva por gemación de la membrana pero contiene muchas glucoproteínas virales como analizaremos en breve.

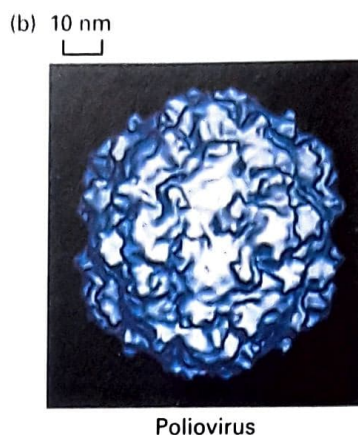
Los virus pueden clonarse y contarse en ensayos en placa

El número de partículas virales infecciosas de una muestra puede ser cuantificado mediante un **ensayo de placa**. Este ensayo se lleva a cabo al cultivar una muestra diluida de partículas del virus sobre una placa cubierta con células del huésped y luego contando el número de lesiones locales denominadas *placas* que se desarrollan (Fig. 4-45). Se desarrolla una placa sobre la caja de cultivo donde quiera que un virión individual infecte inicialmente a una única célula. El virus se replica en esta célula huésped inicial y luego lisa (rompe) a la célula, liberando muchos viriones de su progenie que infectarán a las células vecinas en la caja de cultivo. Después de unos pocos ciclos de infección de este tipo, se lisarán suficientes células como para producir un área clara visible llamada placa sobre el fondo de células no infectadas remanentes.

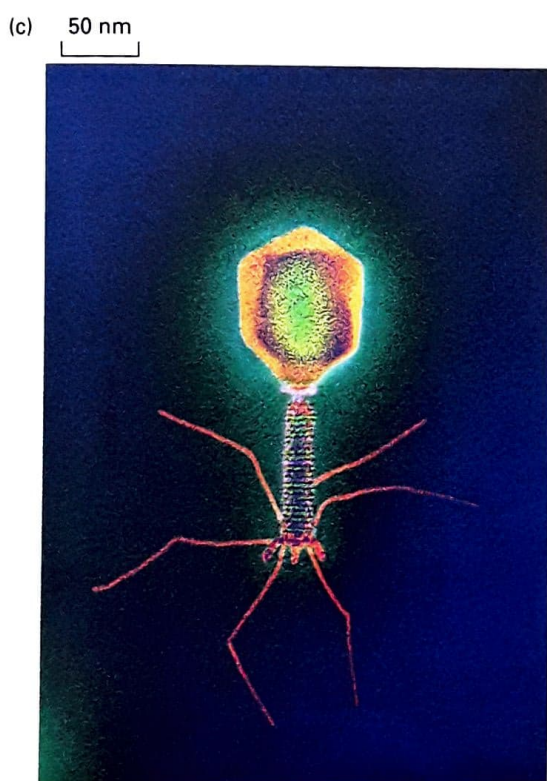
Dado que todos los viriones de la progenie de una placa derivan de un único virus parental, constituyen un **clon** del virus. Este tipo de ensayo de placa es de uso estándar para los virus de bacterias y de animales. Los virus vegetales pueden determinarse de modo similar contando lesiones locales en las hojas de las plantas inoculadas con virus. El análisis de los mutantes virales que comúnmente se aíslan por ensayos de



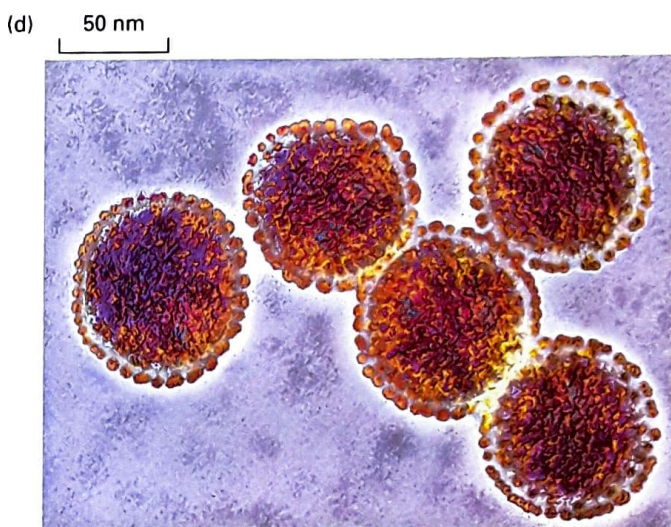
Virus del mosaico del tabaco



Poliovirus



Bacteriófago T4



Virus de la gripe aviar

FIGURA 4-44 Estructuras de los viriones. (a) Virus mosaico del tabaco helicoidal. (b) Virus icosadrico pequeño. Un icosaedro está compuesto por 20 caras triangulares equiláteras. El ejemplo mostrado es un poliovirus. En el poliovirus, cada cara está construida por tres capsómeros marcados en rojo. Los números muestran de qué manera cinco capsómeros se asocian en cada uno de los doce vértices del icosaedro. (c) Bacteriófago T4. (d) Virus de la gripe, ejemplo de un virus con envoltura. (Parte [a]: O. Bradfute, Peter Arnold/ Science Photo Library; Parte [b], cortesía de T. S. Baker; Parte [c]: Dept. of Microbiology, Biozentrum/Science Photo Library; Parte [d]: James Cavallini/Photo Researchers, Inc.)

placa, ha contribuido extensamente a nuestro entendimiento actual de los procesos celulares moleculares.

Los ciclos líticos de crecimiento virales conducen a la muerte de las células huésped

Si bien los detalles varían en los diferentes tipos de virus, los que muestran un ciclo lítico de crecimiento proceden a través de las siguientes etapas generales:

1. Adsorción— El virión interactúa con una célula huésped al unir múltiples copias de la proteína de la cápside a receptores específicos sobre la superficie celular.

2. Penetración— El genoma viral atraviesa la membrana plasmática. En algunos virus, las proteínas virales empaquetadas dentro de la cápside también entran a la célula huésped.

3. Replicación— Los mRNA virales se producen con ayuda de la maquinaria de transcripción de la célula huésped (virus de DNA) o por enzimas del virus (virus de RNA). Para ambos tipos de virus, los mRNA virales son traducidos por la maquinaria de traducción de la célula huésped. La producción de múltiples copias del genoma viral se lleva a cabo por proteínas virales solas o con ayuda de las proteínas de la célula huésped.

4. Ensamblaje— Las proteínas virales y los genomas replicados se asocian para formar los viriones de la progenie.

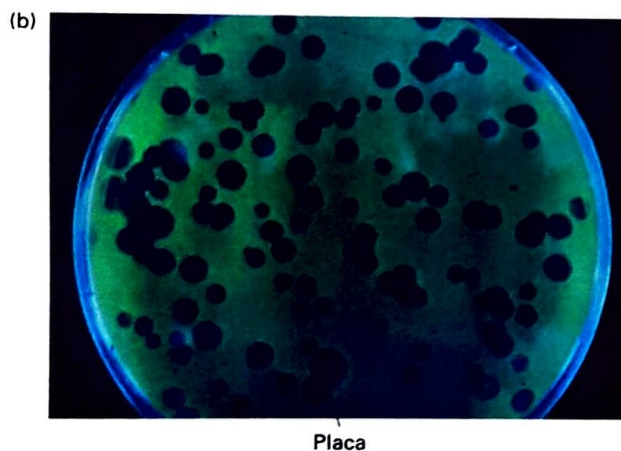
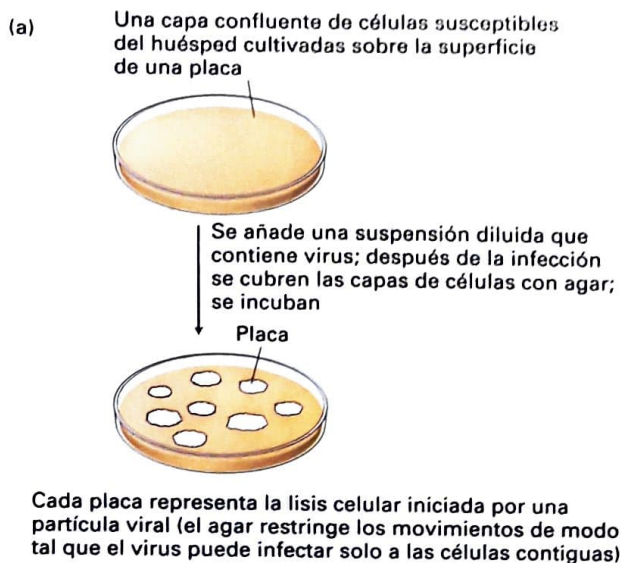


FIGURA EXPERIMENTAL 4-45 Ensayo de placa. El ensayo de placa determina el número de partículas infecciosas en una suspensión viral. (a) Cada lesión o placa, donde un virión infectó inicialmente una célula individual, constituye un clon viral puro. (b) Las placas en un campo de bacterias *Pseudomonas fluorescens* hechas por acción del bacteriófago $\Phi S1$. (Parte [b], cortesía del Dr. Pierre ROSSI, Ecole Polytechnique fédérale de Lausanne (LBE-EPFL))

5. Liberación— La célula infectada se rompe repentinamente (lisis) liberando simultáneamente todos los viriones recién formados o se desintegra gradualmente liberando lentamente los viriones. Ambas situaciones terminan con la muerte de la célula infectada.

La Figura 4-46 ilustra el ciclo lítico del bacteriófago T4, un virus de DNA sin cubierta que infecta a *E. coli*. Las proteínas de la cápside viral por lo general se sintetizan en grandes cantidades porque se requieren muchas copias de ellas para el ensamblaje de cada virión de la progenie. En cada célula infectada, entre 100 y 200 viriones de la progenie T4 se producen y se liberan por lisis.

El ciclo lítico es algo más complicado para los virus de DNA que infectan las células eucariotas. En la mayoría de estos virus, el DNA genómico se transporta (con algunas proteínas asociadas) al interior del núcleo celular. Una vez dentro de este, el DNA del virus se transcribe al RNA por la maquinaria de transcripción del huésped. El procesamien-

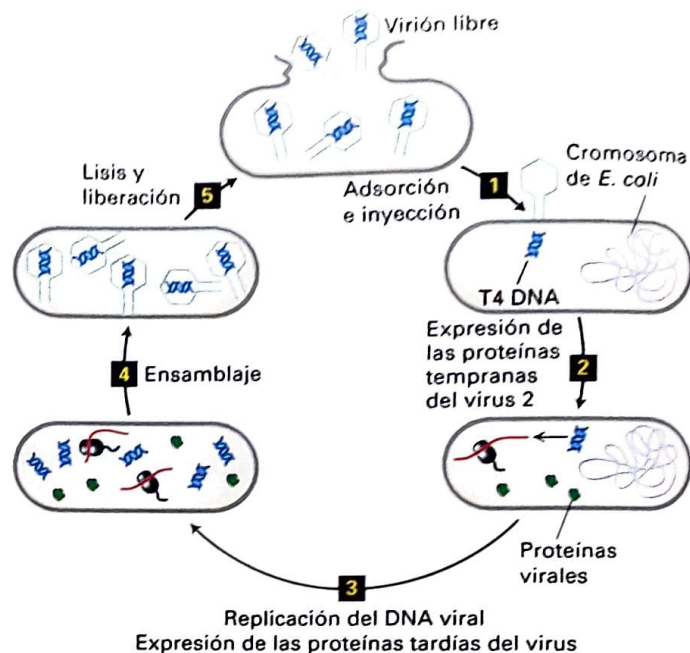


FIGURA 4-46 Ciclo lítico de replicación de un virus sin cubierta, bacteriano. El bacteriófago T4 de *E. coli* tiene un genoma de DNA de doble hebra y carece de envoltura de membrana. Después de que las proteínas de la cubierta viral que se encuentran en el extremo de la cola de T4 interactúan con las proteínas receptores específicas del exterior de la célula huésped, el genoma del virus se inyecta al huésped (paso 1). Las enzimas de la célula huésped luego transcriben los genes "tempranos" del virus a los mRNA y posteriormente traducen éstos a las proteínas "tempranas" del virus (paso 2). Las proteínas tempranas replican el DNA viral e inducen la expresión de las proteínas "tardías" del virus por enzimas de la célula huésped (paso 3). Las proteínas tardías del virus incluyen las de la cápside y proteínas de ensamble y enzimas que degradan el DNA de la célula huésped, lo que proporciona nucleótidos para la síntesis de más DNA viral. Los viriones de la progenie se ensamblan en la célula (paso 4) y se liberan (paso 5) cuando las proteínas del virus lisan la célula. Los virus recién liberados inician otro ciclo infeccioso en otras células huésped.

to del transcrito primario del RNA viral por las enzimas de la célula huésped resulta en un mRNA viral que es transportado al citoplasma y traducido a proteínas virales por los ribosomas de la célula huésped, el tRNA y los factores de traducción. Luego, las proteínas virales son transportadas nuevamente al núcleo donde parte de ellas replican el DNA viral directamente o dirigen las proteínas celulares para que repliquen este DNA, como en el caso del SV40 que se analizó en la sección previa. El ensamblaje de las proteínas de la cápside del virus con el DNA viral recién replicado se produce en el núcleo, lo cual resulta en miles a cientos de miles de viriones de la progenie.

La mayoría de los virus vegetales y animales con un genoma de RNA no requieren la función nuclear para la replicación lítica. En parte de estos virus, una enzima codificada por el virus que entra al huésped durante la penetración, transcribe el RNA genómico a mRNA dentro del citoplasma celular. El mRNA se traduce directamente a proteínas virales por acción de la maquinaria de traducción de la célula huésped. Luego, una o más de estas proteínas producen copias adicionales del genoma de RNA del virus. Finalmente, los genomas de la progenie se ensamblan con las proteínas de la cápside recién sintetizada a viriones de la progenie dentro del citoplasma.

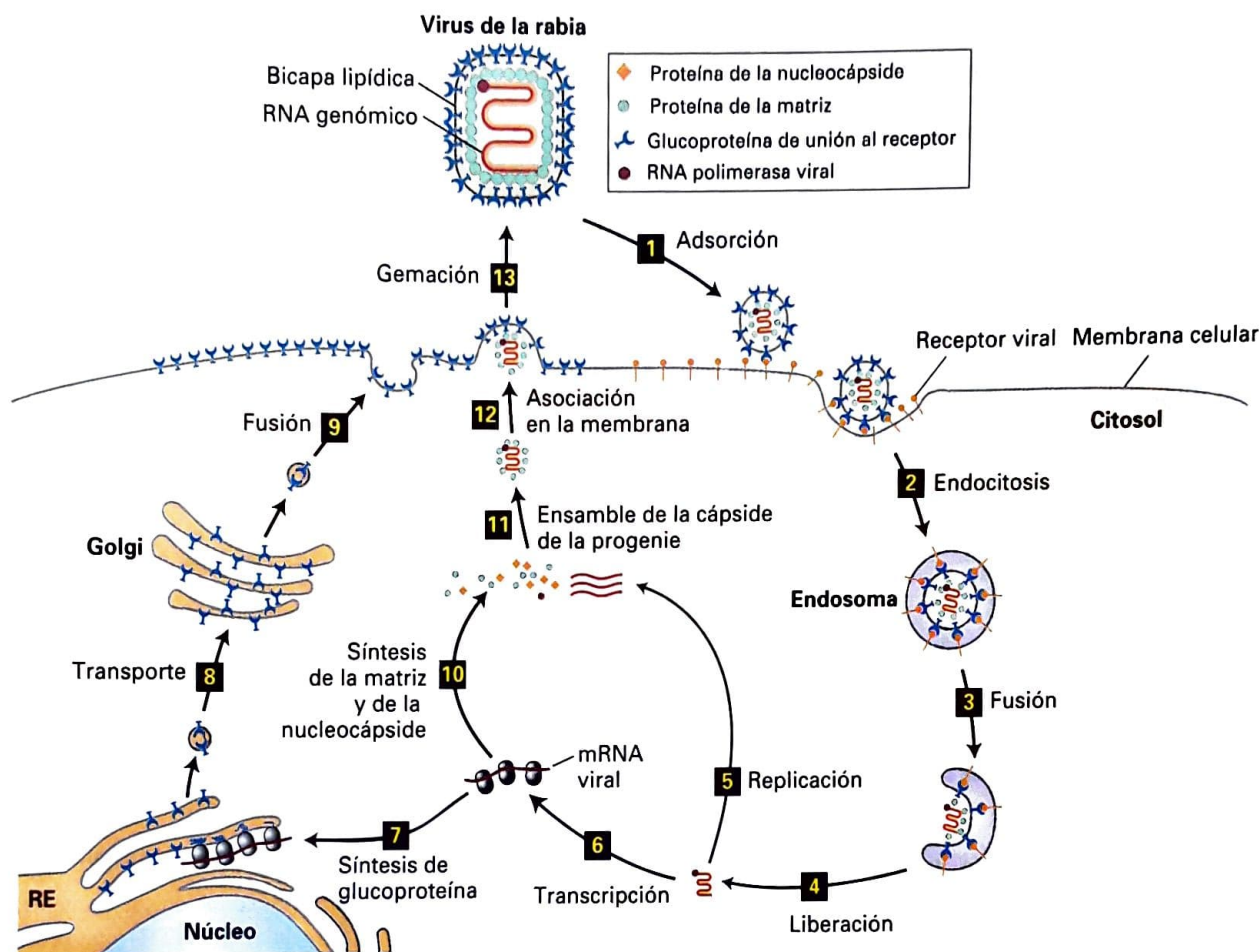


FIGURA 4-47 Ciclo lítico de replicación de un virus animal con cubierta.

El virus de la rabia es un virus con cubierta con un genoma de RNA de una sola hebra. Los componentes estructurales de este virus se muestran en la parte superior. Después de que un virión se adsorbe a múltiples copias de una proteína de membrana huésped específica (paso 1), la célula lo engloba en un endosoma (paso 2). Una proteína celular de la membrana del endosoma bombea iones H^+ del citosol al interior del endosoma. La disminución resultante en el pH del endosoma induce un cambio de conformación en la glucoproteína viral, llevando a la fusión de la envoltura viral con la bicapa lipídica de la membrana del endosoma y a la liberación de la nucleocápside al citosol (pasos 3 y 4). La RNA polimerasa viral usa ribonucleósido trifosfatos del citosol para replicar el genoma RNA del virus (paso 5) y para sintetizar mRNA virales (paso 6). Uno de los mRNA del virus codifica las glucoproteínas transmembrana que se insertan en la membrana del retículo endoplasmático (RE) a medida que se

sintetiza sobre los ribosomas unidos al RE (paso 7). Se añade el hidrato de carbono al dominio grande plegado en el interior de la luz del RE y se modifica a medida que la membrana y la glucoproteína asociada pasa a través del aparato de Golgi (paso 8). Las vesículas con la glucoproteína madura se fusionan con la membrana plasmática del huésped, depositando la glucoproteína viral sobre la superficie de la célula con el dominio grande que se une al receptor fuera de la célula (paso 9). Mientras tanto, otros mRNA virales son traducidos sobre los ribosomas de la célula huésped a la proteína de la nucleocápside, la proteína de la matriz y la RNA polimerasa viral (paso 10). Estas proteínas se ensamblan con el RNA genómico viral replicado (rojo brillante) dentro de las nucleocápsides de la progenie (paso 11), que se asocia entonces con el dominio citosólico de las glucoproteínas virales que atraviesan la membrana en el interior de la membrana plasmática (paso 12). La membrana plasmática se pliega alrededor de la nucleocápside formando un "brote" que finalmente se libera (paso 13).

Después de que se ha completado la síntesis de cientos a cientos de miles de nuevos viriones, dependiendo del tipo de virus y de célula huésped, la mayoría de las bacterias infectadas y algunas células animales y vegetales se lisan, liberando todos los viriones simultáneamente. En muchas infecciones virales vegetales y animales, sin embargo, no ocurre un evento lítico aislado; en lugar de ello, la célula huésped muerta libera a los viriones a medida que se desintegra gradualmente.

Como se indicó con anterioridad, los virus animales con envoltura están rodeados por una bicapa de fosfolípidos externa que deriva de la membrana plasmática de las células huésped y contiene abundantes glucoproteínas virales. El proceso de adsorción y liberación de los virus recubiertos difiere sustancialmente de estos procesos para

los virus sin cubierta. Para ilustrar la replicación lítica de los virus con cubierta consideraremos el virus de la rabia cuya nucleocápside consiste en un genoma de RNA de una sola hebra rodeado por múltiples copias de proteínas de la nucleocápside. Al igual que otros virus líticos de RNA, los viriones de la rabia se replican en el citoplasma y no requieren enzimas nucleares de la célula huésped. Como se muestra en la Figura 4-47, un virión de la rabia es adsorbido por endocitosis y la liberación de los viriones de la progenie ocurre por gemación a partir de una membrana plasmática de la célula huésped. Los viriones en gemación se ven claramente en fotomicrografías electrónicas de células infectadas según se ilustra en la Figura 4-48. Muchas decenas de miles de viriones de la progenie brotan de una célula huésped infectada antes de que esta muera.

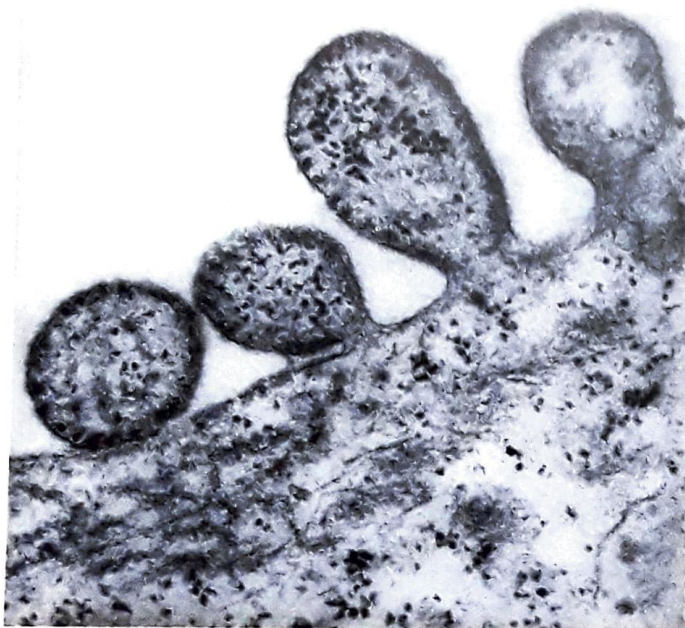


FIGURA EXPERIMENTAL 4-48 Liberación de los viriones de la progenie por gemación. Los viriones de la progenie de los virus con envoltura se liberan por gemación de las células infectadas. En esta fotomicrografía electrónica de transmisión de una célula infectada por virus del sarampión, los viriones en gemación se ven claramente proyectándose desde la superficie de la célula. El virus del sarampión es un virus de RNA con envoltura con una nucleocápside helicoidal, como el virus de la rabia, y se replica de la manera ilustrada en la

Figura 4-47. (De A. Levine, 1991, *Viruses*, Scientific American Library, p. 22.)

El DNA del virus se integra en el genoma de la célula huésped en algunos ciclos de crecimiento virales no líticos

Algunos virus bacterianos, llamados *fagos atemperados*, pueden establecer una asociación no lítica con sus células huésped que no mata a la célula. Por ejemplo, cuando el bacteriófago λ infecta a *E. coli*, la mayor parte del tiempo provoca una infección lítica. Ocasionalmente, sin embargo, el DNA del virus se integra al cromosoma de la célula huésped en lugar de replicarse. El DNA viral integrado, denominado un *profago*, se replica como parte del DNA de la célula a partir de una generación de células huésped a la siguiente. Este fenómeno se conoce como *lisogenia*. Si la célula huésped se daña extensamente en su DNA por acción de la luz ultravioleta, el DNA del profago se activa llevando a su escisión del cromosoma de la célula huésped, su entrada al ciclo lítico y la ulterior producción y liberación de viriones de la progenie antes que la célula muera.

Los genomas de cierto número de virus animales también pueden integrarse en el genoma de las células huésped. Entre los más importantes se encuentran los **retrovirus**, que son virus con cubierta con un genoma que consiste en dos hebras de RNA idénticas. Estos virus se conocen como *retrovirus* porque su genoma de RNA actúa como molde para la formación de una molécula de DNA —el flujo opuesto

de información genética comparada con la transcripción más común de DNA a RNA—. En el ciclo de vida retroviral (Fig. 4-49), una enzima de DNA a RNA—. En el ciclo de vida retroviral (Fig. 4-49), una enzima de viral llamada **transcriptasa inversa** copia inicialmente el genoma de RNA del virus a un DNA de una sola hebra complementario al RNA del virión; luego, la misma enzima cataliza la síntesis de una hebra de DNA complementaria. (Esta reacción compleja se detalla en el Capítulo 6, cuando consideramos los parásitos intracelulares íntimamente relacionados llamados retrotransposones). El DNA resultante de doble hebra se integra en el DNA cromosómico de la célula infectada. Finalmente, el DNA integrado, llamado un *provirus*, se transcribe mediante la propia maquinaria de la célula a RNA que o bien se traduce a proteínas virales o se empaqueta dentro de las proteínas de la cubierta viral para formar viriones de la progenie liberados por gemación desde la membrana de la célula huésped. Dado que la mayoría de los retrovirus no matan a sus células huésped, las células infectadas pueden replicarse produciendo células hijas con el DNA proviral integrado. Estas células hijas continúan transcribiendo el DNA proviral y dando brotes de viriones de la progenie.

Algunos retrovirus contienen genes que causan cáncer (**oncogenes**), y las células infectadas por estos retrovirus son transformadas oncogénicamente a células tumorales. Los estudios de los retrovirus oncogénicos (en su mayor parte virus de aves y ratones) han sido de gran ayuda para revelar los procesos que llevan a la transformación de una célula normal a una célula cancerosa (Cap. 24).



Entre los retrovirus humanos conocidos, se encuentran los virus linfotróficos de las células T (VLTH) que provocan una forma de leucemia y el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1), que provoca el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (sida). Ambos virus pueden infectar solo tipos celulares específicos, principalmente ciertas células del sistema inmunitario y, en el caso del HIV-1, algunas neuronas del sistema nervioso central y células de la glía. Solo estas células tienen receptores de la superficie celular que interactúan con las proteínas de la envoltura del virus, dando cuenta de la especificidad de estos virus por sus células huésped. A diferencia de la mayoría de los retrovirus, el HIV-1 finalmente mata sus células huésped. La muerte final de gran número de las células del sistema inmunitario da como resultado una respuesta inmune defectuosa, característica del sida.

Algunos virus de DNA también pueden integrarse en el cromosoma de la célula huésped. Ejemplo de ello son los papilomavirus humanos (HPV) que son la causa más común de verrugas y otras lesiones benignas de la piel. Sin embargo, los genomas de ciertos serotipos de HPV, ocasionalmente se integran en el DNA cromosómico de células epiteliales del cuello uterino infectado e inician el desarrollo de cáncer de cérvix. Los extendidos rutinarios de Pap pueden detectar estas células en estadios iniciales o el proceso de transformación iniciado por la integración del HPV permitiendo el tratamiento efectivo antes del desarrollo del cáncer. Se ha desarrollado una vacuna para los tipos de HPV asociados con el cáncer de cuello uterino capaz de proteger contra la infección inicial por estos virus y, en consecuencia, contra el desarrollo de cáncer uterino. Sin embargo, una vez que una mujer se ha infectado con estos HPV, se pierde la “ventana de oportunidad” y la vacuna no protege contra el desarrollo del cáncer. Dado que la efectividad de esta vacuna no es del 100%, las mujeres, aun cuando estén vacunadas, deben practicarse exámenes rutinarios de Pap. ■

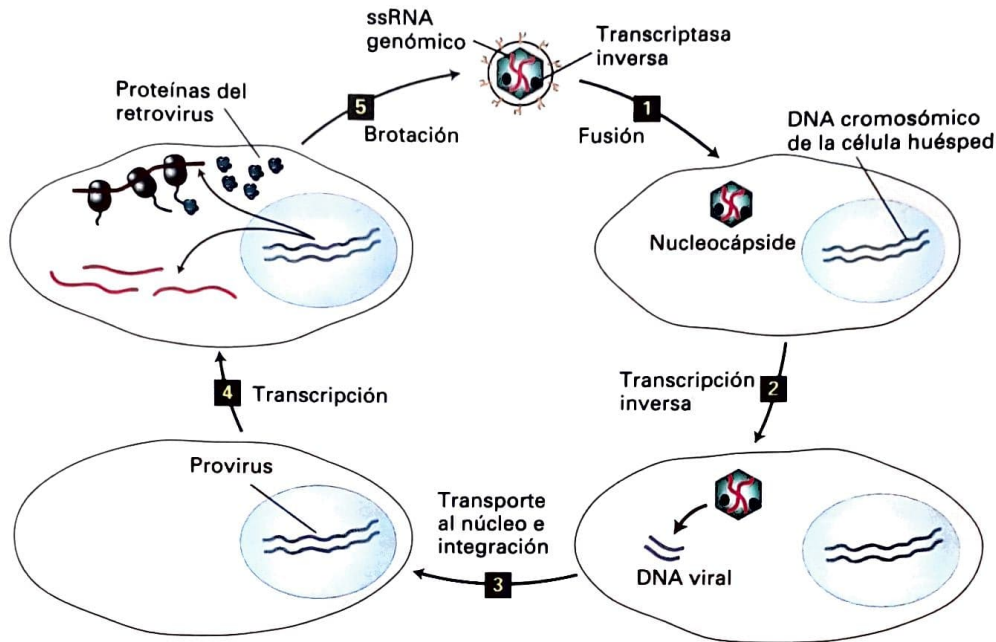


FIGURA 4-49 Ciclo de vida retroviral. Los retrovirus tienen un genoma de dos copias idénticas de RNA monocatenario y una envoltura externa. Paso 1: después de que las glucoproteínas virales de la envoltura interactúan con una proteína de membrana específica de la célula huésped, la envoltura retroviral se fusiona directamente con la membrana plasmática y permite la entrada de la nucleocápside en el citoplasma de la célula. Paso 2: la transcriptasa inversa viral y otras proteínas copian el genoma viral ssRNA a un DNA de doble hebra. Paso 3: el dsDNA viral es transportado al núcleo e

integrado en uno de los muchos sitios posibles en el DNA cromosómico de la célula huésped. Para mayor simplicidad, se representa un solo cromosoma de la célula huésped. Paso 4: el DNA viral integrado (provirus) se transcribe por la RNA polimerasa de la célula huésped y genera mRNA (rojo oscuro) y las moléculas de RNA genómico (rojo brillante). La maquinaria de la célula huésped traduce los mRNA virales en glucoproteínas y proteínas de la nucleocápside. Paso 5: luego, la progenie viral se ensambla y libera por gemación, como se ilustra en la Figura 4-47.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 4.7

Las virus: los parásitos del sistema genético celular

- Los virus son pequeños parásitos que pueden replicarse solo en las células huésped. Los genomas virales pueden ser DNA (virus de DNA) o RNA (virus de RNA) y ser monocatenarios o bicatenarios.
- La cápside que rodea al genoma viral está compuesta por múltiples copias de uno o de un pequeño número de proteínas codificadas por el virus. Algunos virus tienen también una cubierta externa, semejante a la membrana plasmática pero que contiene proteínas virales que atraviesan la membrana.
- La mayoría de los virus animales y vegetales requieren enzimas del núcleo de la célula huésped para llevar a cabo la transcripción del genoma viral a mRNA y producir genomas de la progenie. Por el contrario, la mayoría de los virus de RNA codifican para enzimas que pueden transcribir el genoma de RNA a mRNA viral y producir nuevas copias del genoma de RNA.

- Los ribosomas de la célula huésped, los tRNA y los factores de traducción se emplean en la síntesis de todas las proteínas virales en las células infectadas.
- La infección viral lítica comprende la adsorción, penetración y síntesis de las proteínas del virus y genomas de la progenie (replicación), el ensamblaje de los viriones de la progenie y la liberación de cientos a miles de viriones, lo que conduce a la muerte de la célula huésped (véase la Fig. 4-46). La liberación de los virus con cubierta ocurre por la gemación desde la membrana plasmática de la célula huésped (véase la Fig. 4-47).
- La infección no lítica ocurre cuando el genoma del virus se integra al DNA de la célula huésped y en general no conduce a la muerte celular.
- Los retrovirus son virus animales con cubierta que contienen un genoma de RNA de una sola hebra. Después de que la célula huésped es penetrada, la transcriptasa inversa, una enzima del virus presente en el virión, convierte el genoma de RNA del virus a un DNA bicatenario que se integra al DNA cromosómico (véase la Fig. 4-49).

- A diferencia de la infección por otros retrovirus, la infección por HIV finalmente mata las células huésped, provocando defectos en la respuesta inmune característicos del sida.

- Los virus tumorales que contienen oncogenes pueden tener un genoma de RNA (p. ej., en los virus linfotróficos de las células T humanas) o un genoma de DNA (p. ej., los papilomavirus humanos). En el caso de estos virus, la integración del genoma viral en un cromosoma de la célula huésped puede provocar la transformación de la célula a una célula tumoral.

Perspectivas para el futuro

Los procesos genéticos moleculares celulares básicos analizados en este capítulo establecen los fundamentos de la biología molecular celular contemporánea. Nuestra comprensión actual de estos procesos está fundamentada en la riqueza de los resultados experimentales y no es probable que se modifique. Sin embargo, la profundidad de nuestro conocimiento continuará incrementándose a medida que se descubran detalles adicionales de las estructuras e interacciones de las máquinas macromoleculares participantes. La determinación, en años recientes, de las estructuras tridimensionales de las RNA polimerasas, las subunidades ribosómicas y las proteínas de replicación del DNA ha permitido a los investigadores diseñar enfoques experimentales con penetración aún mayor para revelar el modo en que estas macromoléculas operan a nivel molecular. El nivel detallado de comprensión que se está desarrollando en la actualidad puede permitir el diseño de fármacos nuevos y más efectivos para tratar enfermedades de los seres humanos, los cultivos y el ganado. Por ejemplo, las recientes estructuras de los ribosomas en alta resolución están proporcionando mayor conocimiento sobre el mecanismo por el cual los antibióticos inhiben la síntesis proteica de las bacterias sin afectar el funcionamiento de los ribosomas de los mamíferos. Este nuevo conocimiento puede permitir el diseño de antibióticos aún más efectivos. De modo semejante, la comprensión detallada de los mecanismos que regulan la transcripción de genes humanos específicos puede conducir a estrategias terapéuticas que puedan reducir o evitar respuestas inmunes inapropiadas que conduzcan a la esclerosis múltiple y a la artritis, las divisiones celulares inadecuadas que constituyen el rasgo característico del cáncer y otros procesos patológicos.

La mayor parte de la investigación biológica actual está centrada en el descubrimiento de las interacciones moleculares que dotan a las células de su capacidad para la toma de sus decisiones y sus propiedades especiales. Por esta razón, varios de los capítulos siguientes describen el conocimiento presente acerca del modo en que estas interacciones regulan la transcripción y la síntesis proteica en los organismos multicelulares y de qué manera esta regulación dota a las células con la capacidad de desempeñar sus funciones especializadas. Otros capítulos se relacionan con el modo en que las interacciones proteína-proteína subyacen en la construcción de orgánulos especializados en las células y el modo en que determinan la forma y el movimiento celular. Los rápidos avances en la biología celular molecular hechos en años recientes resultan promisorios en el sentido de que, en un futuro no muy distante, tendremos mayor comprensión del modo en que la regulación de la función, la forma y la movilidad celulares especializadas, acoplado con la replicación y la muerte celular regulada (apoptosis), conducen al crecimiento de organismos complejos como las plantas con floración y los seres humanos.

Palabras clave

anticodón 131	fragmentos de Okazaki 147
codón 131	enlace fosfodiéster 118
complementario 119	polirribosoma 142
entrecruzamiento 156	transcripto primario 127
desaminación 152	cebador 145
despurinación 153	promotor 124
unión de DNA por los extremos 155	marco de lectura 132
DNA polimerasa 145	recombinación 116
doble hélice 118	horquilla de replicación 145
sistemas de reparación por escisión 153	retrovirus 164
exón 127	transcriptasa inversa 164
conversión génica 159	RNA ribosómico (rRNA) 116
código genético 131	ribosoma 131
estructura de Holliday 157	RNA polimerasa 124
recombinación homóloga 157	dímero timina-timina 154
intrón 127	transcripción 116
isoforma 130	RNA de transferencia (tRNA) 116
hebra retardada 146	traducción 116
hebra conductora 146	envoltura viral 160
RNA mensajero (mRNA) 116	pares de bases de Watson-Crick 118
mutación 151	

Revisión de los conceptos

1. ¿Qué son los pares de bases de Watson-Crick? ¿Por qué son importantes?
2. La preparación de un plásmido (circular de doble hebra) para la secuenciación implica la formación de un anillo con un DNA cebador corto de oligonucleótidos complementario de una sola hebra a una de las hebras del plásmido molde. Esto se lleva a cabo rutinariamente calentando el DNA del plásmido y el cebador a 90 °C y luego lentamente haciendo bajar la temperatura hasta 25 °C. ¿Por qué funciona este protocolo?
3. ¿Por qué la diferencia entre el RNA y el DNA ayuda a explicar la mayor estabilidad de este último? ¿Qué implicaciones tiene para la función del DNA?
4. ¿Cuáles son las principales diferencias en la síntesis y estructura de los mRNA procariontes y eucariontes?
5. Durante la investigación de la función de un gen para un receptor de un factor de crecimiento específico de los seres humanos, los investigadores encontraron que este gen sintetiza dos tipos de proteínas. Una proteína de mayor tamaño que contiene un dominio que se expande dentro de la membrana reconoce los factores de crecimiento de la superficie celular estimulando una vía de señalización corriente abajo específica. Por el contrario, una proteína más pequeña relacionada es secretada desde la célula y funciona uniendo el factor de

crecimiento circulante disponible en la sangre e inhibe la vía de señalización corriente abajo. Especule de qué manera la célula sintetiza estas proteínas opuestas.

6. La transcripción de muchos genes bacterianos se asienta en grupos funcionales llamados *operones*, como el operón triptófano (Fig. 4-13a). ¿Qué es un operón? ¿Qué ventajas hay en tener genes dispuestos en un operón en comparación con la disposición en los eucariontes?

7. ¿De qué manera afectaría a la traducción una mutación en el gen de la proteína que une poli(A)? ¿De qué manera diferiría una fotomicrografía electrónica de los polirribosomas de una mutación de este tipo con respecto al patrón normal?

8. ¿Qué característica del DNA resulta en la necesidad de que cierta síntesis de DNA sea discontinua? ¿Cómo son utilizados los fragmentos de Okazaki y la DNA ligasa por la célula?

9. Los eucariontes tienen sistemas de reparación que evitan las mutaciones debidas a los errores de copiado y exposición a los mutágenos. ¿Cuáles son los tres sistemas de reparación por escisión que se encuentran en los eucariontes y cuál de ellos es responsable de la corrección de los dímeros timina-timina que se forman como resultado del daño por la luz UV al DNA?

10. Los sistemas de reparación del DNA son responsables de mantener la fidelidad genómica en las células normales a pesar de la alta frecuencia con la cual ocurren los eventos de mutación. ¿Qué tipo de mutación del DNA se genera por (a) la radiación UV y (b) la radiación ionizante? Describa el sistema responsable de reparar cada uno de estos tipos de mutaciones en las células de mamífero. Postule por qué la pérdida de la función en uno o más sistemas de reparación del DNA tipifica muchos cánceres.

11. ¿Cuál es el nombre dado al proceso que puede reparar el daño al DNA y generar la diversidad genética? Describa brevemente las similitudes y diferencias de ambos procesos.

12. El genoma de un retrovirus puede integrarse al genoma de la célula huésped. ¿Qué gen es único de los retrovirus y por qué la proteína codificada por este gen es absolutamente necesaria para mantener el ciclo de vida retroviral? Cierta número de retrovirus pueden infectar ciertas células humanas. Nombre dos de ellos y describa brevemente las implicaciones médicas que resultan de estas infecciones, describiendo por qué solo ciertas células son infectadas.

13. a. ¿Cuál de las siguientes hebras de DNA, la superior o la inferior, servirían como molde para la transcripción de RNA si la molécula de DNA se desenrollara en la dirección indicada?

5' ACGGACTGTACCGCTGAAGTCATGGACGCTCGA 3'
3' TGCCTGACATGGCGACTTCAGTACCTGCGAGCT 5'



Dirección del desenrollamiento del DNA

b. ¿Cuál sería la secuencia de RNA resultante (escrita en dirección 5' a 3')?

14. Contraste las características de los genes procariontes y eucariontes.
15. Usted ha aprendido acerca de los eventos que rodean la replicación del DNA y el dogma central. Identifique los pasos asociados con este proceso que se verían afectados adversamente en los siguientes escenarios.

a. Las helicasas desenrollan el DNA pero las proteínas estabilizadoras están mutadas y no pueden unirse al DNA.

b. La molécula de mRNA forma un bucle en horquilla sobre sí misma vía un apareamiento de bases complementarias en un área que se expande en el sitio de iniciación AUG.

c. La célula es incapaz de producir un tRNA^{iMet} funcional.

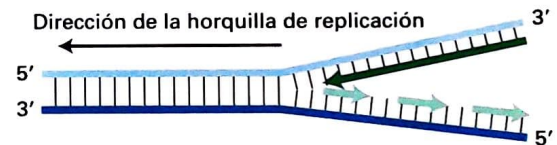
16. Emplee la clave que se provee más abajo para determinar la secuencia de aminoácidos del polipéptido producido a partir de la siguiente secuencia de DNA. Nota: no todos los aminoácidos de esta clave serán empleados.

5' TTCTAAACGCATGAAGCACCGTCTCAGAGCCAGTGA 3'
3' AAGATTTGCGTACTTCGTGGCAGAGTCTCGGTCACT 5'



Dirección del desenrollamiento del DNA

Asn = AAU Gl = CAG Lys = AAG Phe = UUC Tyr = UAC
Cys = TCG His = CAU Met = AUG Ser = AGC Val = GUC; GUA



17. a. Mire la figura que se encuentra arriba. Explique por qué es necesario que se formen fragmentos de Okazaki a medida que se produce la hebra conductora (en lugar de una hebra continua).

b. Si la DNA polimerasa de la figura que se encuentra arriba pudiera solamente unirse a la hebra molde que se encuentra abajo, ¿en qué condiciones sería capaz de producir una hebra conductora?

18. Los sistemas de reparación de DNA preferentemente se centran en la hebra recién sintetizada. ¿Por qué esto es importante?

19. Identifique los tipos específicos de mutaciones puntuales que aparecen más abajo (usted está viendo la versión directa de DNA de la secuencia de RNA).

Secuencia original 5' AUG TCA GGA CGT CAC TCA GCT 3'
Mutación A: 5' AUG TCA GGA CGT CAC TGA GCT 3'
Mutación B: 5' AUA TCA GGA CGT CAC TCA GCT 3'

20. a. Detalle las diferencias clave entre la infección viral lítica y no lítica y proporcione un ejemplo de cada una de ellas.

b. ¿Cuál de los siguientes procesos se produce en las infecciones virales líticas y no líticas?

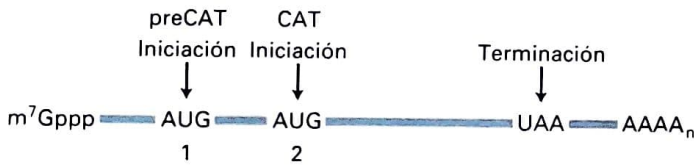
(i) La célula infectada se rompe para liberar las partículas virales.

(ii) Los mRNA virales se transcriben mediante la maquinaria de traducción de la célula huésped.

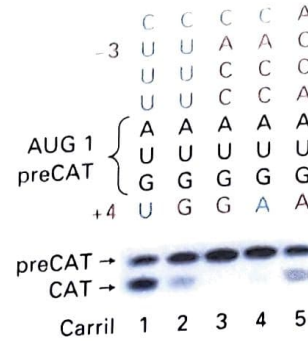
(iii) Las proteínas del virus y sus ácidos nucleicos se empaquetan para producir viriones.

Análisis de los datos

La síntesis de las proteínas de los eucariontes se inicia normalmente en el primer codón AUG del mRNA. Sin embargo, en ocasiones los ribosomas no inician la síntesis proteica en el primer AUG, sino que escanean más allá de él (escaneo laxo) y la síntesis de proteínas comienza en un AUG interno. Para comprender cuáles son las características de un mRNA que afectan la eficiencia de la iniciación en el primer AUG, se han realizado estudios en los cuales se examinó la síntesis de la acetil transferasa de cloramfenicol. La traducción de su mensaje puede dar origen a una proteína conocida como preCAT o dar origen a una proteína ligeramente más pequeña, CAT (véase M. Kozak, 2005, *Gene* 361:13). Las dos proteínas difieren en que la CAT carece de varios aminoácidos encontrados en el extremo N-terminal de la preCAT. La CAT no deriva de la preCAT por escisión sino, en realidad, por la iniciación de la traducción del mRNA en un AUG interno;

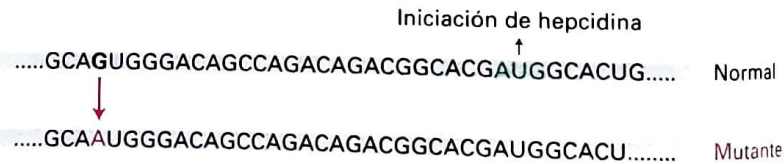


a. Los resultados de varios estudios han dado lugar a la hipótesis de que la secuencia (–3)ACCAUGG (+4), en la cual el codón de iniciación AUG se muestran en negritas, proporcionan un contexto óptimo para la iniciación de la síntesis proteica y asegura que los ribosomas no pasen de largo este primer AUG para iniciar la síntesis de proteínas en otro AUG corriente abajo. En el esquema numerado que se emplea aquí, la A del AUG de iniciación se designa como (+1); a las bases hacia el extremo 5' se les asignan números negativos (de modo tal que la primera base de esta secuencia es [–3]), y a las bases hacia 3' de la A (+) se les asignan números positivos (de modo tal que la última base de esta secuencia es [+4]). Para probar la hipótesis de que la secuencia del sitio de iniciación (–3)ACCAUGG (+4) evita el barrido laxo, la secuencia de mRNA de acetil transferasa de cloramfenicol fue modificada y los efectos resultantes sobre la traducción fueron evaluados. En la siguiente figura, la secuencia (en rojo) que rodea el primer codón AUG (en negro) del mRNA que origina la síntesis de la preCAT se muestra por encima del carril 3. La modificación de este mensaje se muestra por encima de los otros carriles del gen (los nucleótidos alterados se ven en azul) y las proteínas completas generadas a partir de cada mensaje modificado aparecen como bandas en el gel de poliacrilamida-SDS abajo. La intensidad de cada banda es una indicación de la cantidad de cada proteína sintetizada. Analice las alteraciones de la secuencia de tipo silvestre y describa el modo en que afectan la traducción. ¿Las posiciones de algunos nucleótidos son más importantes que las de otros? ¿Los datos que se muestran en la figura apoyan la hipótesis de que el contexto en el cual está presente el primer AUG afecta la eficiencia de la traducción a partir de este sitio? ¿ACCAUGG es un contexto óptimo para la iniciación a partir del primer AUG?



b. ¿Cuáles son algunas de las alteraciones adicionales a este mensaje, además de las mostradas en la figura, que podrían permitir comprender adicionalmente la importancia de la secuencia ACCAUGG como un contexto óptimo para la síntesis de la preCAT en lugar de la CAT? ¿De qué manera examinaría con mayor profundidad si la A en la posición (–3) y la G en la posición (+4) son los nucleótidos más importantes para proporcionar contexto a la iniciación en AUG?

c. Una mutación que provoca una grave enfermedad de la sangre se encontró en una familia única (véase T. Matthes y cols., 2004, *Blood* 104:2181). La mutación que aparece en rojo en la figura que está más abajo ha sido ubicada en la región 5'-no traducida del gen que codifica para hepcidina y se ha encontrado que altera el mRNA del gen. Las regiones sombreadas indican la secuencia codificante de los genes normal y mutante. En este mRNA alterado no se produce hepcidina y la falta de esta proteína resulta en la enfermedad. ¿Puede proporcionar una explicación razonable para la ausencia de síntesis de hepcidina en los miembros de la familia que han heredado esta mutación? ¿Qué puede deducir acerca de la importancia del contexto en el cual el sitio de iniciación para la síntesis de una proteína ocurre en este caso?



Referencias

Estructura de los ácidos nucleicos

- Arnett, S. 2006. Historical article: DNA polymorphism and the early history of the double helix. *Trends Biochem. Sci.* 31:349-354.
- Berger, J. M., and J. C. Wang. 1996. Recent developments in DNA topoisomerase II structure and mechanism. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 6:84-90.
- Cech, T. R. 2009. Evolution of biological catalysis: ribozyme to RNP enzyme. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 74:11-16.
- Dickerson, R. E. 1992. DNA Structure from A to Z. *Methods Enzymol.* 211:67-111.
- Kornberg, A., and T. A. Baker. 2005. *DNA Replication*. University Science, chap. 1. A good summary of the principles of DNA structure.
- Lilley, D. M. 2005. Structure, folding and mechanisms of ribozymes. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 15:313-323.
- Vicens, Q., and T. R. Cech. 2005. Atomic level architecture of group I introns revealed. *Trends Biochem. Sci.* 31:41-51.

- Wang, J. C. 1980. Superhelical DNA. *Trends Biochem. Sci.* 5:219-221.
- Wigley, D. B. 1995. Structure and mechanism of DNA topo-isomerases. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 24:185-208.

Transcripción de los genes que codifican proteínas y formación de mRNA funcional

- Brenner, S., F. Jacob, and M. Meselson. 1961. An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature* 190:576-581.
- Brueckner F., J. Ortiz, and P. Cramer 2009. A movie of the RNA polymerase nucleotide addition cycle. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 19:294-299.
- Murakami, K. S., and S. A. Darst. 2003. Bacterial RNA polymerases: the whole story. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 13:31-39.
- Okamoto K., Y. Sugino, and M. Nomura. 1962. Synthesis and turnover of phage messenger RNA in E. coli infected with bacteriophage T4 in the presence of Chloromycetin. *J. Mol. Biol.* 5:527-534.
- Steitz, T. A. 2006. Visualizing polynucleotide polymerase machines at work. *EMBO J.* 25:3458-3468.

La decodificación del mRNA por los tRNA

- Alexander, R. W., and P. Schimmel. 2001. Domain-domain communication in aminoacyl-tRNA synthetases. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* 69:317-349.
- Hatfield, D. L., and V. N. Gladyshev. 2002. How selenium has altered our understanding of the genetic code. *Mol. Cell Biol.* 22:3565-3576.
- Hoagland, M. B., et al. 1958. A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis. *J. Biol. Chem.* 231:241-257.
- Ibba, M., and D. Soll. 2004. Aminoacyl-tRNAs: setting the limits of the genetic code. *Genes Dev.* 18:731-738.
- Khorana, G. H., et al. 1966. Polynucleotide synthesis and the genetic code. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 31:39-49.
- Nakanishi, K., and O. Nureki. 2005. Recent progress of structural biology of tRNA processing and modification. *Mol. Cells* 19:157-166.
- Nirenberg, M., et al. 1966. The RNA code in protein synthesis. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 31:11-24.
- Rich, A., and S.-H. Kim. 1978. The three-dimensional structure of transfer RNA. *Sci. Am.* 240(1):52-62 (offprint 1377).

Síntesis escalonada de las secuencias de las de proteínas en los ribosomas

- Belousoff, M. J., et al. 2010. Ancient machinery embedded in the contemporary ribosome. *Biochem. Soc. Trans.* 38:422-427.
- Frank, J., and R. L. Gonzalez, Jr. 2010. Structure and dynamics of a processive Brownian motor: the translating ribosome. *Annu. Rev. Biochem.* 79:381-412.
- Jackson, R. J., et al. 2010. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11:113-127.
- Korostelev, A., D. N. Ermolenko, and H. F. Noller. 2008. Structural dynamics of the ribosome. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12:674-683.
- Livingstone, M., et al. 2010. Mechanisms governing the control of mRNA translation. *Phys. Biol.* 7(2):021001.
- Sarnow, P., R. C. Cevallos, and E. Jan. 2005. Takeover of host ribosomes by divergent IRES elements. *Biochem. Soc. Trans.* 33:1479-1482.
- Steitz, T. A. 2008. A structural understanding of the dynamic ribosome machine. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9:242-253.

La replicación del DNA

- DePamphilis, M. L., ed. 2006. *DNA Replication and Human Disease*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

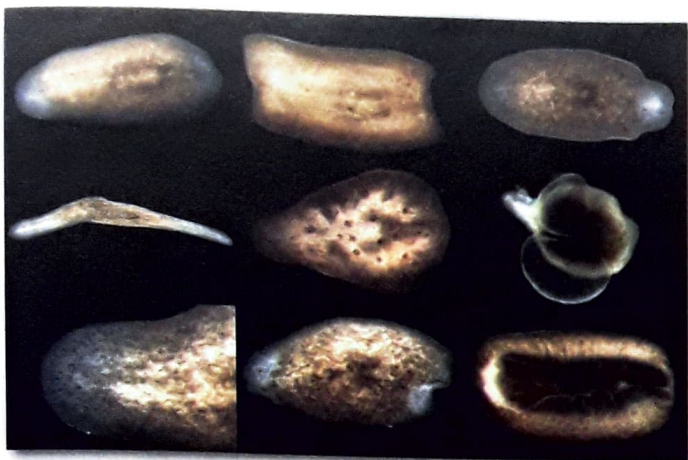
- Gai, D., Y. P. Chang, and X. S. Chen. 2010. Origin DNA melting and unwinding in DNA replication. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 20(6):756-762.
- Kornberg, A., and T. A. Baker. 2005. *DNA Replication*. University Science.
- Langston, L. D., C. Indiani, and M. O'Donnell. 2009. Whither the replisome: emerging perspectives on the dynamic nature of the DNA replication machinery. *Cell Cycle* 8:2686-2691.
- Langston, L. D., and M. O'Donnell. 2006. DNA replication: keep moving and don't mind the gap. *Mol. Cells* 23:155-160.
- Schoeffler, A. J., and J. M. Berger. 2008. DNA topoisomerases: harnessing and constraining energy to govern chromosome topology. *Quart. Rev. Biophys.* 41:41-101.
- Stillman, B. 2008. DNA polymerases at the replication fork in eukaryotes. *Cell* 30:259-260.

La reparación y recombinación del DNA

- Andressoo, J. O., and J. H. Hoeijmakers. 2005. Transcription-coupled repair and premature aging. *Mutat. Res.* 577:179-194.
- Barnes, D. E., and T. Lindahl. 2004. Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. *Ann. Rev. Genet.* 38:445-476.
- Bell, C. E. 2005. Structure and mechanism of Escherichia coli RecA ATPase. *Mol. Microbiol.* 58:358-366.
- Friedberg, E. C., et al. 2006. DNA repair: from molecular mechanism to human disease. *DNA Repair* 5:986-996.
- Haber, J. E. 2000. Partners and pathways repairing a double-strand break. *Trends Genet.* 16:259-264.
- Jiricny, J. 2006. The multifaceted mismatch-repair system. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7:335-346.
- Khuu, P. A., et al. 2006. The stacked-X DNA Holliday junction and protein recognition. *J. Mol. Recog.* 19:234-242.
- Lilley, D. M., and R. M. Clegg. 1993. The structure of the four-way junction in DNA. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 22:299-328.
- Mirchandani, K. D., and A. D. D'Andrea. 2006. The Fanconi anemia/BRCA pathway: a coordinator of cross-link repair. *Exp. Cell Res.* 312:2647-2653.
- Mitchell, J. R., J. H. Hoeijmakers, and L. J. Niedernhofer. 2003. Divide and conquer: nucleotide excision repair battles cancer and aging. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15:232-240.
- Orr-Weaver, T. L., and J. W. Szostak. 1985. Fungal recombination. *Microbiol. Rev.* 49:33-58.
- Shin, D. S., et al. 2004. Structure and function of the double strand break repair machinery. *DNA Repair* 3:863-873.
- Wood, R. D., M. Mitchell, and T. Lindahl. Human DNA repair genes. *Mutat. Res.* 577:275-283.
- Yoshida, K., and Y. Miki. 2004. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci.* 95:866-871.

Los virus: los parásitos del sistema genético celular

- Flint, S. J., et al. 2000. *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control*. ASM Press.
- Hull, R. 2002. *Mathews' Plant Virology*. Academic Press.
- Klug, A. 1999. The tobacco mosaic virus particle: structure and assembly. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 354:531-535.
- Knipe, D. M., and P. M. Howley, eds. 2001. *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Kornberg, A., and T. A. Baker. 1992. *DNA Replication*, 2d ed. W. H. Freeman and Company. Good summary of bacteriophage molecular biology.



La planaria es un gusano plano de agua dulce con una capacidad sorprendente para la regeneración. Si la cola y la cabeza de un planaria adulto se cortan, el gusano generará rápidamente estas estructuras (como se muestra en el recuadro superior izquierdo). La función de los genes específicos en los procesos de regeneración puede evaluarse al apagar la expresión génica mediante interferencia de RNA (RNAi) antes de cortar la cabeza y la cola. Los ocho cuadros restantes muestran la variedad de defectos de regeneración que pueden observarse después de la RNAi de diferentes genes causantes de la regeneración. Los genes inhibidos por la RNAi, de izquierda a derecha, empezando por el panel central superior son: *smad4*, β -catenina-1, antígeno carcinoma, POU2/3, rootletin, Novel, tolloid, y *piwi*. (Cortesía de Peter Reddien/MIT, Whitehead Institute.)

Técnicas genéticas moleculares

En el campo de la biología celular y molecular, reducida a sus elementos más básicos, buscamos un entendimiento del comportamiento biológico de las células en términos de los mecanismos químicos y moleculares subyacentes. A menudo, la investigación de un nuevo proceso molecular se centra en la función de una proteína particular. Hay tres preguntas fundamentales que los biólogos celulares suelen formular acerca de una proteína recientemente descubierta: ¿cuál es la función de la proteína en el contexto de una célula viva, cuál es la función química de la proteína purificada, y dónde se localiza? Para responder a estas preguntas, los investigadores utilizan tres herramientas genéticas moleculares: el gen que codifica la proteína, una línea celular u organismo mutante que carezca de la proteína funcional y una fuente de la proteína purificada mediante estudios bioquímicos. En este capítulo, consideraremos varios aspectos de dos estrategias experimentales básicas para la obtención de estas tres herramientas (Fig. 5-1).

La primera estrategia, a menudo conocida como la *genética clásica*, comienza con el aislamiento de un mutante que parece ser defectuoso en algunos procesos de interés. Luego se utilizan métodos genéticos para identificar y aislar el gen afectado. El gen aislado puede manipularse para producir grandes cantidades de la proteína por medio de

experimentos bioquímicos y para diseñar sondas para estudios acerca de dónde y cuándo la proteína codificada se expresa en un organismo. La segunda estrategia sigue esencialmente los mismos pasos que el enfoque clásico, pero en orden inverso; comienza con el aislamiento de una proteína de interés o su identificación sobre la base del análisis de una secuencia genómica del organismo. Una vez que se ha aislado el gen correspondiente, éste puede alterarse y después ser reinsertado en un organismo. En ambas estrategias, al examinar las consecuencias fenotípicas de las mutaciones que inactivan un gen particular, los genetistas son capaces de relacionar el conocimiento acerca de la secuencia, la estructura y la actividad bioquímica de la proteína codificada para su función en el contexto de una célula viva u organismos multicelulares.

Un componente importante en ambas estrategias, para el estudio de una proteína y su función biológica, es el aislamiento del gen correspondiente. Por lo tanto analizamos varias técnicas mediante las cuales los investigadores pueden aislar, secuenciar y manipular regiones específicas del DNA de un organismo. A continuación, introduciremos una variedad de técnicas que se utilizan, por lo general, para analizar dónde y cuándo se expresa un gen particular y en qué sitio de la célula se localiza. En algunos casos, el conocimiento acerca de la célula puede conducir a avances médicos significativos, y el primer paso en el desa-

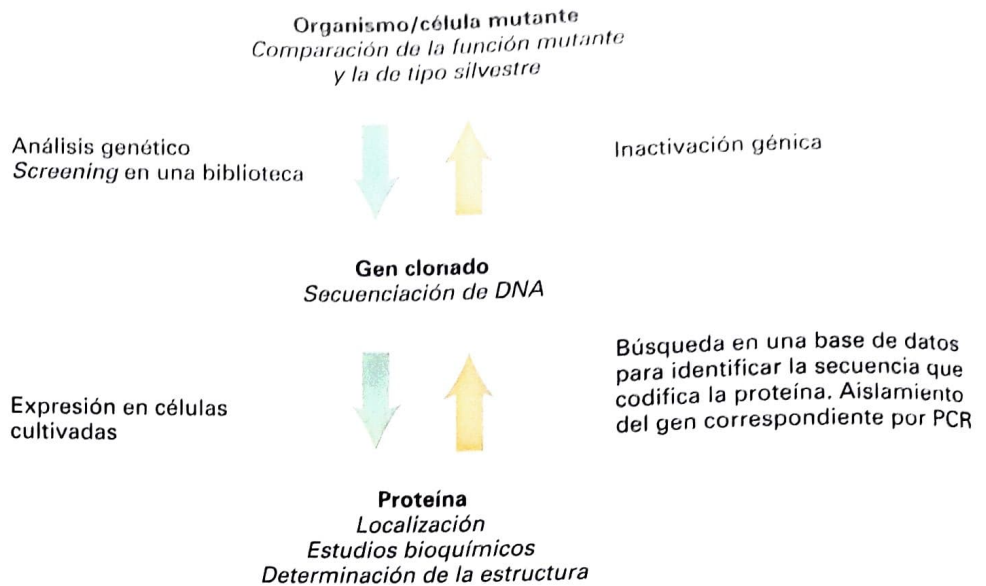
CONTENIDO

5.1 Análisis genético de mutaciones para identificar y estudiar genes	172
5.2 Clonación del DNA y caracterización	182
5.3 Uso de los fragmentos de DNA clonados para estudiar la expresión génica	198

5.4 Localización e identificación de genes de enfermedades humanas	206
5.5 Inactivación de la función de genes específicos en los eucariontes	212

FIGURA 5-1 Panorama general de dos estrategias para relacionar la función, la localización y la estructura de los productos génicos. Un organismo mutante se encuentra en el punto de inicio de la estrategia genética clásica (flechas verdes). La estrategia inversa (flechas anaranjadas) suele comenzar con la identificación de una secuencia codificante de proteína mediante análisis de las bases de datos de secuencia genómica. En ambas estrategias, el gen real se aísla a partir de una biblioteca de DNA o mediante amplificación específica de la secuencia génica, a partir del DNA genómico. Una vez que se aísla un gen clonado, puede ser utilizado para producir la proteína codificada en los sistemas de expresión bacteriano o eucariote. Alternativamente, un gen clonado puede ser inactivado por una o varias técnicas y ser usado para generar células u organismos mutantes.

rollo de tratamientos para una enfermedad hereditaria es identificar y aislar el gen afectado, que se describe aquí. Finalmente, se discuten técnicas que anulan la función normal con el fin de analizar el papel de la proteína en la célula.



5.1 Análisis genético de mutaciones para identificar y estudiar genes

Como se describe en el Capítulo 4, la información codificada en la secuencia de DNA de genes especifica la secuencia –y, por lo tanto, la estructura y la función– de cada molécula de proteína en una célula. La potencia de la genética, como una herramienta para el estudio de células y organismos, se encuentra en la capacidad de los investigadores para alterar de manera selectiva cada copia de solo un tipo de proteína en una célula al hacer un cambio en el gen para esa proteína. Los análisis genéticos de mutantes defectuosos en un proceso particular pueden revelar (a) nuevos genes necesarios para que se lleve a cabo el proceso, (b) el orden en el que los productos de los genes actúan en el proceso, y (c) si las proteínas codificadas por diferentes genes interactúan unas con otras. Antes de ver cómo los estudios genéticos de este tipo pueden proporcionar pistas acerca del mecanismo de un proceso del desarrollo o celular complicado, en primer lugar explicamos algunos términos genéticos básicos utilizados a lo largo de todo el análisis.

Las diferentes formas, o variantes, de un gen se denominan **alelos**. Los genetistas suelen referirse al número de variantes genéticas que se producen naturalmente y que existen en poblaciones, en particular en poblaciones humanas, como alelos. El término **mutación** suele reservarse para instancias en las cuales se conoce que un alelo se ha formado recientemente, como después del tratamiento de un organismo experimental con un **mutágeno**, un agente que causa un cambio hereditario en la secuencia de DNA.

En sentido estricto, el conjunto particular de alelos para todos los genes que porta un individuo es su **genotipo**. Sin embargo, este término también se utiliza en un sentido más restringido para denotar solo los alelos del gen o los genes particulares que se están examinando.

Para los organismos experimentales, el término de **tipo silvestre** se emplea para designar un genotipo estándar para usar como una referencia en los experimentos de cultivo. Por lo tanto, el alelo no mutante en general se designará como el de *tipo silvestre*. Debido a la enorme variación alélica que se produce naturalmente en las poblaciones humanas, el término tipo silvestre suele referirse a un alelo que está presente en una frecuencia mucho más alta que cualquiera de las otras posibles alternativas.

Los genetistas trazan una distinción importante entre el **genotipo** y el **fenotipo** de un organismo. El fenotipo se refiere a todos los atributos físicos o rasgos de un individuo que son la consecuencia de un genotipo determinado. Sin embargo, en la práctica, el término **fenotipo** suele utilizarse para referirse a las consecuencias físicas que resultan solo de los alelos que están en estudio experimental. Las características fenotípicas observables rápidamente son cruciales en el análisis genético de las mutaciones.

Los alelos mutantes dominantes y recesivos suelen tener efectos opuestos en la función del gen

Una diferencia genética fundamental entre los organismos experimentales es si sus células portan un conjunto único de cromosomas o dos copias de cada cromosoma. Los primeros se denominan haploides; los segundos diploides. Los organismos multicelulares complejos (p. ej., moscas de la fruta, ratones, seres humanos) son diploides, mientras que muchos organismos unicelulares simples son haploides. Algunos organismos, notablemente la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, pueden existir en estado haploide o diploide. Las células normales de algunos organismos, plantas y animales llevan más de dos copias de cada cromosoma; por lo tanto, son designadas como poliploides. Más aún, las células cancerosas comienzan como diploides, pero a través del proceso de transformación en células cancerosas pueden ganar copias extra de uno o más cromosomas y, por ende, se designan como aneuploides. Sin embargo, nuestra descripción de técnicas y análisis genéticos se relaciona con organismos diploides, incluso levaduras diploides.

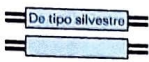
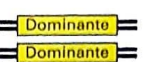
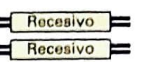
GENOTIPO DIPLOIDE					
FENOTIPO DIPLOIDE	De tipo silvestre	Mutante	Mutante	De tipo silvestre	Mutante

FIGURA 5-2 Efectos de los alelos mutantes dominante y recesivo en el fenotipo de los organismos diploides. Una única copia de un alelo dominante es suficiente para producir un fenotipo mutante, mientras que ambas copias

de un alelo recesivo debe estar presentes para causar un fenotipo mutante. Las mutaciones recesivas suelen provocar una pérdida de función; las mutaciones dominantes suelen causar una ganancia de función o una función alterada.

Aunque muchos alelos diferentes de un gen pueden manifestarse en organismos distintos de una determinada población, cualquier organismo diploide individual portará dos copias de cada gen y, por lo tanto, como máximo podrá tener alelos diferentes. Un individuo con dos alelos diferentes es **heterocigoto** para un gen, mientras que un individuo que porta dos alelos idénticos es **homocigoto** para un gen. Un alelo mutante **recesivo** se define como uno en el cual ambos alelos deben ser mutantes para que se observe el fenotipo mutante; es decir, el individuo debe ser homocigoto para el alelo mutante para que manifieste el fenotipo mutante. Por el contrario, las consecuencias fenotípicas de un alelo mutante **dominante** pueden observarse en un individuo heterocigoto que porta un alelo mutante y otro de tipo silvestre (Fig. 5-2).

Que un alelo mutante sea recesivo o dominante proporciona información valiosa acerca de la función del gen afectado y de la naturaleza de la mutación responsable. Los alelos recesivos suelen ser el resultado de una mutación que inactiva el gen afectado, lo que conduce a una *pérdida de función* parcial o completa. Estas mutaciones recesivas pueden eliminar parte de los genes o el gen completo del cromosoma —lo que interrumpe la expresión del gen— o alterar la estructura de la proteína codificada y modificar, de este modo, su función. Por el contrario, los alelos dominantes suelen ser la consecuencia de una mutación que causa alguna clase de *ganancia de función*. Dichas mutaciones dominantes pueden aumentar la actividad de la proteína codificada, lo que confiere una nueva función en ese lugar, o llevando a su patrón de expresión temporal o espacial inadecuado.

Sin embargo, las mutaciones dominantes en ciertos genes están asociadas con una pérdida de función. Por ejemplo, algunos genes son *haploinsuficientes*, lo que significa que la eliminación o inactivación de uno o dos alelos de ese gen conducen a un fenotipo mutante debido a que no se sintetiza suficiente producto génico. En otras raras ocasiones, una mutación dominante en un alelo puede producir un cambio estructural en la proteína que interfiere en la función de la proteína de tipo silvestre codificada por el otro alelo. Este tipo de mutación, denominada *dominante-negativa*, produce un fenotipo similar al obtenido a partir de una mutación de pérdida de función.

 Algunos alelos pueden exhibir propiedades recesivas y dominantes. En esos casos, la afirmación acerca de si un alelo es dominante o recesivo debe especificar el fenotipo. Por ejemplo, el alelo del gen de la hemoglobina en los seres humanos designado Hb^S tiene más de una consecuencia fenotípica. Los individuos que son homocigotos para este alelo (Hb^S/Hb^S) tienen la enfermedad debilitante anemia falciforme, pero los individuos (Hb^S/Hb^A) heterocigotos no tienen la enfermedad. Por lo tanto, Hb^S es recesivo para el rasgo de enfermedad de

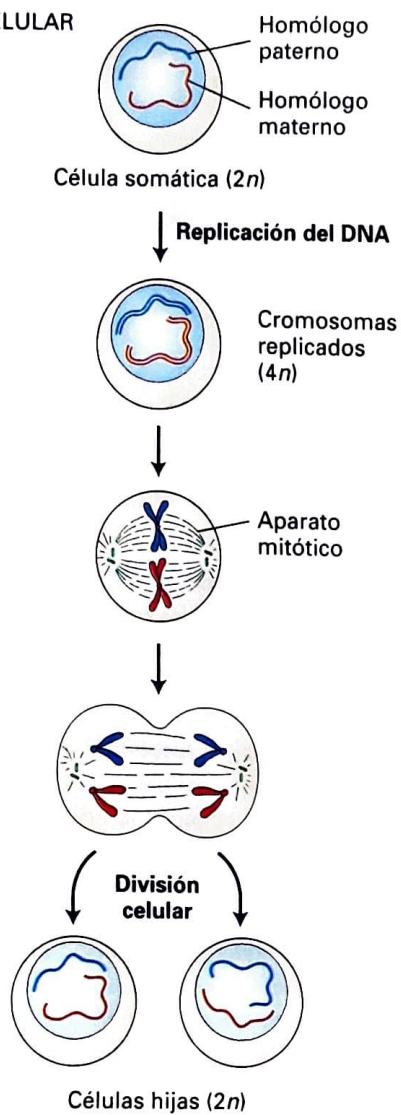
anemia falciforme. Por otra parte, los individuos heterocigotos (Hb^S/Hb^A) son más resistentes a la malaria que los homocigotos (Hb^A/Hb^A), lo que revela que Hb^S es dominante para el rasgo de la resistencia al paludismo. ■

Un agente comúnmente utilizado para inducir mutaciones (mutagénesis) en organismos experimentales es el sulfonato de etilmetano (EMS, por sus siglas en inglés). Aunque este mutágeno puede alterar las secuencias de DNA en diversas formas, uno de sus efectos más comunes es la modificación química de la guanina en el DNA, que conduce a la conversión del par G-C en un par A-T. Esta alteración en la secuencia de un gen, que involucra un único par de bases, se conoce como **mutación puntual**. Una mutación puntual *silenciosa* no causa cambios en la secuencia aminoacídica o en la actividad de una proteína codificada por el gen. Sin embargo, las consecuencias fenotípicas debido a los cambios de la actividad de la proteína pueden surgir a partir de mutaciones puntuales que producen la sustitución de un aminoácido por otro (mutación *con sentido erróneo*) o la introducción de un codón de detención (mutación *sin sentido*) o un cambio en el marco de lectura de un gen (mutación *con cambio de marco de lectura*). Debido a que las alteraciones en la secuencia de DNA que conducen a la disminución de la actividad proteica son mucho más probables que las que conducen a un cambio cualitativo o a un incremento en la actividad de la proteína, la mutagénesis suele producir muchas más mutaciones recesivas que mutaciones dominantes.

La segregación de mutaciones en experimentos de cruzamientos de cepas revela si son dominantes o recesivas

Los genetistas aprovechan el ciclo normal de un organismo para evaluar la dominancia o la recesividad de los alelos. Para ver cómo se hace esto, primero es necesario repasar el tipo de división celular que da origen a los gametos (espermatozoides y óvulos en los animales superiores). Mientras que las células (somáticas) del cuerpo de la mayoría de los organismos multicelulares se dividen por mitosis, las células germinales lo hacen por meiosis. Al igual que las células somáticas, las células germinales premeióticas son diploides, contienen dos homólogos de cada tipo de cromosoma. Los dos homólogos que constituyen cada par de cromosomas homólogos derivan de padres diferentes y, por lo tanto, sus genes pueden existir en diferentes formas alélicas. La Figura 5-3 describe los principales acontecimientos en las divisiones meiótica y mitótica. En la mitosis, la replicación del DNA siempre es seguida por la división celular, que da dos células hijas diploides.

DIVISIÓN CELULAR MITÓTICA



DIVISIÓN CELULAR MEIÓTICA

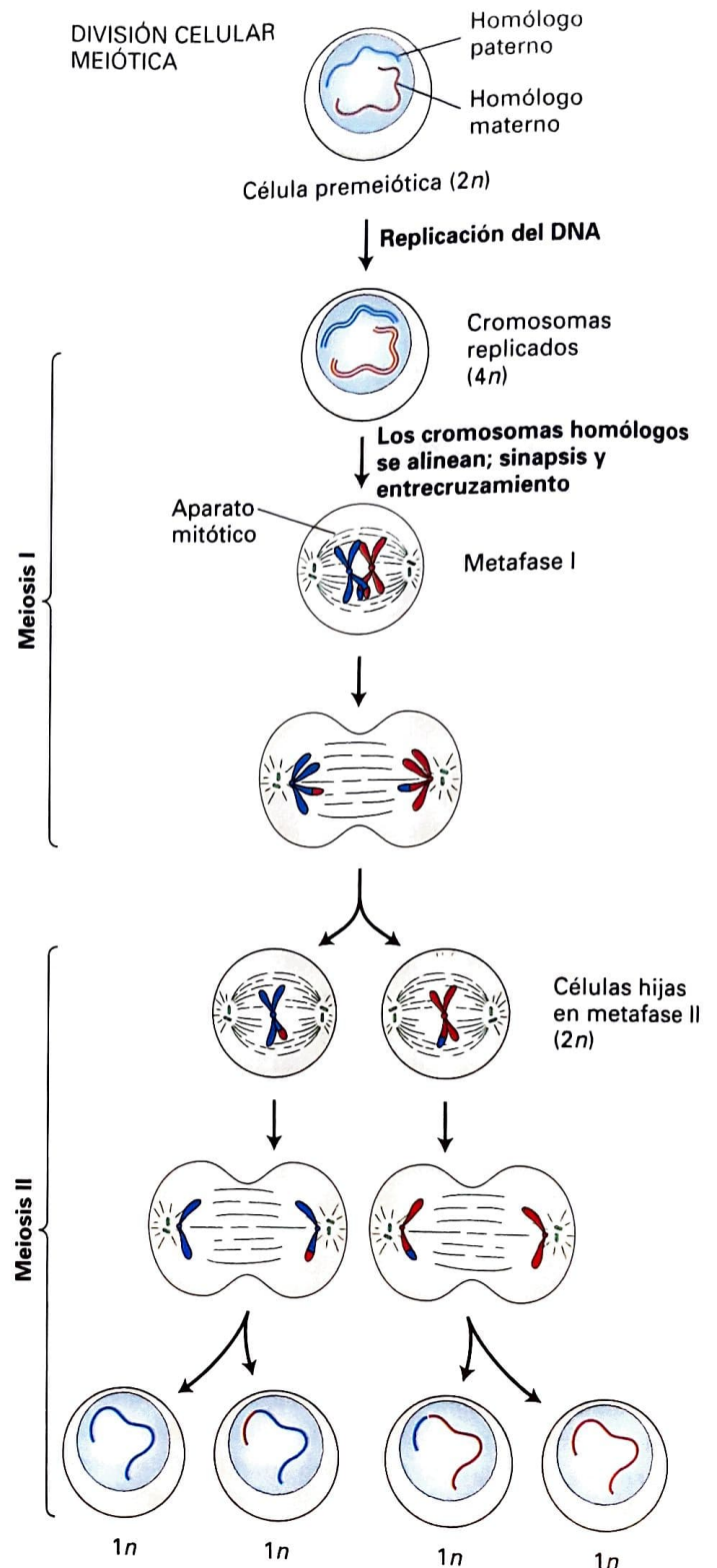
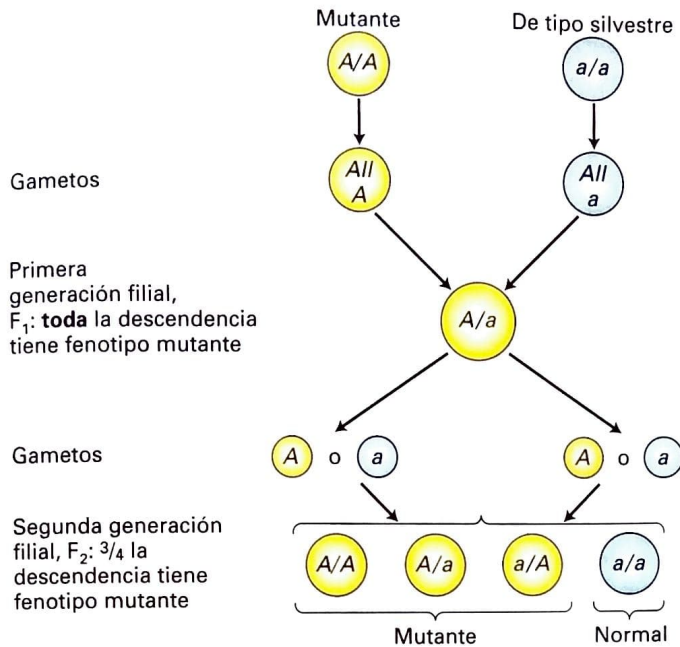


FIGURA 5-3 Comparación de la mitosis y la meiosis. Ambas células somáticas y las células germinales premeióticas tienen dos copias de cada cromosoma ($2n$), una materna y otra paterna. En la mitosis, los cromosomas replicados, cada uno compuesto por dos cromátidas hermanas, se alinean en el centro de la célula de forma tal que ambas células hijas reciben un homólogo paterno y uno materno de cada tipo morfológico de cromosoma. Durante la primera división meiótica, sin embargo, cada cromosoma replicado se aparea con su compañero homólogo en el centro de la célula; este apareamiento se denomina *sinapsis* y, en esta etapa, se evidencia el entrecruzamiento de

los cromosomas homólogos. Luego, un cromosoma replicado de cada tipo morfológico pasa a cada célula hija. Las células resultantes atraviesan una segunda división sin replicación del DNA, con la distribución de cada cromátida hermana de cada tipo morfológico en las células hijas. En la segunda división meiótica, el alineamiento de las cromátidas y su segregación en las células hijas es la misma que en la división mitótica. El alineamiento de los pares de cromosomas homólogos, en la metafase I, es aleatorio con respecto a los otros pares de cromosomas y da como resultado una mezcla de cromosomas derivados del padre y la madre en cada célula hija.

(a) Segregación de una mutación **dominante**



(b) Segregación de una mutación **recesiva**

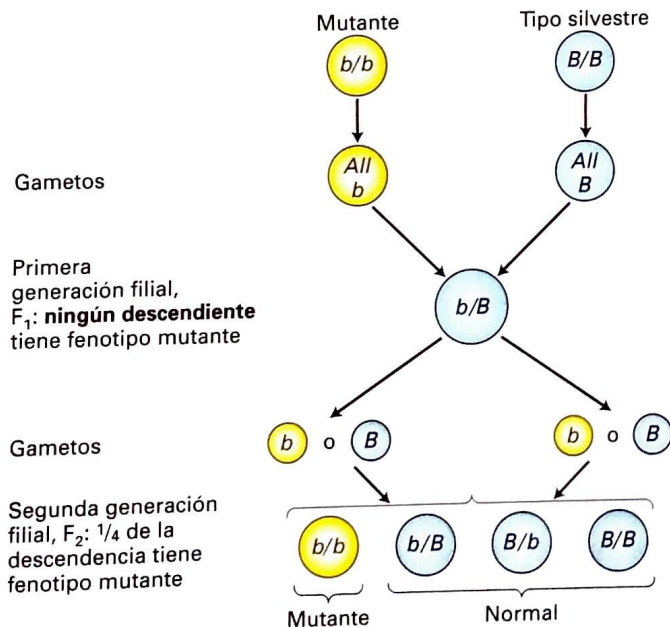


FIGURA 5-4 Patrones de segregación de las mutaciones dominantes y recesivas en los cruces entre líneas reales de organismos diploides. Toda la descendencia de la primera generación (F_1) es heterocigota. Si el alelo mutante es dominante, la descendencia F_1 exhibirá el fenotipo mutante, como en la parte (a). Si el alelo mutante es recesivo, la descendencia F_1 exhibirá el fenotipo de tipo silvestre, como en la parte (b). El cruce entre los heterocigotos de la F_1 también produce diferentes proporciones de segregación para alelos mutantes dominantes y recesivos en la generación F_2 .

En la meiosis, una ronda de replicación del DNA es seguida de dos divisiones celulares separadas que producen cuatro células haploides ($1n$) que contienen solo un cromosoma de cada par homólogo. La distribución, o segregación, de los cromosomas homólogos replicados a las células hijas durante la primera división meiótica es aleatoria; es decir, los homólogos derivados de la madre o padre se segregan independientemente y producen células hijas con diferentes mezclas de cromosomas maternos y paternos.

Como una forma de evitar la complejidad indeseada, los genetistas suelen empezar los experimentos de cruces con cepas que son homocigotas para los genes que se están examinando. En esas líneas puras (verdaderas), cada individuo recibirá el mismo alelo de cada progenitor; por lo tanto, la composición de los alelos no cambia a partir de una generación a la siguiente. Cuando una línea pura mutante es apareada con una línea pura de tipo silvestre, toda la primera generación filial (F_1) será heterocigota (Fig. 5-4). Si la progenie F_1 exhibe el rasgo mutante, entonces el alelo mutante es dominante; si la progenie F_1 exhibe el rasgo de tipo silvestre, el mutante es recesivo. Cruces posteriores entre los individuos F_1 también revelarán diferentes patrones de herencia según si la mutación es dominante o recesiva. Cuando los individuos F_1 que son heterocigotas para un alelo dominante se cruzan entre ellos, las tres cuartas partes de la progenie F_2 resultante exhibirá el rasgo mutante. Por el contrario, cuando los individuos F_1 que son heterocigotos para un alelo recesivo se cruzan entre sí, solo un cuarto de la progenie resultante F_2 exhibirá el rasgo mutante.

Como se mencionó anteriormente, la levadura *S. cerevisiae*, un organismo experimental importante, puede existir en estado haploide o diploide. En estos eucariontes unicelulares, los cruces entre las células haploides pueden determinar si un alelo mutante es dominante o recesivo. Las células de levadura haploide, que portan una copia de cada cromosoma, pueden ser de dos tipos de apareamiento diferentes conocidos como a y α . Las células haploides de tipo de apareamiento opuesto pueden aparearse para producir diploides a/α , que llevan dos copias de cada cromosoma. Si una mutación nueva con un fenotipo observable se aísla en una cepa haploide, la cepa mutante puede aparearse con una cepa de tipo silvestre con un tipo de apareamiento opuesto para producir los diploides a/α , que son heterocigotas para el alelo mutante. Si estos diploides exhiben el rasgo mutante, el alelo mutante es dominante; pero si los diploides aparecen como tipo silvestre, el alelo mutante es recesivo. Cuando los diploides a/α se colocan en condiciones de inanición, las células experimentan meiosis, lo que da lugar a un tétrada de cuatro esporas haploides, dos de tipo a y dos de tipo α . La esporulación de una célula diploide heterocigota produce dos esporas que llevan un alelo mutante y dos que llevan el alelo de tipo silvestre (Fig. 5-5). En condiciones adecuadas, las esporas de levaduras germinarán y producirán cepas haploides vegetativas de ambos tipos de apareamiento.

Pueden utilizarse mutaciones condicionales para estudiar genes esenciales en levaduras

Los procedimientos utilizados para identificar y aislar mutantes, denominados *detección genética* (*genetic screens*), dependen de si el organismo experimental es haploide o diploide, y si se trata de éste último, si la mutación es recesiva o dominante. Los genes que codifican proteínas esenciales para la vida están entre las más interesantes y más importantes para estudiar. Puesto que la expresión fenotípica de las mutaciones

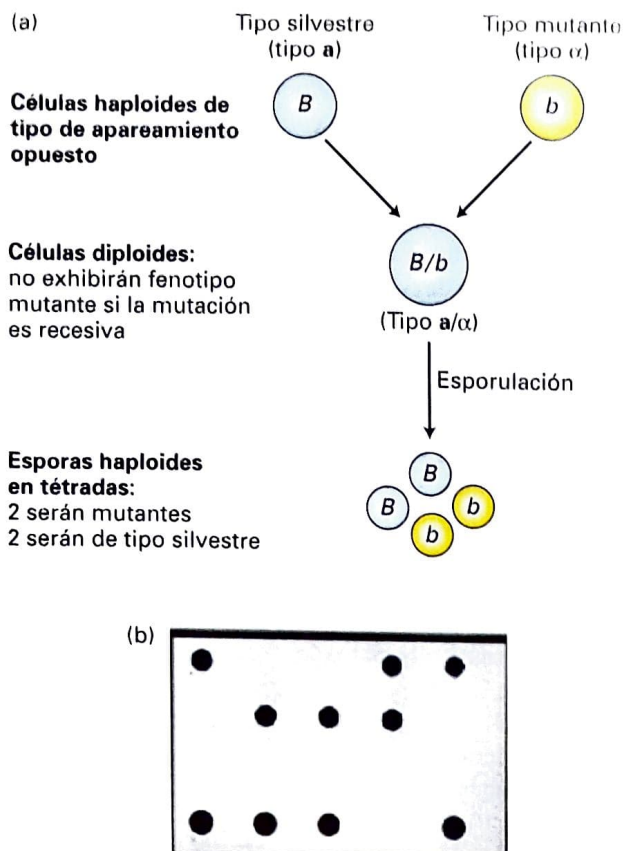


FIGURA 5-5 Segregación de los alelos en levaduras. (a) Las células haploides de *Saccharomyces* de tipo de apareamiento opuesto (p. ej., un tipo de apareamiento α y uno de tipo α) pueden producir un diploide α/α . Si un haploide lleva un alelo de tipo silvestre dominante y el otro lleva un alelo mutante recesivo del mismo gen, el diploide heterocigoto resultante expresará un rasgo dominante. Bajo ciertas condiciones, una célula diploide formará una tétrada de cuatro esporas haploides. Dos de las esporas en la tétrada expresarán el rasgo recesivo, y dos expresarán el rasgo dominante. (b) Si el fenotipo mutante no es viable bajo condiciones de crecimiento restrictivo, cada tétrada, mostrada aquí como cuatro esporas separadas verticalmente y crecidas en colonias en un medio restrictivo, consistirá en dos esporas viables y dos inviables. (Parte [b] de B. Senger y cols., 1998, *EMBO J* 17:2196.)

en genes esenciales conduce a la muerte de un individuo, se requieren ingeniosas detecciones genéticas para aislar y mantener organismos con una mutación letal.

En las células haploides, los genes esenciales pueden estudiarse a través del uso de las *mutaciones condicionales*. Entre las mutaciones condicionales más comunes, se encuentran las **mutaciones sensibles a la temperatura**, que pueden aislarse en las bacterias y los eucariontes inferiores, pero no en los eucariontes de sangre caliente. Por ejemplo, una mutación con sentido erróneo puede hacer que la proteína mutante resultante tenga una estabilidad térmica reducida de manera tal que la proteína sea completamente funcional a una determinada temperatura (p. ej., 23 °C) pero comience a desnaturizarse y sea inactiva a otra temperatura (p. ej., 36 °C), mientras que la proteína normal podría ser completamente estable y funcional a ambas temperaturas.

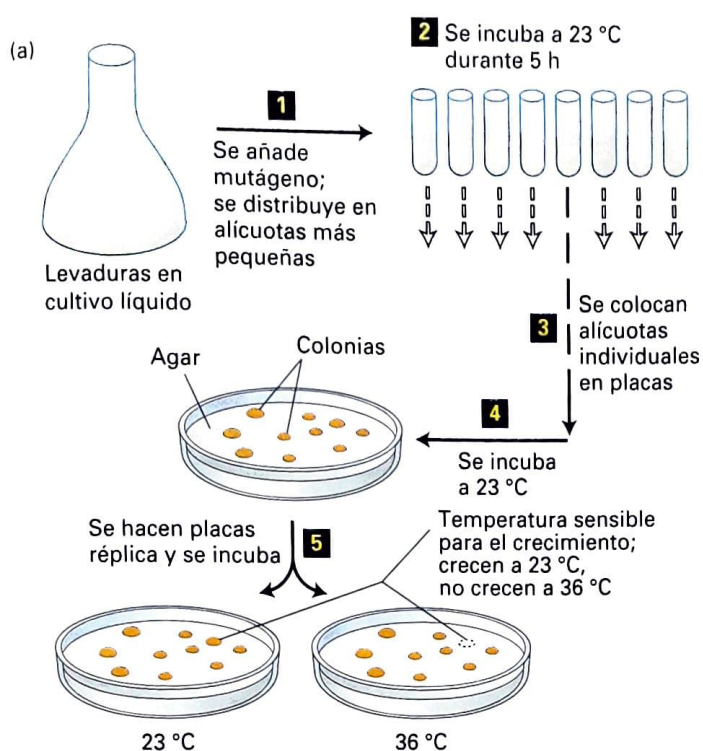
Una temperatura a la cual se observa el fenotipo mutante se denomina *no permisiva*; una temperatura *permisiva* es aquella a la cual el fenotipo mutante no se observa incluso si el alelo mutante está presente. Así, las cepas mutantes pueden mantenerse a una temperatura permisiva y luego subcultivarse a una temperatura no permisiva para el análisis del fenotipo mutante.

Un ejemplo de una detección particularmente importante para los mutantes sensibles a la temperatura en la levadura proviene de los estudios de L. H. Hartwell y cols., a fines de la década de 1960 y comienzos de la de 1970. Se propusieron identificar genes importantes en la regulación del ciclo celular durante el cual una célula sintetiza proteínas, replica su DNA y luego atraviesa la división celular mitótica, donde cada célula hija recibe una copia de cada cromosoma. El crecimiento exponencial de una única célula de levadura a partir de 20-30 divisiones celulares forma una colonia de levaduras visible sobre un medio de agar sólido. Como los mutantes con un bloqueo completo en el ciclo celular no serían capaces de formar una colonia, se requirieron mutantes condicionales para estudiar las mutaciones que afectan este proceso celular básico. Para detectar estos mutantes, los investigadores primero identificaron células de levadura mutagenizadas que podían crecer normalmente a 23 °C, pero que no podían formar colonias cuando se las colocaba a 36 °C (Fig. 5-6a).

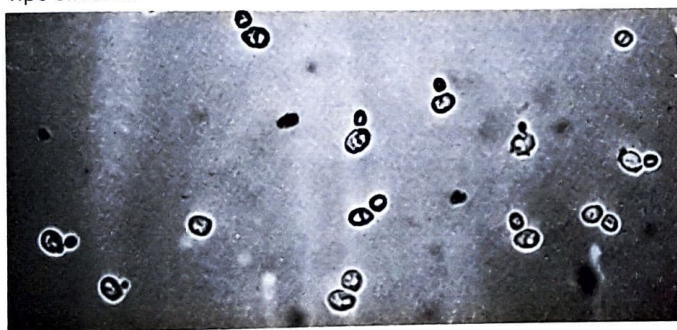
Una vez aislados los mutantes sensibles a la temperatura, el análisis posterior reveló que efectivamente resultaban defectuosos en la división celular. En *S. cerevisiae*, la división celular se produce a través de un proceso de gemación, y el tamaño del brote, que se visualiza fácilmente mediante microscopía óptica, indica una posición de la célula en el ciclo celular. Cada uno de los mutantes que no podía crecer a 36 °C se analizaron con microscopía después de varias horas a la temperatura no permisiva. El análisis de muchos mutantes diferentes sensibles a la temperatura reveló que alrededor del 1% exhibió un bloqueo distinto en el ciclo celular. Por lo tanto, estos mutantes fueron designados como mutantes *cdc* (ciclo división celular). Más importante aún, estos mutantes de levadura no fallaron simplemente al crecer, como hubiera sucedido si llevaran una mutación que afecta el metabolismo celular general. En lugar de ello, a la temperatura no permisiva, los mutantes de interés crecieron normalmente como parte del ciclo celular, pero luego se detuvieron en un estadio particular del ciclo celular, de manera tal que se observaron muchas células en este estadio (Fig. 5-6b). La mayoría de las mutaciones *cdc* en levadura son recesivas; es decir, cuando las cepas haploides *cdc* se aparean con haploides de tipo silvestre, los diploides heterocigotos resultantes no son ni sensibles a la temperatura ni defectuosos en la división celular.

Las mutaciones letales recesivas en los diploides pueden identificarse mediante endogamia y mantenerse en heterocigotos

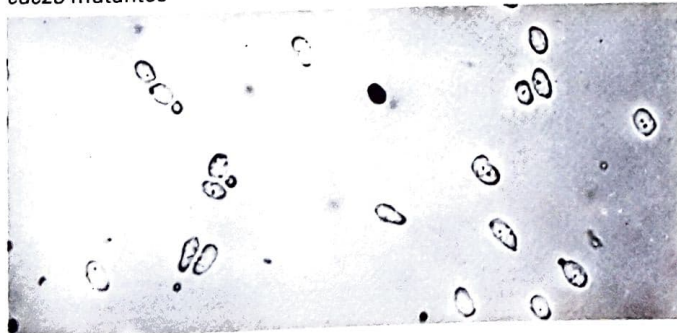
En los organismos diploides, los fenotipos resultantes de las mutaciones recesivas pueden observarse solo en los individuos homocigotos para los alelos mutantes. Puesto que la mutagénesis en un organismo diploide típicamente cambia solo un alelo de un gen y produce mutantes heterocigotos, la detección genética debe incluir pasos de endogamia, con el fin de producir una progenie que sea homocigota para los alelos mutantes. El genetista H. Muller desarrolló un procedimiento general y eficiente para llevar a cabo esos experimentos de



(b) Tipo silvestre



cdc28 mutantes



cdc7 mutantes

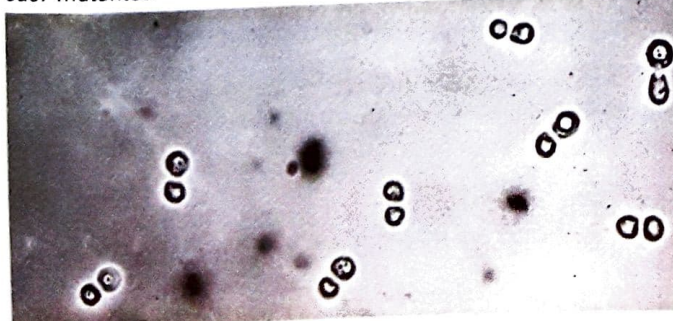


FIGURA EXPERIMENTAL 5-6 Las levaduras haploides que llevan mutaciones letales sensibles a la temperatura son mantenidas a temperatura permisiva y analizadas a temperatura no permisiva. (a) Búsqueda genética para los mutantes del ciclo de división celular (*cdc*) sensibles a la temperatura. Las levaduras que crecen y forman colonias a 23 °C (temperatura permisiva), pero no a 36 °C (temperatura no permisiva), pueden llevar una mutación letal que bloquee la división celular. (b) Ensayo de colonias sensibles a la temperatura para bloquear etapas específicas en el ciclo celular. Aquí se muestran microfotografías de mutantes de levadura de tipo silvestre y dos mutantes sensibles a la temperatura, después de la incubación a temperatura no permisiva, durante 6 horas. Las células de tipo silvestre, que continúan creciendo, pueden observarse con brotes de todos los tamaños, lo cual refleja las diferentes etapas en el ciclo celular. Por el contrario, las células en las dos microfotografías inferiores exhiben un bloqueo en un estadio específico del ciclo celular. Los mutantes *cdc28* se detienen en un punto antes de la aparición de un nuevo brote y, por lo tanto, aparecen como células que no brotaron. Los mutantes *cdc7*, que se detienen justo antes de la separación de la célula madre y el brote (célula hija emergente), aparecen como células con brotes grande.

(Parte [a] véase L. H. Hartwell, 1967, *J. Bacteriol.* **93**:1662; parte [b] de L. M. Hereford y L. H. Hartwell, 1974, *J. Mol. Biol.* **84**:445.)

endogamia en la mosca de la fruta *Drosophila*. Las mutaciones letales en *Drosophila* y otros organismos diploides pueden mantenerse en los individuos heterocigotos y sus consecuencias fenotípicas pueden analizarse en los homocigotos.

El enfoque de Muller fue utilizado con mayor efecto por C. Nüsslein-Volhard y E. Wieschaus, quienes detectaron sistemáticamente las mutaciones letales recesivas que afectan la embriogénesis en *Drosophila*. Los embriones homocigotos muertos que portaban mutaciones letales recesivas, identificadas mediante esta detección, se examinaron bajo el microscopio en busca de defectos morfológicos en los embriones. El entendimiento actual de los mecanismos moleculares subyacentes de los organismos multicelulares se basa, en gran medida, en el cuadro detallado del desarrollo embrionario revelado por la caracterización de estos mutantes de *Drosophila*.

Las pruebas de complementación determinan si diferentes mutaciones recesivas están en el mismo gen

En el enfoque genético para estudiar un proceso celular particular, los investigadores suelen aislar múltiples mutaciones recesivas que producen el mismo fenotipo. Una prueba común para determinar si estas mutaciones están en el mismo gen o en genes diferentes aprovecha el fenómeno de complementación genética, es decir, la restauración del fenotipo de tipo silvestre por apareamiento de dos mutantes diferentes. Si dos mutaciones recesivas, *a* y *b*, están en el mismo gen, un organismo diploide heterocigoto para ambas mutaciones (p. ej., que lleva un alelo *a* y un alelo *b*) exhibirá el fenotipo mutante, ya que ninguno de los alelos proporciona una copia funcional del gen. Por el contrario, si las mutaciones *a* y *b* están en genes separados, los heterocigotos que llevan una copia única de cada alelo mutante no exhibirán el fenotipo mutante debido a que también estará presente un alelo de tipo silvestre de cada gen.

En este caso, se dice que las mutaciones son complementarias entre sí. Las pruebas de complementación no pueden realizarse en mutantes dominantes porque el fenotipo conferido por el alelo mutante es visualizado incluso en la presencia de un alelo de tipo silvestre del gen.

Las pruebas de complementación de un grupo de mutantes que presenta el mismo fenotipo pueden distinguir los genes individuales de un grupo de genes relacionados funcionalmente; todos éstos deben funcionar para producir un rasgo fenotípico determinado. Por ejemplo, la detección de mutaciones *cdc* en *Saccharomyces*, descritas anteriormente, produce muchos mutantes sensibles a la temperatura, que aparecen detenidos en el mismo estadio del ciclo celular. Para determinar cuántos genes fueron afectados por estas mutaciones, Hartwell y cols. llevaron a cabo pruebas de complementación en todas las combinaciones de pares de mutantes *cdc* según el protocolo esquematizado en la Figura 5-7. Estas pruebas identificaron más de 20 genes *CDC* diferentes. La posterior caracterización molecular de los genes *CDC* y sus proteínas codificadas, como se describen en detalle en el Capítulo 20, ha proporcionado un esquema de trabajo para la

comprensión del modo en el que se regula la división celular en organismos que se encuentran entre las levaduras y los seres humanos.

Los dobles mutantes son útiles en la evaluación del orden en el cual funcionan las proteínas

Sobre la base del cuidadoso análisis de los fenotipos mutantes asociados a un proceso celular particular, los investigadores, a menudo, pueden deducir el orden en el cual funcionan un grupo de genes y sus productos proteicos. Dos tipos generales de proceso son compatibles con este análisis: (a) las vías biosintéticas en las cuales un precursor material es convertido por uno o más intermediarios en un producto final y (b) vías de señalización que regulan otros procesos e involucren el flujo de información en lugar de intermediarios químicos.

Ordenamiento de las vías biosintéticas Un ejemplo simple del primer tipo de proceso es la biosíntesis de un metabolito, como el ami-

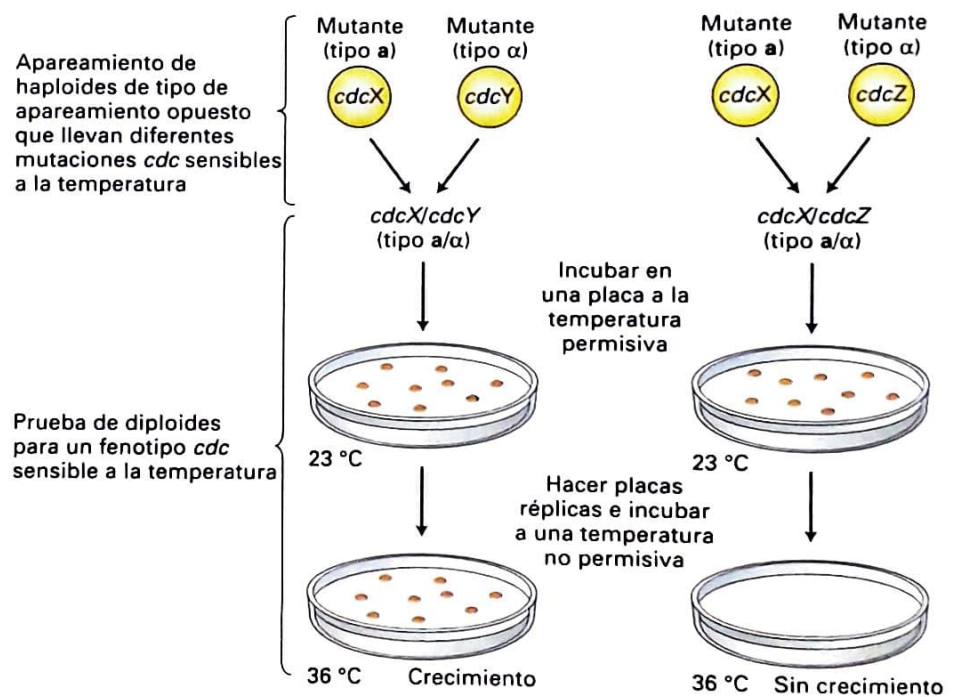
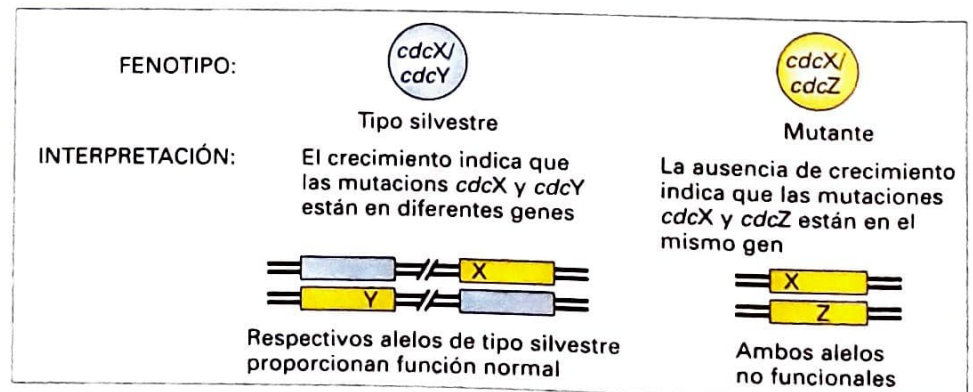


FIGURA EXPERIMENTAL 5-7 El análisis de complementación determina si las mutaciones recesivas están en el mismo gen o en genes diferentes. Los análisis de complementación en levaduras se llevan a cabo mediante células de apareamiento haploide *a* y *α* que llevan diferentes mutaciones recesivas para producir células diploides. En el análisis de las mutaciones *cdc*, se aparearon de forma sistemática diferentes pares de cepas *cdc* haploides sensibles a la temperatura, y los diploides resultantes se analizaron según su crecimiento bajo temperaturas permisiva y no permisiva. En este ejemplo hipotético, los mutantes *cdcX* y *cdcY* se complementan entre sí; por lo tanto, tienen mutaciones en diferentes genes, mientras que los mutantes *cdcX* y *cdcZ* tienen mutaciones en el mismo gen.



noácido triptófano, en las bacterias. En este caso, cada una de las enzimas requeridas para la síntesis del triptófano cataliza la conversión de uno de los intermediarios en la vía al siguiente. En *E. coli*, los genes que codifican estas enzimas se encuentran adyacentes uno con otro en el genoma, lo que constituye el operón *trp* (véase la Fig. 4-13a). El orden de acción de los diferentes genes para estas enzimas fue, inicialmente, deducido a partir del tipo de compuestos intermediarios que se acumulan en cada mutante. En el caso de las vías sintéticas complejas, sin embargo, el análisis fenotípico de los mutantes defectuosos en un solo paso puede dar resultados ambiguos que no permiten concluir el orden de los pasos. Los dobles mutantes defectuosos en dos pasos, en la vía, son particularmente útiles en el ordenamiento de dichas vías (Fig. 5-8a).

En el Capítulo 14, analizaremos el uso clásico de la estrategia de dobles mutantes para ayudar a elucidar la vía secretoria. En esta vía, las proteínas que serán secretadas desde la célula se mueven desde su sitio de síntesis, en el retículo endoplasmático rugoso (RE), hasta el complejo de Golgi; después, hasta las vesículas secretorias y, finalmente, hasta la superficie celular.

Ordenamiento de las vías de señalización Como se aprenderá en los últimos capítulos, la expresión de muchos genes eucariontes está regulada por las vías de señalización que son iniciadas por hormonas extracelulares, factores de crecimiento u otras señales. Estas vías de señalización pueden incluir numerosos componentes, y el análisis de dobles mutantes suele aportar elementos para una comprensión más profunda de las funciones y las interacciones de estos componentes. El único prerrequisito para la obtención de la información útil a partir de este tipo de análisis es que las dos mutaciones deben ejercer efectos opuestos en el resultado de la misma vía regulada. Más comúnmente, una mutación reprime la expresión de un gen informador particular incluso cuando la señal está presente, mientras que otra mutación produce la expresión de un gen informador incluso cuando la señal está ausente (p. ej., expresión constitutiva). Como se ilustra en la Figura 5-8b, dos mecanismos reguladores simples son coherentes con esos mutantes simples, pero el fenotipo del doble mutante puede distinguirse entre ellos. Este enfoque general ha permitido a genetistas delinear muchos pasos clave en la variedad de diferentes vías reguladoras y establecer la base para análisis bioquímicos más específicos.

Nótese que esta técnica difiere de las pruebas de complementación recién descritas, en las que ambos mutantes —dominante y recesivo— pueden someterse a un análisis de dobles mutantes. Cuando se evalúan dos mutaciones recesivas, el doble mutante creado debe ser *homocigoto* para ambas mutaciones. Además, los mutantes dominantes pueden someterse a análisis de dobles mutantes.

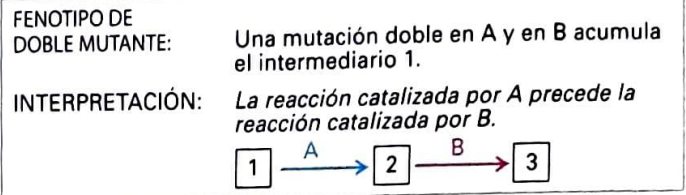
La supresión genética y la letalidad sintética pueden revelar proteínas interactuantes o redundantes

Otros dos tipos de análisis genéticos pueden aportar pistas adicionales acerca de cómo las proteínas que funcionan en los mismos procesos celulares pueden interactuar unas con otras en la célula viva. Ambos métodos, que se aplican en muchos organismos experimentales, implican el uso de mutantes dobles en los cuales los efectos fenotípicos de una mutación son modificados por la presencia de una segunda mutación.

(a) Análisis de una vía biosintética

Una mutación en A acumula el intermediario 1.

Una mutación en B acumula el intermediario 2.



(b) Análisis de una vía de señalización

Una mutación en A da una expresión reprimida del informador
Una mutación en B da una expresión constitutiva del informador

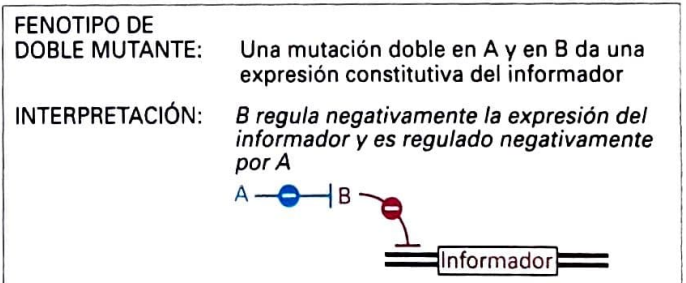
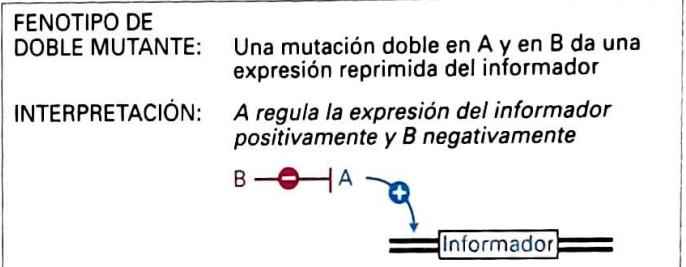


FIGURA 5-8 El análisis de dobles mutantes suele poder ordenar los pasos en las vías biosintéticas o de señalización. Cuando las mutaciones en dos genes diferentes afectan el mismo proceso celular pero tienen diferentes fenotipos distintivos, el fenotipo de doble mutante puede revelar el orden en el cual deben funcionar los dos genes. (a) En el caso de las mutaciones que afectan la misma vía biosintética, un mutante doble acumulará el intermediario inmediatamente antes del paso catalizado por la proteína que actúa más temprano en el organismo de tipo silvestre. (b) El análisis de dobles mutantes de una vía de señalización es posible si dos mutaciones tienen efectos opuestos en la expresión de un gen informador. En este caso, el fenotipo observado del doble mutante proporciona información acerca del orden en el cual las proteínas actúan y si ellos son reguladores positivos o negativos.

Mutaciones supresoras El primer tipo de análisis se basa en la *supresión genética*. Para comprender este fenómeno, suponga que las mutaciones puntuales conducen a cambios estructurales en una proteína (A) que interrumpe su capacidad de asociarse con otra proteína (B) involucrada en el mismo proceso celular. De manera similar, las mutaciones en la proteína B ocasionan pequeños cambios estructurales que inhiben su capacidad de interactuar con las proteínas A. Más aún, asumamos que el funcionamiento normal de las proteínas A y B depende de sus interacciones. En teoría, un cambio estructural específico en la proteína A podría ser suprimido por cambios compensatorios en la

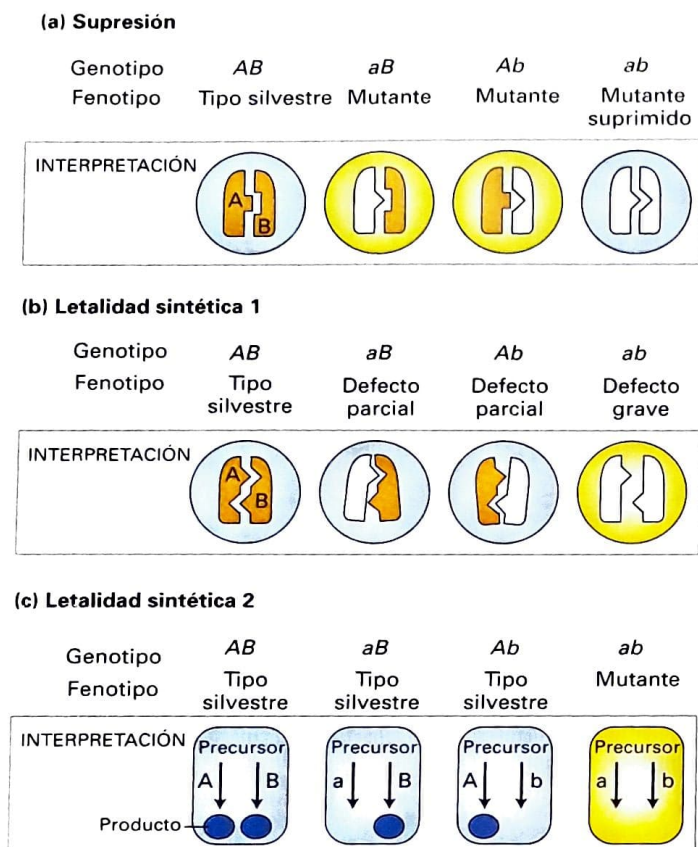


FIGURA 5-9 Las mutaciones que derivan de la supresión genética o de la letalidad sintética revelan interacción o proteínas redundantes. (a)

La observación de que los dobles mutantes con dos proteínas defectuosas (A y B) tienen un fenotipo de tipo silvestre pero que los mutantes simples dan un fenotipo mutante indica que la función de cada proteína depende de la interacción con el otro. (b) La observación de que los dobles mutantes tienen un defecto fenotípico más grave que los mutantes simples también evidencia que dos proteínas (p. ej., subunidades de un heterodímero) deben interactuar para funcionar normalmente. (c) La observación de que un doble mutante no es viable pero que los correspondientes mutantes simples tienen el fenotipo de tipo silvestre indica que dos proteínas funcionan en vías redundantes para producir un producto esencial.

proteína B y permitir que las proteínas mutantes interactúen. En casos raros en los cuales se producen tales mutaciones supresoras, las cepas que portan ambos alelos mutantes podrían ser normales, mientras que aquellas que portan solo uno de los alelos mutantes podrían tener un fenotipo mutante (Fig. 5-9a).

La observación de que la supresión genética en las cepas de levadura que portan un alelo de actina mutante (*act1-1*) y una segunda mutación (*sac6*) en otro gen proporcionan evidencia temprana para una interacción directa *in vivo* entre las proteínas codificadas por los dos genes. Estudios bioquímicos posteriores demostraron que estas dos proteínas –Act 1 y Sac6– efectivamente interactúan en la construcción de estructuras de actina funcionales dentro de la célula.

Mutaciones letales sintéticas Otro fenómeno, denominado *letalidad sintética*, produce un efecto fenotípico opuesto al de la supresión. En

este caso, el efecto deletéreo de una mutación es enormemente exacerbado (en lugar de suprimido) por una segunda mutación en un gen relacionado. Una situación en la cual dichas mutaciones letales sintéticas pueden producirse se ilustra en la Figura 5-9b. En este ejemplo, una proteína heterodimérica es inactivada de forma parcial, pero no por completo, mediante mutaciones en cualquiera de las subunidades no idénticas. Sin embargo, en los dobles mutantes que portan mutaciones específicas en los genes que codifican ambas subunidades, se produce poca interacción entre las subunidades, lo que da como resultado efectos fenotípicos graves. Las mutaciones letales sintéticas pueden revelar genes no esenciales cuyas proteínas codificadas funcionan en las vías redundantes para la producción de un componente celular esencial. Como se describe en la Figura 5-9c, si cualquier vía sola es inactivada por una mutación, la otra vía será capaz de suministrar el producto necesario. Sin embargo, si ambas vías son inactivadas al mismo tiempo, el producto esencial no puede ser sintetizado, y los dobles mutantes no serán viables.

Pueden identificarse genes mediante su posición en el mapa en el cromosoma

La descripción anterior del análisis genético ilustra cómo los genetistas pueden profundizar su conocimiento acerca de la función de un gen mediante la observación de los efectos fenotípicos producidos al unir diferentes combinaciones de alelos mutantes en la misma célula u organismo. Por ejemplo, las combinaciones de los alelos diferentes del mismo gen, en un diploide, pueden utilizarse para determinar si una mutación es dominante o recesiva o si dos mutaciones recesivas diferentes están en el mismo gen. Por otra parte, las combinaciones de mutaciones en distintos genes pueden usarse para determinar el orden de la función génica en una vía o para identificar relaciones funcionales entre genes. En términos generales, todos estos métodos pueden considerarse como pruebas analíticas basadas en la *función génica*. A continuación, se hará referencia a un tipo diferente de prueba genética basada en la *posición génica*. Los estudios diseñados para determinar la posición de un gen en un cromosoma, con frecuencia, se designan como estudios de mapeo genético; pueden utilizarse para identificar el gen afectado por una mutación particular o para determinar si dos mutaciones están en el mismo gen.

En muchos organismos, los estudios de mapeo genético se basan en el intercambio de información genética que se produce durante la meiosis. Como se mostró en la Figura 5-10a, la **recombinación** genética se produce antes de la primera división celular meiótica en las células germinales, cuando los cromosomas replicados de cada par homólogo se alinean entre sí. En ese momento, las secuencias homólogas de DNA en las cromátidas paternas y maternas derivadas pueden intercambiarse entre sí, un proceso que se conoce como entrecruzamiento. Actualmente, se sabe que los entrecruzamientos resultantes entre cromosomas homólogos proveen conexiones que son importantes para la segregación adecuada de pares de cromátidas homólogas a los polos opuestos durante la primera división celular meiótica (para el análisis véase el Capítulo 19).

Considérense dos mutaciones diferentes, una heredada de cada progenitor, que se localizan cerca, una de otra, en el mismo cromosoma. Pueden producirse dos tipos diferentes de gametos, según si se produce un entrecruzamiento entre las mutaciones durante la meiosis. Si no hay entrecruzamiento entre ellos, se producirán los gametos co-

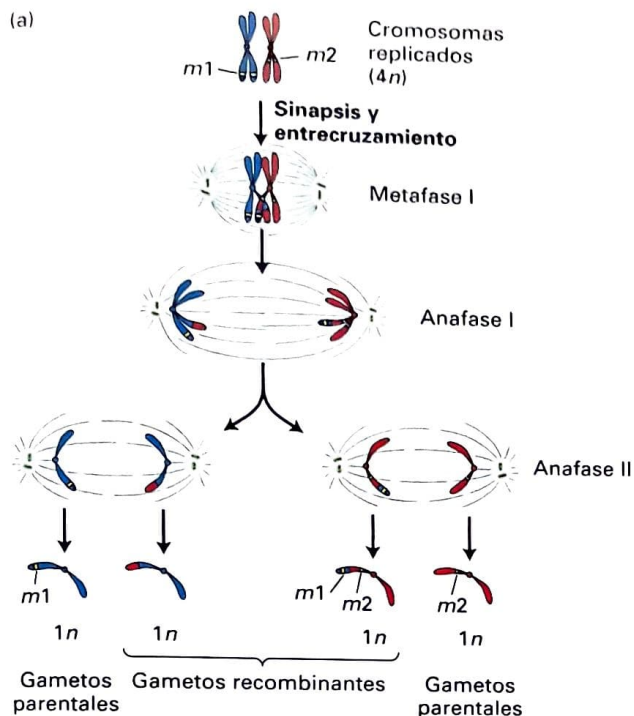


FIGURA 5-10 La recombinación durante la meiosis puede ser utilizada para mapear la posición de los genes. (a) Se muestra un individuo portador dos mutaciones, designadas *m1* (amarillo) y *m2* (verde), que están en las versiones materna y paterna del mismo cromosoma. Si el entrecruzamiento se produce en un intervalo entre *m1* y *m2* en la primera división meiótica, se generan los dos gametos recombinantes; uno lleva *m1* y *m2*, mientras que el otro no lleva ninguna de las mutaciones. Cuanto más grande es la distancia entre las dos mutaciones en una cromátida, más probable es que sean separa-

(b) Considere dos genes ligados, *A* y *B*, con alelos *a* y *b*.

Cruzamiento de dos mutantes para construir una cepa doblemente heterocigoto:

$$A/A\ b/b \times a/a\ B/B$$

$$\frac{A}{a} \frac{b}{B}$$

Cruzamiento de dobles heterocigotos para probar la cepa:

$$\frac{A}{a} \frac{b}{B} \times \frac{a}{a} \frac{b}{b}$$

$$\begin{array}{cc} \frac{A}{a} \frac{b}{b} & \frac{a}{a} \frac{B}{b} \\ \text{Tipos parentales} & \text{Tipos recombinantes} \end{array}$$

La distancia genética entre *A* y *B* puede determinarse a partir de la frecuencia de los gametos recombinantes y parentales:

$$\text{Distancia genética en cM} = 100 \times \frac{\text{Gametos recombinantes}}{\text{Gametos totales}}$$

das por recombinación y mayor es la proporción de gametos recombinantes producidos. (b) En un típico experimento de mapeo, se construye una cepa que es heterocigota para dos genes diferentes. La frecuencia de los gametos recombinantes o parentales producidos por esta cepa puede determinarse a partir de los fenotipos de la progenie, en cruzamiento prueba con una cepa homocigota recesiva. La distancia del mapa genético en centimorgans (cM) está dada como el porcentaje de los gametos que son recombinantes.

nocidos como *tipos parentales*, que contienen una o dos mutaciones. Por el contrario, si se produce un entrecruzamiento entre las dos mutaciones, se generarán los gametos conocidos como *tipos recombinantes*. En este ejemplo, los cromosomas recombinantes contendrán ambas mutaciones o ninguna de estas. Los sitios de recombinación se presentan más o menos al azar a lo largo de la longitud de los cromosomas; de este modo, cuanto más juntos estén dos genes, es menos probable que se produzca la recombinación entre estos durante la meiosis. En otras palabras, *cuanto menor es la frecuencia de recombinación entre dos genes en el mismo cromosoma, más cerca se encuentran entre sí*. Dos genes en el mismo cromosoma que están lo suficientemente cerca entre sí, de manera tal de que se produzcan significativamente menos gametos recombinantes que gametos parentales, se considera que están *ligados genéticamente*.

La técnica de mapeo de recombinación fue utilizada por primera vez en 1911 por A. Sturtevant mientras realizaba su trabajo de licenciatura en el laboratorio de T. H. Morgan en la Universidad de Columbia. Originalmente utilizada en estudios de *Drosophila*, esta técnica aún se usa en la actualidad para evaluar la distancia entre dos loci genéticos en el mismo cromosoma en muchos organismos experimentales. Un típico experimento diseñado para determinar la distancia en el mapa entre dos posiciones genéticas involucra dos pasos. En el primer paso,

se diseña una cepa que porte una mutación diferente en cada posición o locus. En el segundo paso, la progenie de esta cepa se analiza para determinar la frecuencia relativa de herencia de tipos recombinante o parental. Una vía típica para determinar la frecuencia de recombinación entre dos genes es cruzar un progenitor heterocigota diploide, en cada uno de los loci genéticos, con otro progenitor homocigota para cada gen. De este cruzamiento, la proporción de progenie recombinante se determina rápidamente debido a que los fenotipos recombinantes diferirán de los fenotipos parentales. Por convención, una *unidad de un mapa genético* se define como la distancia entre dos posiciones a lo largo de un cromosoma que produce un individuo recombinante en una progenie total de 100. La distancia correspondiente a esta frecuencia de recombinación del 1% se denomina *centimorgan* (cM), en honor al mentor de Sturtevant, Morgan (Fig. 5-10b).

Un examen completo de los métodos de experimentos de mapeo genético está más allá de los objetivos de este análisis introductorio; sin embargo, es necesario enfatizar dos características particulares de la medición de distancias por mapeo de recombinación. En primer lugar, la frecuencia de intercambio genético entre dos loci es estrictamente proporcional a la distancia física, en pares de bases, que los separa solo para los loci que están relativamente juntos uno con el otro (es decir, a menos de aproximadamente 10 cM). Para los loci ligados que están

más separados, una distancia medida por la frecuencia de intercambio genético tiende a subestimar la distancia física debido a la posibilidad de que se produzcan dos o más entrecruzamientos dentro de un intervalo. En el caso límite en el cual el número de tipos recombinantes fuera igual al número de tipos parentales, los dos loci considerados estarían separados en el mismo cromosoma o en cromosomas diferentes; y en esos casos, los loci considerados *no* están ligados.

Un segundo concepto importante necesario para la interpretación de los experimentos de mapeo genético en diferentes tipos de organismos es que, aunque la distancia genética se define de la misma forma para los diferentes organismos, la relación entre frecuencia de recombinación (p. ej., la distancia de mapa genético) y la distancia física varía entre los organismos. Por ejemplo, el 1% de frecuencia de recombinación (p. ej., una distancia genética de 1 cM) representa una distancia física de alrededor de 2,8 kilobases en levaduras, en comparación con una distancia de aproximadamente 400 kilobases en *Drosophila* y cerca de 780 kilobases en los seres humanos.

Uno de los principales usos del estudio de mapeo genético es para localizar el gen afectado por una mutación de interés. La presencia de muchos rasgos genéticos diferentes, o marcadores genéticos, ya mapeados y distribuidos en toda la longitud de un cromosoma permite determinar la posición de una mutación no mapeada mediante evaluación de su segregación con respecto a estos marcadores genéticos durante la meiosis. Así, cuantos más marcadores estén disponibles, con más precisión se podrá mapear una mutación. En la Sección 5.4 veremos cómo los genes afectados en las enfermedades humanas hereditarias pueden identificarse mediante la utilización de estos métodos. Un segundo uso general de los experimentos de mapas consiste en determinar si dos mutaciones diferentes están en el mismo gen. Si dos mutaciones se encuentran en el mismo gen, éstos exhibirán un fuerte **ligamiento** en los experimentos de mapeo; pero si éstas están en genes diferentes, por lo general no estarán ligados o exhibirán ligamiento débil.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 5.1

Análisis genético de mutaciones para identificar y estudiar genes

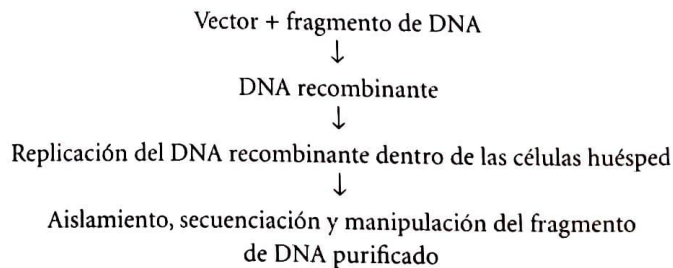
- Los organismos diploides portan dos copias (alelos) de cada gen, mientras que los organismos haploides solo portan una.
- Las mutaciones recesivas conducen a una pérdida de función, que está enmascarada si un alelo normal del gen está presente. Para que se produzca el fenotipo mutante, ambos alelos deben portar la mutación.
- Las mutaciones dominantes conducen a un fenotipo mutante en presencia de un alelo normal del gen. Los fenotipos asociados con las mutaciones dominantes suelen representar una ganancia de función; pero, en el caso de algunos genes, dan como resultado la pérdida de función.
- En la meiosis, una célula diploide sufre una replicación del DNA y dos divisiones celulares, por lo que da cuatro células haploides en las cuales los cromosomas paterno y materno y sus alelos asociados se distribuyen de forma aleatoria (véase la Fig. 5-3).

- Las mutaciones dominantes y recesivas exhiben patrones de segregación característicos en los cruzamientos genéticos (véase la Fig. 5-4).
- En las levaduras haploides, las mutaciones sensibles a la temperatura son particularmente útiles para la identificación y el estudio de genes esenciales para la supervivencia.
- El número de genes relacionados funcionalmente involucrados en un proceso puede definirse mediante un análisis de complementación (véase la Fig. 5-7).
- El orden en el cual funcionan los genes en una vía de señalización se puede deducir a partir del fenotipo de dobles mutantes defectuosos en dos pasos en los procesos afectados.
- Pueden deducirse las interacciones significativas, desde el punto de vista funcional, entre proteínas a partir de los efectos fenotípicos de las mutaciones supresoras alelo específicas o de las mutaciones letales sintéticas.
- Los experimentos de mapeo genético utilizan el entrecruzamiento entre cromosomas homólogos durante la meiosis para medir la distancia genética entre dos mutaciones diferentes en el mismo cromosoma.

5.2 Clonación del DNA y caracterización

Los estudios detallados de la estructura y función de un gen a nivel molecular requieren grandes cantidades de un gen individual en forma pura. Se utiliza una variedad de técnicas, conocidas como *tecnología de DNA recombinante*, en la **clonación del DNA**, lo cual permite que los investigadores preparen grandes cantidades de moléculas de DNA idénticas. El **DNA recombinante** es simplemente cualquier molécula de DNA compuesta por secuencias derivadas de diversas fuentes.

La clave para clonar un fragmento de DNA de interés es unirlo a una molécula de DNA vector que puede replicarse dentro de una célula huésped. Después de que una sola molécula de DNA recombinante —compuesta por un vector más un fragmento de DNA insertado— se introduce en una célula huésped, el DNA insertado se replica junto con el vector, y se genera una gran cantidad de moléculas de DNA idénticas. El esquema básico puede resumirse de la siguiente manera:



Aunque los investigadores han hallado numerosas variaciones experimentales, este diagrama de flujo indica los pasos esenciales para la clonación del DNA. En esta sección, primero se describen métodos para el aislamiento de una secuencia de DNA específica, a partir de un mar de otras secuencias de DNA. Este proceso suele involucrar el cor-

te del genoma en fragmentos y luego la ubicación de cada fragmento en un vector, de manera tal que el conjunto completo pueda ser propagado a moléculas recombinantes en células huéspedes separadas. Existen numerosos tipos diferentes de vectores; nuestro análisis se centrará, principalmente, en los vectores plasmídicos en las células huéspedes de *E. coli*, que se utilizan comúnmente. Después, pueden emplearse diversas técnicas para identificar la secuencia de interés a partir de este conjunto de fragmentos de DNA, conocidos como una biblioteca. Una vez que se aísla un fragmento de DNA específico, éste es típicamente caracterizado para determinar la secuencia exacta de nucleótidos en la molécula. Finalizaremos con un análisis de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Esta técnica útil y versátil puede usarse de varias maneras para generar grandes cantidades de una secuencia específica y, de otro modo, manipular el DNA en el laboratorio. Los diversos usos de los fragmentos de DNA clonado se analizan en las siguientes secciones.

Las enzimas de restricción y las DNA ligasas permiten la inserción de los fragmentos de DNA dentro de los vectores de clonación

Un objetivo importante de la clonación del DNA es obtener regiones discretas y pequeñas de un DNA del organismo constituido por genes específicos. Además, solo moléculas de DNA relativamente pequeñas pueden ser clonadas en cualquiera de los vectores disponibles. Por ello, las moléculas de DNA muy largas que componen el genoma de un organismo deben cortarse en fragmentos que pueden insertarse en el vector de DNA. Dos tipos de enzimas —**enzimas de restricción** y DNA ligasas— facilitan la producción de estas moléculas de DNA recombinante.

Corte de moléculas de DNA en fragmentos pequeños Las enzimas de restricción son endonucleasas producidas por las bacterias que típicamente reconocen secuencias específicas de 4- a 8-pb, que se denominan *sitios de restricción*, y luego corta ambas hebras de DNA en este sitio. Los sitios de restricción suelen ser secuencias *palindrómicas*; es decir, la secuencia del sitio de restricción es la misma en cada hebra de DNA cuando se lee en dirección 5' a 3' (Fig. 5-11).

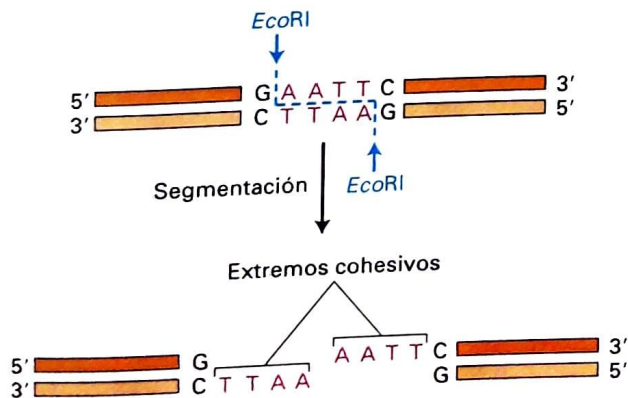


FIGURA 5-11 Escisión del DNA mediante la enzima de restricción EcoRI. Esta enzima de restricción de *E. coli* realiza cortes escalonados en la secuencia específica palindrómica de 6 pb, que se muestra, y produce fragmentos con extremos "cohesivos" complementarios de hélice sencilla. Muchas otras enzimas de restricción también producen fragmentos con extremos pegajosos.

Para cada enzima de restricción, la bacteria también produce una *enzima de modificación*, que protege el DNA propio de la bacteria huésped de la fragmentación al modificar el DNA huésped en cada sitio particular de rotura o cerca de éste. La enzima de modificación añade un grupo metilo a una o dos bases, en general, dentro del sitio de restricción. Cuando un grupo metilo está presente allí, se evita que la endonucleasa de restricción corte el DNA. Junto con la endonucleasa de restricción, la enzima metilante forma un sistema de modificación-restricción que protege el DNA huésped mientras destruye al DNA entrante (es decir, DNA bacteriano o captación de DNA durante la transformación) mediante la fragmentación de éste en todos los sitios de restricción del DNA.

Muchas enzimas de restricción realizan cortes escalonados en las dos hebras en sus sitios de reconocimiento, lo que genera fragmentos que tienen una "cola" de hélice sencilla en ambos extremos, *extremos cohesivos* (véase la Fig. 5-11). Las colas, en los fragmentos generados en un sitio de restricción determinado, son complementarias a aquellas en todos los otros fragmentos generados por la misma enzima de restricción. A temperatura ambiente, estas regiones de una hélice pueden formar apareamiento transitorio de bases con los de otros fragmentos generados con la misma enzima de restricción. Unas pocas enzimas de restricción, como *AluI* y *SmaI*, cortan ambas hebras de DNA en el mismo punto dentro del sitio de restricción y producen fragmentos con extremos "romos" en los cuales todos los nucleótidos, en los extremos de los fragmentos, forman apareamiento de bases con los nucleótidos en la hebra complementaria.

El DNA aislado a partir de un organismo individual tiene una secuencia específica que, por puro azar, contendrá un conjunto específico de sitios de restricción. De este modo, una enzima de restricción determinada cortará el DNA de una fuente particular en un conjunto de fragmentos denominados fragmentos de restricción. La frecuencia con la cual una enzima de restricción corta el DNA, y por lo tanto el tamaño promedio de los fragmentos de restricción resultantes, depende en gran medida de la longitud del sitio de restricción. Por ejemplo, una enzima de restricción que reconoce un sitio de 4-pb cortará el DNA en un promedio de una vez cada 4^4 , o 256, pares de bases, mientras que una enzima que reconoce una secuencia de 8-pb cortará el DNA, en promedio, una vez cada 4^8 pares de bases (~ 65 kpb). Se han purificado enzimas de restricción a partir de cientos de especies diferentes de bacterias, lo que permite que las moléculas de DNA sean cortadas en una gran cantidad de secuencias distintas correspondientes a los sitios de reconocimiento de estas enzimas (Cuadro 5-1).

Inserción de los fragmentos de DNA en los vectores Los fragmentos de DNA con fragmentos cohesivos o extremos romos pueden insertarse en el vector de DNA con la ayuda de la DNA ligasa. Durante la replicación del DNA normal, la DNA ligasa cataliza la unión de extremo con extremo (ligación) de los fragmentos cortos de DNA llamados fragmentos de Okazaki. A los fines de la clonación, la DNA ligasa purificada se utiliza para unir, de manera covalente, los extremos de un fragmento de restricción y el vector de DNA que posee extremos complementarios (Fig. 5-12). El DNA vector y el fragmento de restricción se unen en forma covalente a través del enlace fosfodiéster estándar 3' a 5' del DNA. Además de unir los extremos cohesivos complementarios, la DNA ligasa del bacteriófago T4 puede unir dos extremos romos cualesquiera. Sin embargo, la unión de extremo romo es inherentemente ineficiente y requiere una concentración mayor, tanto de DNA como de DNA ligasa, que lo que se necesita para la unión de los extremos cohesivos.

Cuadro 5-1 Enzimas de restricción seleccionables y sus secuencias de reconocimiento

Enzima	Microorganismo fuente	Sitio de reconocimiento*	Extremos producidos
<i>Bam</i> HI	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	↓ -G-G-A-T-C-C- -C-C-T-A-G-G- ↑	Cohesivos
<i>Sau</i> 3A	<i>Staphylococcus aureus</i>	↓ -G-A-T-C- -C-T-A-G- ↑	Cohesivos
<i>Eco</i> RI	<i>Escherichia coli</i>	↓ -G-A-A-T-T-C- -C-T-T-A-A-G- ↑	Cohesivos
<i>Hind</i> III	<i>Haemophilus influenzae</i>	↓ -A-A-G-C-T-T- -T-T-C-G-A-A- ↑	Cohesivos
<i>Sma</i> I	<i>Serratia marcescens</i>	↓ -C-C-C-G-G-G- -C-C-C-G-G-G- ↑	Romos
<i>Not</i> I	<i>Nocardia otitidis-cavitarum</i>	↓ -G-C-G-G-C-C-G-C- -C-G-C-C-G-G-C-G- ↑	Cohesivos

*Muchas de estas secuencias de reconocimiento están incluidas en las secuencias de los policonectores (véase la Fig. 5-13).

Los vectores plasmídicos de *E. coli* son adecuados para clonar fragmentos aislados de DNA

Los plásmidos son moléculas circulares de DNA doble hebra (dDNA) que están separadas del DNA cromosómico de la célula. Estos DNA extracromosómicos, que se producen en la naturaleza en las bacterias y en las células eucariontes inferiores (p. ej., levaduras), existen en una relación simbiótica o parasitaria con su célula huésped. Al igual que el DNA cromosómico de la célula huésped, el DNA plasmídico se duplica antes de cada división celular. Durante la división celular, las copias del DNA plasmídico se segregan a cada célula hija, con lo que se asegura la propagación continua del plásmido a través de sucesivas generaciones de la célula huésped.

Los plásmidos más comúnmente utilizados en la tecnología del DNA recombinante son aquellos que se replican en *E. coli*. Los investigadores han diseñado estos plásmidos para optimizar su uso como vectores en la clonación de DNA. Por ejemplo, la eliminación de porciones innecesarias de los plásmidos naturales de *E. coli* produce vectores plasmídicos de aproximadamente 1,2-3 kb de longitud circunferencial que contienen tres regiones esenciales para la clonación del DNA: un origen de replicación; un marcador que permite la selección, en general, un gen de resistencia a un fármaco y una región en la cual pueden

insertarse los fragmentos exógenos (Fig. 5-13). Las enzimas de la célula huésped replican el plásmido comenzando en el origen de replicación (ORI), una secuencia específica de DNA de 50-100 pares de bases. Una vez que se inicia la replicación en ORI, continúa alrededor del plásmido circular, independientemente de su secuencia nucleotídica. Así, cualquier secuencia de DNA insertada en un plásmido se replica junto con el resto del DNA plasmídico.

La Figura 5-14 describe el procedimiento general para la clonación de un fragmento de DNA mediante el uso de vectores de plásmido de *E. coli*. Cuando las células de *E. coli* se mezclan con el DNA vector recombinante bajo ciertas condiciones, una fracción pequeña de las células incorporará el DNA del plásmido, un proceso conocido como **transformación**. En general, 1 célula en alrededor de 10 000 incorpora una *única* molécula de DNA plasmídico y, por ende, se transforma. Después de que se incuban los vectores plasmídicos con *E. coli*, aquellas células que incorporan el plásmido pueden seleccionarse fácilmente entre el número mucho mayor de células. Por ejemplo, si el plásmido lleva un gen que confiere resistencia al antibiótico ampicilina, las células transformadas pueden seleccionarse al cultivarlas en un medio con ampicilina.

Los fragmentos de DNA de unos pocos pares de bases de hasta ~ 10 kb pueden insertarse en los vectores plasmídicos. Cuando un

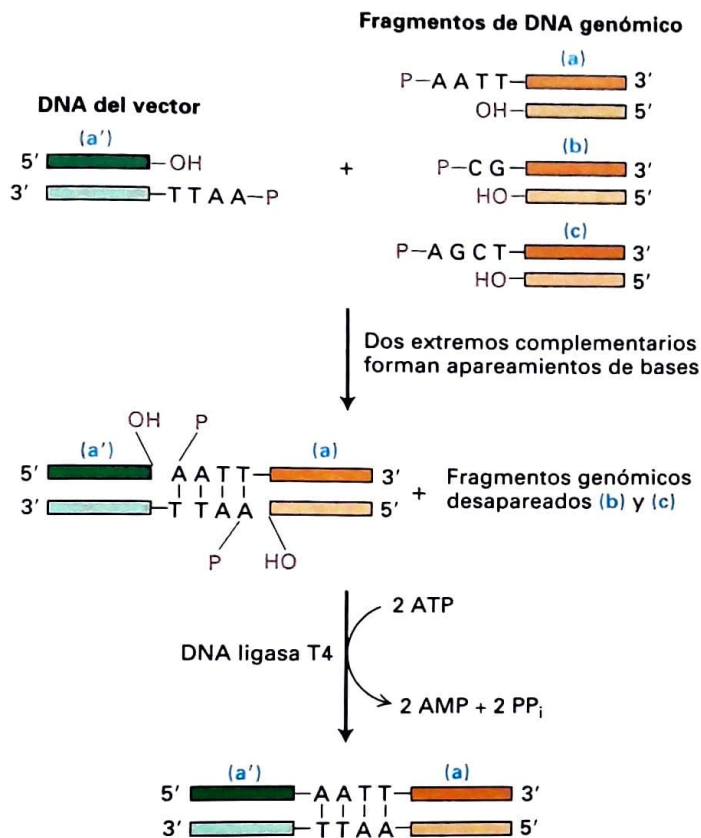


FIGURA 5-12 Ligamiento de los fragmentos de restricción con extremos cohesivos complementarios. En este ejemplo, el vector de DNA cortado con *EcoRI* se mezcla con una muestra que contiene fragmentos de restricción producidos por escisión del DNA genómico con diversas enzimas de restricción diferentes. Se muestran las secuencias de bases cortas, compuestas por extremos cohesivos, de cada tipo de fragmento. El extremo cohesivo en el DNA del vector cortado (a') solo forma apareamiento de bases con los extremos cohesivos complementarios en el fragmento *EcoRI* (a) en la muestra genómica. Los grupos 3' hidroxilo y 5' fosfato adyacentes (rojo), en los fragmentos que forman apareamiento de bases, luego son unidos (ligados) mediante enlaces covalentes por la DNA ligasa T4.

plásmido recombinante con un fragmento de DNA insertado se transforma en una célula de *E. coli*, todas las células de la progenie resistentes a antibiótico que surgen de la célula inicialmente transformada contendrán plásmidos con el mismo DNA insertado. El DNA insertado se replica junto

con el resto del DNA del plásmido y se segrega en las células hijas, a medida que las colonias crecen. De esta forma, el fragmento inicial de DNA se replica en la colonia de células en una gran cantidad de copias idénticas. Como todas las células en una colonia surgen a partir de una única célula parental transformada, éstas constituyen un clon de células, y el fragmento inicial de DNA insertado dentro del plásmido parental se denomina **DNA clonado** o un **clon de DNA**.

La versatilidad de un vector plasmídico de *E. coli* se incrementa con la adición de un poliligador (*polilinker*), una secuencia generada de manera sintética que contiene una copia de diferentes sitios de restricción que no están presentes en cualquier lugar en la secuencia plasmídica (véase la Fig. 5-13). Cuando ese vector se trata con una enzima de restricción que reconoce un sitio de restricción en el poliligador, el vector se corta solo una vez dentro del poliligador. Posteriormente, cualquier fragmento de DNA de longitud adecuada, producido con la misma enzima de restricción, puede insertarse mediante la DNA ligasa dentro del plásmido cortado. Los plásmidos que contienen un poliligador permiten que un investigador use el mismo vector plasmídico cuando se clonan fragmentos de DNA generados con diferentes enzimas de restricción, lo que simplifica los procedimientos experimentales.

Para algunos propósitos, tales como el aislamiento y la manipulación de grandes segmentos del genoma humano, es deseable clonar segmentos de DNA tan grandes como varias megabases (1 megabase [1Mb] = 1 millón de nucleótidos). Por esta razón, se han desarrollado vectores plasmídicos especializados conocidos como **BAC** (cromosomas bacterianos artificiales). Un tipo de BAC utiliza un origen de replicación que deriva de un plásmido endógeno de *E. coli* conocido como *factor F*. El factor F y los vectores de clonación derivados de éste pueden mantenerse estables en una sola copia por célula de *E. coli*, incluso cuando contienen secuencias insertadas de hasta alrededor de 2 Mb. La producción de bibliotecas BAC requiere métodos especiales para el aislamiento, ligación y transformación de segmentos largos de DNA, ya que segmentos de DNA más grandes que los de 20 kb son altamente vulnerables a la rotura mecánica incluso por manipulaciones como el pipeteo.

Las bibliotecas de cDNA representan las secuencias de los genes que codifican proteínas

Una colección de moléculas de DNA, cada una clonada en una molécula vector, es conocida como una **biblioteca de DNA**. Cuando el DNA genómico de un organismo particular es la fuente de partida del DNA, el conjunto de clones que colectivamente representan todas las secuencias de DNA en el genoma se conoce como una **biblioteca genómica**.

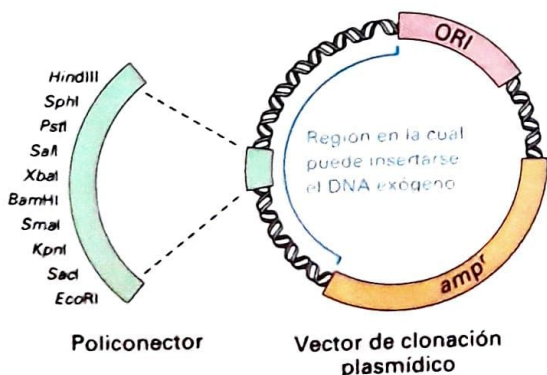


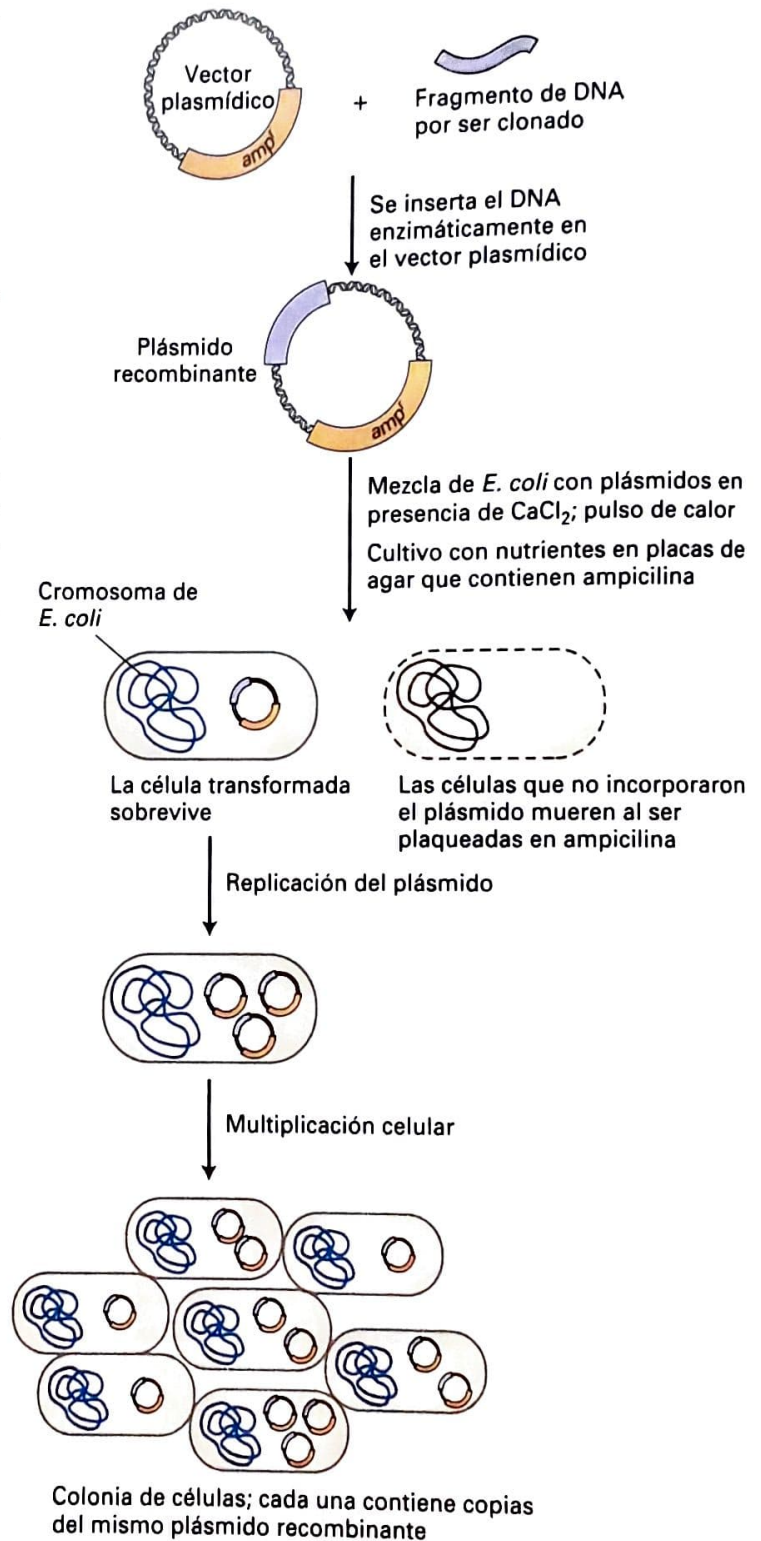
FIGURA 5-13 Componentes básicos de un vector de clonación plasmídico que puede replicarse dentro de una célula de *E. coli*. Los vectores plasmídicos contienen un gen seleccionable como *amp^r*, que codifica la enzima β-lactamasa y confiere resistencia a la ampicilina. El DNA exógeno puede insertarse en la región entre los corchetes sin interrumpir la capacidad del plásmido para replicarse o expresar el gen *amp^r*. Los vectores plasmídicos también contienen una secuencia con origen de replicación (ORI), donde se inicia la replicación del DNA mediante enzimas del huésped. La inclusión de un policonector sintético que contiene las secuencias de reconocimiento para diversas enzimas de restricción diferentes incrementa la versatilidad de un vector plasmídico. El vector se diseña de manera tal que cada sitio en el policonector sea único en el plásmido.

FIGURA EXPERIMENTAL 5-14 La clonación del DNA en un vector plasmídico permite la amplificación de un fragmento de DNA. Primero, se inserta un fragmento de DNA a ser clonado en un vector plasmídico que contiene un gen de resistencia a ampicilina (*amp^r*), como se muestra en la Figura 5-13. Solo unas pocas células transformadas por la incorporación de una molécula plasmídica sobrevivirán en un medio que contiene ampicilina. En las células transformadas, el DNA del plásmido se replica y se segrega a las células hijas, lo que da como resultado la formación de una colonia resistente a la ampicilina.

Dichas bibliotecas genómicas son ideales para representar el contenido genético de organismos relativamente simples, como bacterias o levaduras, pero presentan ciertas dificultades experimentales para los eucariontes superiores. Primero, los genes de estos organismos suelen contener secuencias intrónicas muy largas; por lo tanto, pueden ser demasiado largas como para insertarlas intactas dentro de los vectores plasmídicos. En consecuencia, las secuencias de los genes individuales se separan y son transportadas en más de un clon. Más aún, la presencia de intrones y regiones intergénicas largas en el DNA genómico suele dificultar la identificación de partes importantes de un gen que, en realidad, codifican secuencias proteicas. Por ejemplo, solo alrededor del 1,5% del genoma humano representa realmente genes que codifican proteínas. Por ende, para muchos estudios, los mRNA celulares, que carecen de regiones no codificantes presentes en el DNA genómico, constituyen puntos de partida más útiles para la generación de una biblioteca de DNA. En este enfoque, se sintetizan y se clonan copias de los mRNA, que se denominan **DNA complementarios (cDNA)**, en vectores plasmídicos. Una gran colección de los clones de cDNA resultantes, que representan todos los mRNA expresados en un tipo celular, se denomina *biblioteca de cDNA*.

Los cDNA preparados mediante transcripción inversa de los mRNA celulares pueden clonarse para generar bibliotecas de cDNA

El primer paso para la preparación de una biblioteca de cDNA es aislar el mRNA total de un tipo de célula o tejido de interés. Debido a sus colas de poli(A), los mRNA se separan fácilmente de los rRNA y los tRNA, mucho más frecuentes en un extracto celular, mediante el uso de una columna en cuya matriz se unen cortas tiras de timidilato (oligo-dT). En la Figura 5-15 se esquematiza el procedimiento general para preparar una biblioteca de cDNA a partir de una mezcla de los mRNA celulares. La enzima transcriptasa inversa, que se encuentra en los retrovirus, se emplea para sintetizar una hebra de DNA complementario a cada molécula de mRNA, a partir de un cebador oligo-dT (pasos **1** y **2**). Las moléculas híbridas cDNA-mRNA resultantes son convertidas, en varios pasos, en moléculas de cDNA doble hebra correspondientes a todas las moléculas mRNA en la preparación original (pasos **3**-**5**). Cada cDNA doble hebra contiene una región doble hebra oligo-dC-oligo-dG en un extremo y una región doble hebra oligo-dT-oligo-dA en el otro. La metilación del cDNA lo protege de su posterior escisión por parte de la enzima de restricción (paso **6**).



Para preparar los cDNA de doble hebra para la clonación, las moléculas cortas de DNA de doble hebra —que contienen el sitio de reconocimiento para una enzima de restricción particular— se ligan a ambos extremos de los cDNA mediante el uso de DNA ligasa procedente del bacteriófago T4 (Fig. 5-15, paso **7**). Como se mencionó anteriormente, esta ligasa puede unir moléculas de DNA con “extremos romos” que carecen de extremos cohesivos. Las moléculas resul-

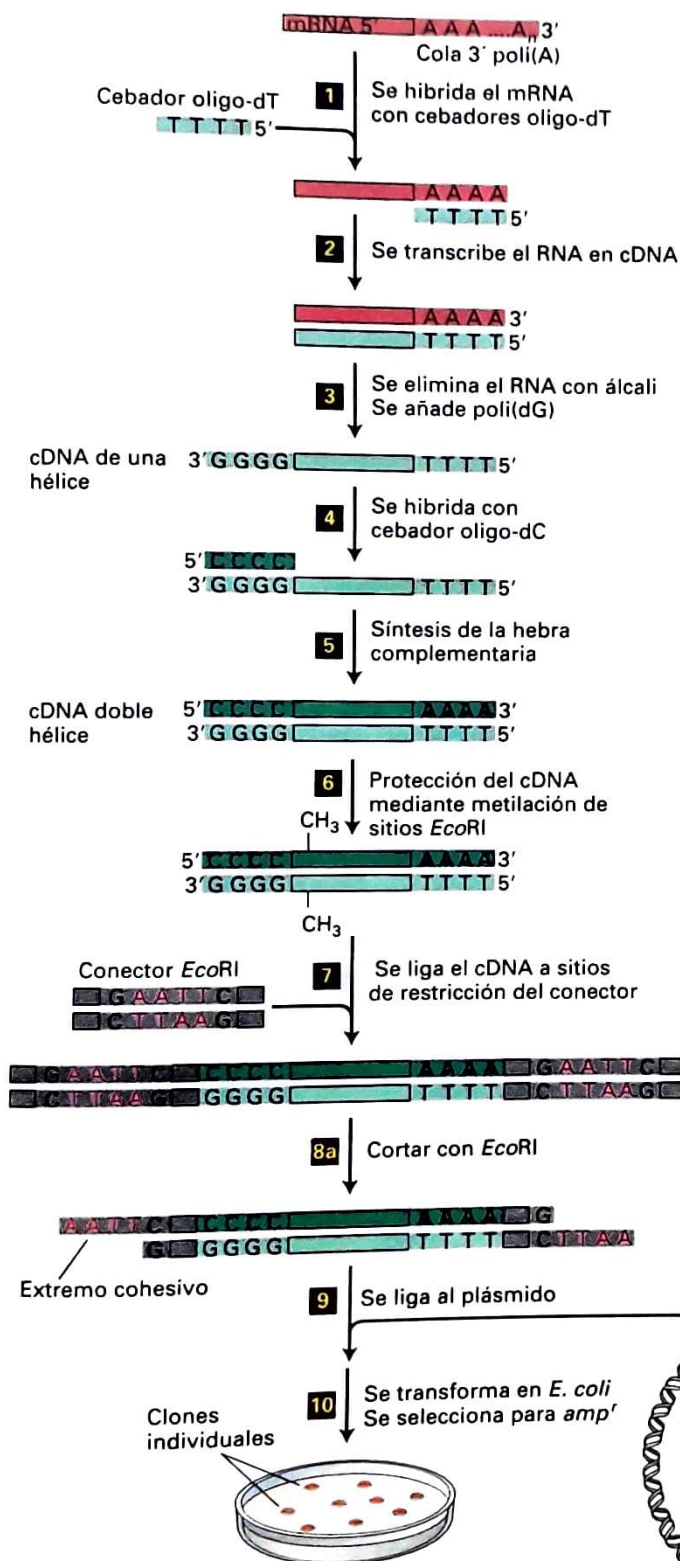


FIGURA 5-15 Una biblioteca de cDNA contiene copias representativas de las secuencias de mRNA celular. Una mezcla de mRNA es el punto de partida para la preparación de clones de plásmidos recombinantes; cada uno de éstos contiene un cDNA. La transformación de *E. coli* con estos plásmidos recombinantes genera un grupo de clones de cDNA que representan todos los mRNA celulares. Véase el texto para el análisis detallado.



8b Cortar con *EcoRI*



tantes luego son tratadas con la enzima de restricción específica para el conector adherido, y se generan moléculas de cDNA con extremos cohesivos (paso 8a). En un procedimiento separado, el DNA plasmídico se trata con la misma enzima de restricción para producir los extremos cohesivos adecuados (paso 8b).

El vector y la colección de los cDNA –todos contienen extremos cohesivos– se mezclan y se unen de manera covalente mediante la DNA ligasa (Fig. 5-15, paso 9). Las moléculas de DNA se transforman en células de *E. coli* para generar clones individuales; cada clon lleva un cDNA derivado de un mRNA único.

Como diferentes genes se transcriben a distintas velocidades, los clones de cDNA correspondientes a genes de transcripción abundante estarán representados muchas veces en una biblioteca de cDNA, mientras que los cDNA que corresponden a los genes de transcripción infrecuente serán extremadamente raros o no estarán presentes. Esta propiedad es ventajosa si un investigador está interesado en un gen que se transcribe a una alta tasa en un tipo celular particular. En este caso, una biblioteca de cDNA preparada a partir de los mRNA expresados en ese tipo celular estará enriquecida en el cDNA de interés, lo que facilitará el aislamiento de clones que llevan ese cDNA de la biblioteca. Sin embargo, para tener una posibilidad razonable de incluir clones correspondientes a los genes de transcripción más lenta, las bibliotecas de cDNA de mamífero deben contener 10^6 - 10^7 clones recombinantes.

Las bibliotecas de cDNA pueden rastrearse mediante hibridación con una sonda de oligonucleótido

Las bibliotecas genómicas y de cDNA de diversos organismos contienen cientos de miles, hasta más de un millón, de clones individuales en el caso de los eucariontes superiores. Se encuentran disponibles dos técnicas generales para la búsqueda de bibliotecas, con el fin de identificar clones que llevan un gen u otra región del DNA de interés: (1) detección con **sondas** de oligonucleótidos que se unen al clon de interés y (2) detección basada en la expresión de la proteína codificada. Aquí se describe el primer método; en la siguiente sección, se presentará un ejemplo del segundo método.

La base para la búsqueda con sondas de oligonucleótidos es la **hibridación**, la capacidad de que moléculas de RNA o DNA de simple hebra, complementarias, se asocien (hibriden) específicamente entre sí mediante apareamiento de bases. Como se analizó en el Capítulo 4, el DNA de doble hebra (dúplex) puede desnaturalizarse a hebras simples mediante calentamiento en una solución salina diluida. Si luego se baja la temperatura y se aumenta la concentración de iones, las hebras simples complementarias volverán a asociarse (se hibridarán) para formar dúplex. En una mezcla de ácidos nucleicos, solo las hebras simples complementarias (o las hebras que contienen regiones complementarias) se reasociarán; más aún, la extensión de su reasociación no se encontrará afectada por la presencia de hebras no complementarias. Como se verá más adelante en este capítulo, la capacidad de identificar una secuencia de DNA o RNA particular dentro de una mezcla altamente compleja de moléculas, a través de la hibridación de ácidos nucleicos, es la base para muchas técnicas empleadas para el estudio de la expresión génica.

En la Figura 5-16, se describen los pasos involucrados en la búsqueda en una biblioteca de cDNA de plásmidos de *E. coli*. Primero, el

DNA que se va a buscar debe adherirse a un soporte sólido. Una réplica de la placa de Petri que contiene una gran cantidad de clones individuales de *E. coli* se reproduce sobre la superficie de una membrana de nitrocelulosa. El DNA sobre la membrana se desnaturaliza; luego, la membrana se incuba en una solución que contiene una sonda específica para el DNA recombinante, donde se localiza el fragmento de interés, que está marcado con radiactividad o fluorescencia. En condiciones de hibridación (cerca del pH neutral, 40-65 °C, 0,3-0,6 M NaCl), esta sonda marcada se hibrida a cualquier hebra de ácido nucleico complementario unido a la membrana. Cualquier exceso de sonda que no se hibrida se elimina con lavados, y los híbridos marcados se detectan mediante autorradiografía o imagen fluorescente del filtro. Esta técnica puede usarse para búsquedas tanto de bibliotecas genómicas como de cDNA; pero, en general, es más utilizada para aislar cDNA específicos.

Claramente, la identificación de clones específicos por técnicas de hibridación de membrana depende de la disponibilidad de sondas radiomarcadas complementarias. Para que un oligonucleótido sea útil como sonda, debe ser lo suficientemente largo como para que su secuencia aparezca únicamente en los clones de interés y no en otros clones. Para la mayoría de los propósitos, esta condición es satisfecha por oligonucleótidos que contengan unos 20 nucleótidos. Esto es así porque una secuencia específica de 20 nucleótidos se produce una vez cada 4^{20} ($\sim 10^{12}$) nucleótidos. Como todos los genomas son más pequeños ($\sim 3 \times 10^9$ nucleótidos para los humanos), una secuencia específica de 20 nucleótidos en un genoma usualmente se produce sólo una vez. Con los instrumentos automatizados hoy disponibles, los investigadores pueden programar la síntesis química de oligonucleótidos de una secuencia específica de hasta unos 100 nucleótidos. Sondas más largas pueden prepararse mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), una técnica ampliamente disponible para la amplificación de secuencias de DNA que se describe más adelante en este capítulo.

¿Cómo podría un investigador diseñar una sonda de oligonucleótido para identificar un clon que codifica una proteína particular? Es útil conocer toda la secuencia (o una parte de ésta) de aminoácidos de la proteína. Gracias a la disponibilidad de las secuencias genómicas completas para los seres humanos y muchos otros organismos –que incluyen todos los organismos modelo como el ratón, *Drosophila* y el gusano *Caenorhabditis elegans*–, un investigador puede utilizar un programa de computación para buscar, en la base de datos, la secuencia genómica para la secuencia codificante que corresponde a la secuencia de aminoácidos de la proteína en estudio. Si se encuentra una coincidencia, una sonda de DNA única con base en esta secuencia genómica conocida se hibridará perfectamente con el clon que codifica la proteína de interés.

Las bibliotecas genómicas de levaduras pueden construirse con vectores lanzadera y rastrearse mediante complementación funcional

En algunos casos, puede realizarse una búsqueda en una biblioteca de la capacidad para expresar una proteína funcional que complemente una mutación **recesiva**. Esta estrategia de búsqueda o rastreo (*screening*) podría constituir un modo eficiente para aislar un gen clonado que corresponda a una mutación recesiva de interés, identificada en un organismo experimental. Para ilustrar este método, denominado

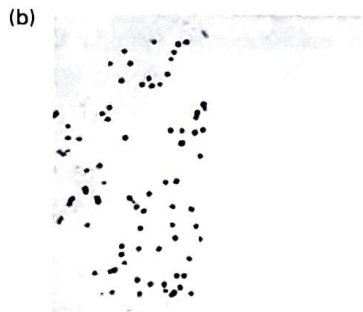
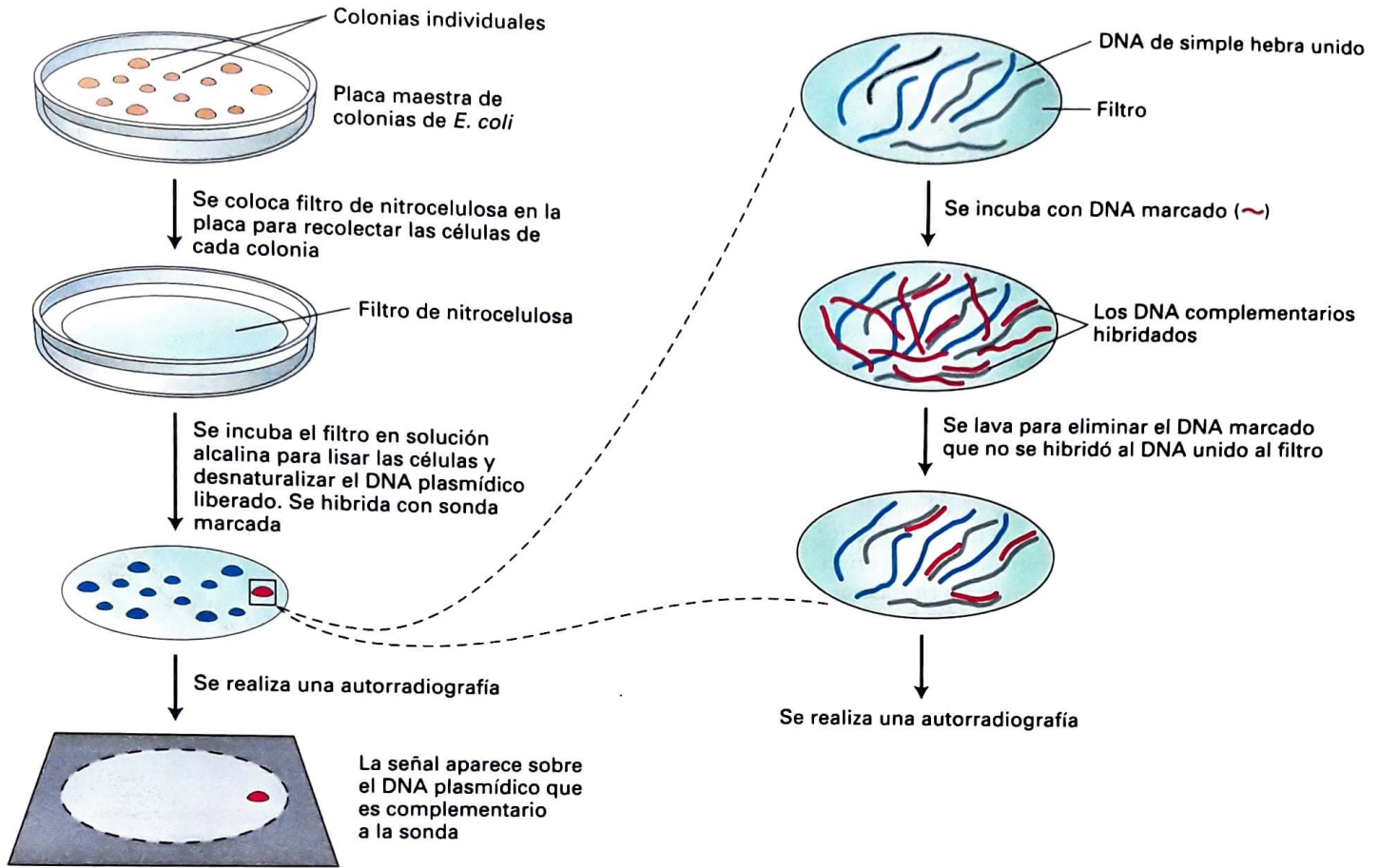


FIGURA EXPERIMENTAL 5-16 Las bibliotecas de cDNA pueden rastrearse con sondas radiomarcadas para identificar un clon de interés. La aparición de un punto en una autorradiografía indica la presencia de un clon recombinante que contiene DNA complementario a la sonda. La posición del punto en el autorradiograma es la imagen especular de la posición de ese clon particular en la placa de Petri (aunque para facilitar la comparación, aquí no se

muestra el dorso). La alineación del autorradiograma con la placa Petri original localizará el clon correspondiente a partir del cual podrán recuperarse células de *E. coli*. (b) Este autorradiograma muestra cinco colonias de *E. coli* que contienen el cDNA deseado. (Parte [b] de H. Fromm y N. H. Chua, 1992, *Plant Mol Biol Rep* 10:199.)

complementación funcional, se describirá cómo los genes de levadura clonados en plásmidos de *E. coli* especiales pueden ser introducidos en células mutantes de levadura para identificar el gen de tipo silvestre que es defectuoso en la cepa mutante.

Las bibliotecas construidas con el propósito de búsqueda entre secuencias génicas de levadura suelen construirse a partir de DNA

genómico, más que de cDNA. Como los genes de *Saccharomyces* no contienen múltiples intrones, son lo suficientemente compactos como para que la secuencia completa de un gen pueda estar incluida en un fragmento de DNA genómico insertado en un vector plasmídico. Para construir una biblioteca genómica de plásmidos, que será rastreada por complementación funcional en células de levadura, el

vector plasmídico debe ser capaz de replicarse tanto en células de *E. coli* como en células de levadura. Este tipo de vector, con capacidad de propagación en dos huéspedes diferentes, se denomina vector lanzadera. En la Figura 5-17a, se muestra la estructura de un típico vector lanzadera de levadura. Dicho vector contiene los elementos básicos que permiten la clonación de fragmentos de DNA en *E. coli*. Además, el vector lanzadera contiene una secuencia de replicación autónoma (ARS), que funciona como un origen de replicación del DNA en levadura; un centrómero de levadura (denominado CEN), que permite la segregación fiel de un plásmido durante la división de la célula de levadura; y un gen de levadura que codifica una enzima para la síntesis (*URA3*), que sirve como marcador seleccionable en un mutante de levadura adecuado.

Para aumentar la probabilidad de que todas las regiones del genoma de levadura sean clonadas y representadas de manera exitosa en la biblioteca de plásmidos, el DNA genómico solo es digerido parcialmente para obtener fragmentos de restricción superpuestos de ~ 10 kb. Luego, estos fragmentos se unen en el vector lanzadera en el cual el policonector ha sido cortado con una enzima de restricción que produce extremos cohesivos complementarios a los de los fragmentos de DNA de levadura (Fig. 5-17b). Como los fragmentos de restricción de 10 kb del DNA de levadura son incorporados de forma aleatoria a los vectores lanzadera, al menos 105 colonias de *E. coli*, cada una con un vector lanzadera recombinante particular, son necesarias para asegurar que cada región del DNA de levadura tenga una alta probabilidad de estar representada en la biblioteca, al menos, una vez.

La Figura 5-18 esquematiza cómo puede buscarse en una biblioteca genómica de levadura para aislar el gen de tipo silvestre correspondiente a una de las mutaciones *cdc* sensibles a la temperatura, mencionadas al comienzo de éste capítulo. La cepa inicial de levadura es un doble mutante que requiere uracilo para crecer debido a una mutación *ura3* y es sensible a la temperatura porque una mutación *cdc28* identifica su fenotipo (véase la Fig. 5-6). Los plásmidos recombinantes aislados de la biblioteca genómica son mezclados con células de levadura en condiciones que estimulan la transformación de células con DNA extraño. Puesto que las células de levadura transformadas llevan una copia del gen *URA3* de tipo silvestre transmitida por el plásmido, éstas pueden seleccionarse por su capacidad para crecer en ausencia de uracilo. Típi-

camente, alrededor de 20 placas de Petri, cada una con alrededor de 500 levaduras transformantes, son suficientes para representar el genoma de levadura completo. Esta colección de transformantes de levadura puede mantenerse a 23 °C, una temperatura que permite el crecimiento del mutante *cdc28*. Posteriormente, la colección completa en 20 placas es transferida a las placas réplica, que se colocan a 36 °C, una temperatura no permisiva para mutantes *cdc*. Las colonias de levadura que

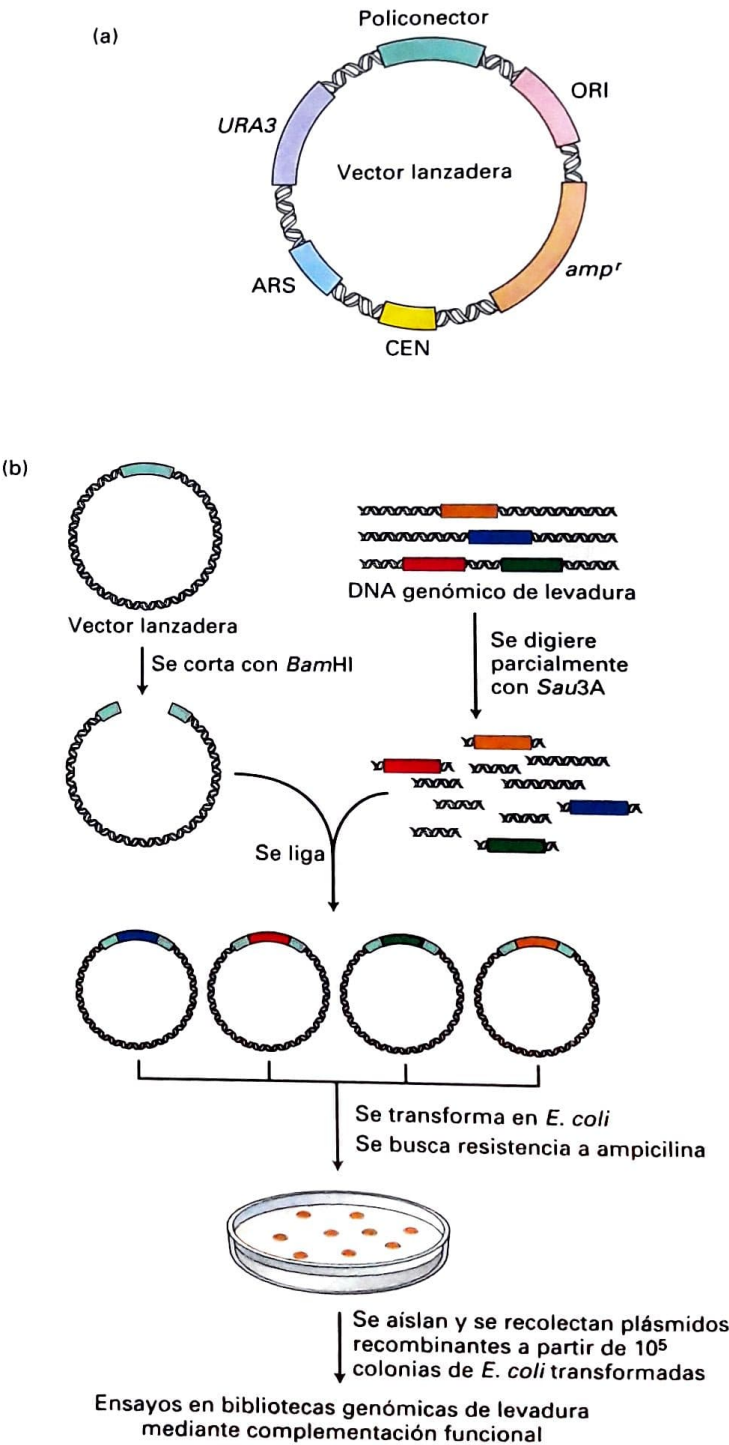


FIGURA EXPERIMENTAL 5-17 Puede construirse una biblioteca genómica de levadura en un vector lanzadera que puede replicarse en levaduras y *E. coli*. (a) Componentes de un típico vector lanzadera para la clonación de genes de *Saccharomyces*. La presencia de un origen de replicación de DNA de levadura (ARS) y un centrómero de levadura (CEN) permiten la replicación y segregación estable en levaduras. También se incluye un marcador seleccionable como *URA3*, que permite a un mutante *ura3* crecer en un medio carente de uracilo. Finalmente, el vector que contiene secuencias para la replicación y la selección en *E. coli* (*ORI* y *amp^r*) y un policonector para facilitar la inserción de los fragmentos de DNA de levadura. (b) Protocolo típico para la construcción de una biblioteca genómica de levadura. La digestión parcial del DNA genómico total de levadura con *Sau*3A se ajusta para generar fragmentos con un tamaño promedio de alrededor de 10 kb. El vector se prepara para aceptar los fragmentos genómicos mediante digestión con *Bam*HI, que produce los mismos extremos cohesivos que *Sau*3A. Cada clon transformado de *E. coli* que crece después de la selección para la resistencia a ampicilina contiene un único tipo de fragmento de DNA de levadura.

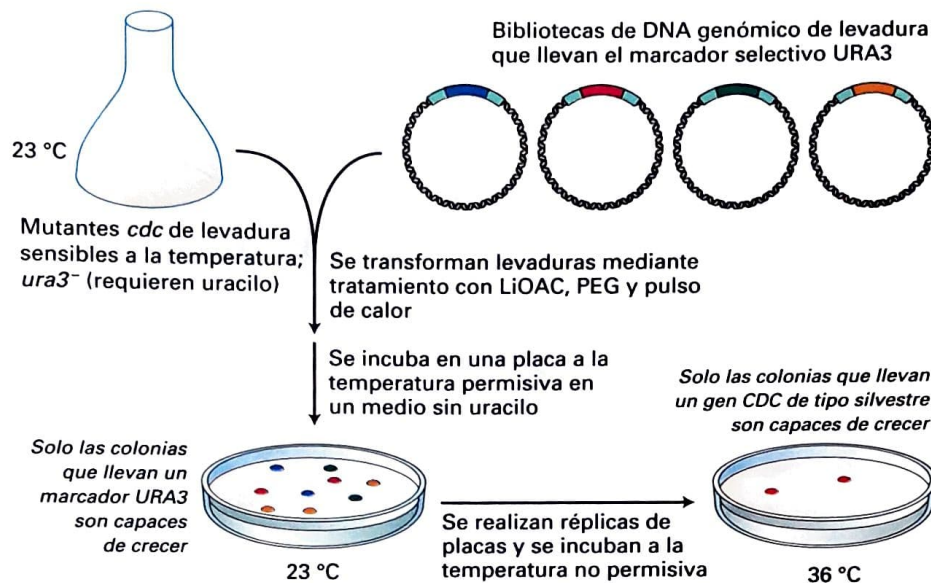


FIGURA EXPERIMENTAL 5-18 La búsqueda en una biblioteca genómica mediante complementación funcional puede identificar clones que llevan una forma normal de un gen de levadura mutante. En este ejemplo, un gen de *CDC* se aísla por complementación de un mutante de levadura *cdc*. La cepa de *Saccharomyces* utilizada para rastreo de la biblioteca de levadura lleva una mutación *cdc ura3* sensible a la temperatura. Esta cepa mutante crece y se mantiene a una temperatura permisiva (23 °C). El pool de plásmidos recombinantes preparados, como se muestra en la Figura 5-17, se

incuba con las células de levadura mutantes en condiciones que promueven la transformación. Las relativamente pocas células de levadura transformadas, que contienen DNA plasmídico recombinante, pueden crecer en la ausencia de uracilo a 23 °C. Cuando las colonias de levadura transformadas se replican en una placa de Petri y se las incuban a 36 °C (una temperatura no permisiva), solo sobreviven los clones que llevan una biblioteca de plásmidos que contienen copia del gen *CDC* de tipo silvestre. LiOAC = acetato de litio; PEG = polietilenglicol.

llevan plásmidos recombinantes expresan una copia de tipo silvestre del gen *CDC28* que les permitirá crecer a 36 °C. Una vez identificadas las colonias de levadura resistentes a la temperatura, puede extraerse el DNA de plásmidos a partir de células de levadura cultivadas y mediante análisis por subclonación y secuenciación de DNA, temas que se tratarán a continuación.

La electroforesis en gel permite la separación del vector de DNA de los fragmentos clonados

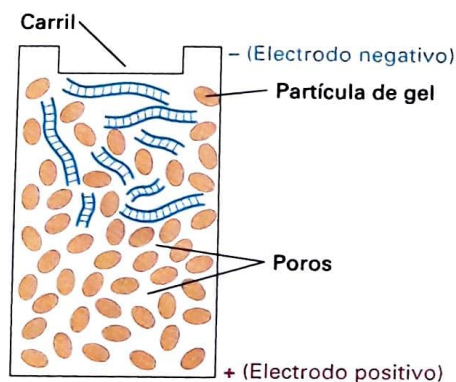
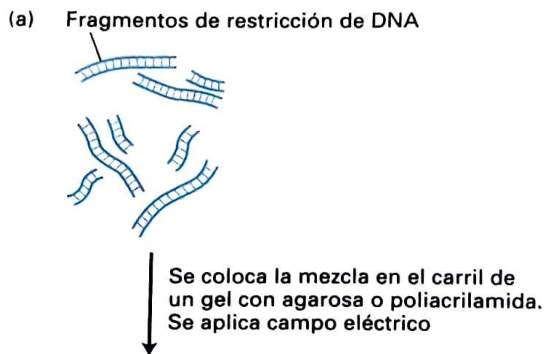
Con el fin de manipular o secuenciar un fragmento de DNA clonado, a veces, éste debe ser separado del DNA del vector. Esto puede lograrse mediante el corte del clon de DNA recombinante con la misma enzima de restricción usada originalmente para producir los vectores recombinantes. El DNA clonado y el DNA del vector luego son sometidos a electroforesis en gel, un método poderoso para separar las moléculas de DNA de tamaños diferentes (Fig. 5-19).

Cerca del pH neutral, las moléculas de DNA portan una gran carga negativa; por lo tanto, se mueven hacia el electrodo positivo durante la electroforesis en gel. Debido a que la matriz del gel restringe la difusión aleatoria de las moléculas, las que son del mismo tamaño migran juntas como una banda cuyo ancho es igual al del carril donde se colocó originalmente la muestra, al comienzo de la carrera electroforética. Las moléculas pequeñas se mueven a través de la matriz más rápidamente que las más grandes, de manera tal que las moléculas de diferentes longitudes migran como bandas distin-

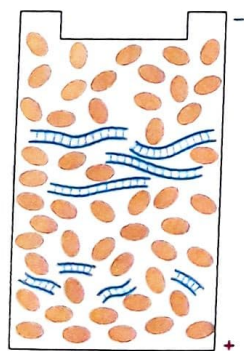
tivas. Las moléculas de DNA de alrededor de 10 a 2 000 nucleótidos pueden separarse mediante electroforesis en geles de *poliacrilamida*, y las moléculas más grandes, de alrededor de 200 nucleótidos hasta más de 20 kb, en geles de *agarosa*.

Un método común para visualizar bandas de DNA separadas en un gel consiste en incubar el gel en una solución que contiene el colorante fluorescente bromuro de etidio. Intercalándose entre los pares de bases, esta molécula plana se une al DNA. La unión concentra el etidio en el DNA y también incrementa su fluorescencia intrínseca. Como resultado, cuando se ilumina el gel con luz ultravioleta, las regiones del gel que contienen DNA fluorescen de forma mucho más brillante que las áreas del gel sin DNA.

Una vez que el fragmento de DNA clonado, en especial uno largo, se separa del DNA vector, suele ser tratado con varias enzimas de restricción para obtener fragmentos más pequeños. Después de la separación por electroforesis en gel, todos estos fragmentos más pequeños o algunos de éstos pueden ligarse individualmente en un vector plasmídico y clonarse en *E. coli* por medio del procedimiento usual. Este proceso, conocido como *subclonación*, constituye un paso importante en el reordenamiento de las partes de los genes en nuevas configuraciones útiles. Por ejemplo, un investigador que quiere cambiar las condiciones en las cuales se expresa un gen podría usar subclonación para reemplazar el promotor normal asociado a un gen clonado con un segmento de DNA que contiene un promotor diferente. La subclonación también puede utilizarse para obtener fragmentos de DNA clonado, que son de una longitud adecuada para la determinación de la secuencia nucleotídica.



Las moléculas se mueven a través de los poros en el gel a una velocidad inversamente proporcional a su longitud de cadena



Se somete a autorradiografía o se incuba con colorante fluorescente

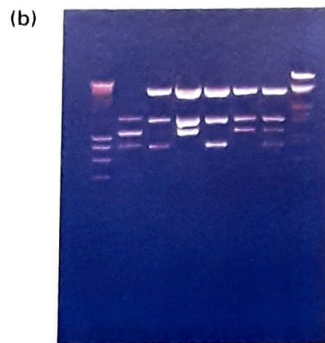
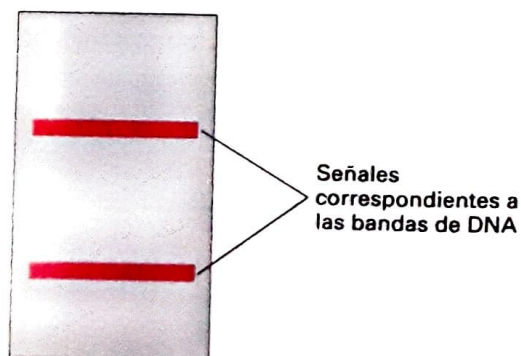


FIGURA EXPERIMENTAL 5-19 La electroforesis en gel separa las moléculas de DNA de diferentes longitudes. (a) Un gel se prepara vertiendo un líquido que contiene agarosa fundida o acrilamida despolimerizada entre dos placas de vidrio, separadas por unos pocos milímetros. A medida que la agarosa se solidifica o la acrilamida se polimeriza en poliacrilamida, se forma una matriz de gel (óvalos anaranjados) que consiste en cadenas de polímeros largos que forman una trama. Las dimensiones de los canales que se interconectan, o poros, dependen de la concentración de la agarosa o la acrilamida usada para formar el gel. Las bandas separadas pueden visualizarse mediante autorradiografía (si los fragmentos están radiomarcados) o por adición de un colorante fluorescente (p. ej., bromuro de etidio) que se une al DNA. (b) Fotografía de un gel teñido con bromuro de etidio (EtBr). El EtBr se une al DNA y emite fluorescencia bajo luz UV. Las bandas en los carriles del extremo izquierdo y derecho se conocen como marcadores de DNA –fragmentos de DNA de tamaño conocido que sirven como referencia para determinar la longitud de los fragmentos de DNA en la muestra experimental—. (Parte (b) Science Photo Library)

La reacción en cadena de la polimerasa amplifica una secuencia específica de DNA a partir de una mezcla compleja

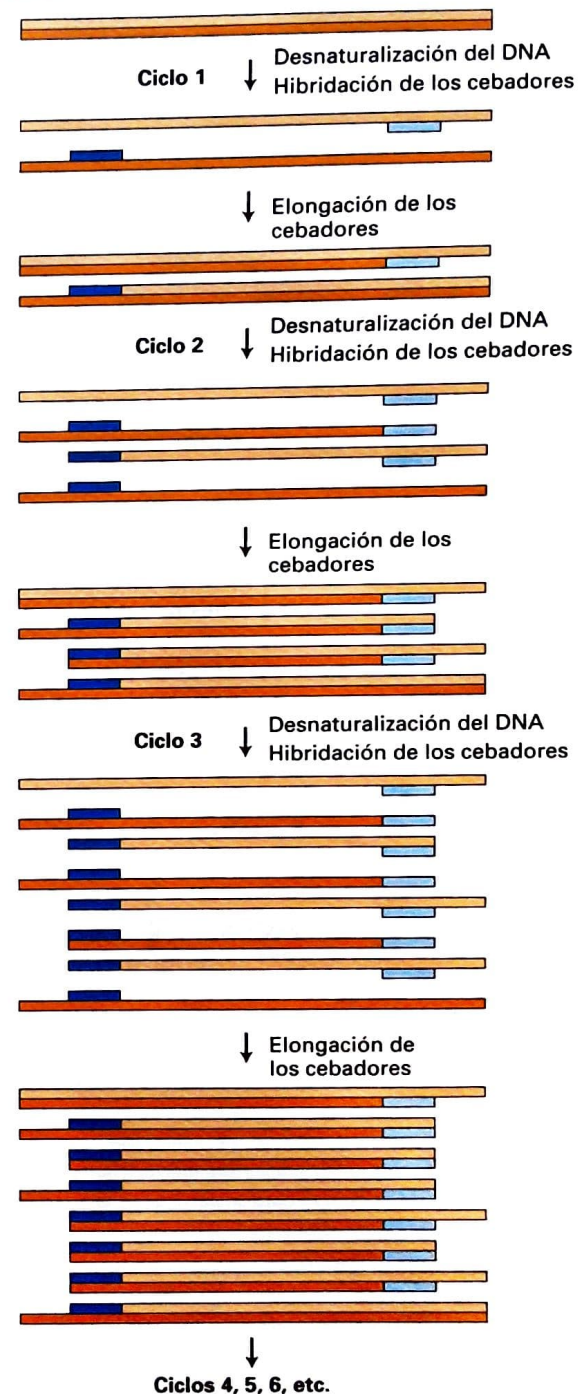
Si se conoce la secuencia nucleotídica en los extremos de una región particular del DNA, el fragmento intercalado puede amplificarse directamente mediante la **reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**. Aquí se describen la técnica básica y tres situaciones en las cuales puede utilizarse.

La PCR depende de la capacidad de desnaturalizar (fundir) alternadamente las moléculas de DNA de doble hebra e hibridarlas a hebras simples complementarias en un esquema controlado. Como se esquematiza en la Figura 5-20, un típico procedimiento de PCR comienza con la desnaturalización por calor a 95 °C de una muestra de DNA para obtener hebras simples. Luego, se añaden dos oligonucleótidos sintéticos complementarios a los extremos 3' del segmento de DNA diana de interés en mayor exceso con respecto al DNA desnaturalizado, y se disminuye la temperatura hasta 50-60 °C. Estos oligonucleótidos específicos, que están en una concentración muy elevada, se hibridarán con sus secuencias complementarias en la muestra de DNA, mientras que las hebras largas del DNA de la muestra permanecerán separadas debido a sus bajas concentraciones. Después, los oligonucleótidos hibridados servirán como cebadores para la síntesis de la cadena de DNA en presencia de desoxinucleótidos (dNTP) y una DNA polimerasa resistente a la temperatura, como la procedente de *Thermus aquaticus* (una bacteria que vive en aguas termales). Esta enzima, denominada

FIGURA 5-20 La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es ampliamente utilizada para amplificar regiones de DNA de secuencia conocida. Para amplificar una región específica de DNA, un investigador sintetiza químicamente dos cebadores de oligonucleótidos diferentes, complementarios a las secuencias, de aproximadamente 18 bases que flanquean la región de interés (designadas con rectángulos celestes y azules). La reacción completa está compuesta de una mezcla compleja de DNA de doble hebra (en general, DNA genómico que contiene la secuencia diana de interés), un exceso estequiométrico de ambos cebadores, los cuatro desoxirribonucleósidos trifosfato y una DNA polimerasa estable al calor, conocida como Taq polimerasa. Durante cada ciclo de PCR, la mezcla primero es calentada para separar a las hebras y, luego, enfriada para permitir a los cebadores unirse a las secuencias complementarias que flanquean la región a ser amplificada. La Taq polimerasa extiende cada cebador desde su extremo 3', lo que genera hebras recién sintetizadas que se extienden en dirección 3' al extremo 5' de la hebra molde. Durante el tercer ciclo, las moléculas de DNA de doble hebra son generadas en igual longitud a la secuencia de la región a ser amplificada. En cada ciclo sucesivo, el segmento diana, que se hibridará a los cebadores, se duplica y, eventualmente, supera ampliamente en número a todos los otros segmentos de DNA en la mezcla de reacción. Los sucesivos ciclos de PCR pueden automatizarse mediante una reacción de ciclación por intervalos de tiempo, a temperatura elevada, para desnaturalizar el DNA, y a una temperatura menor definida para la hibridación y la elongación de las partes. Una reacción con 20 ciclos amplificará la secuencia específica diana un millón de veces.

Taq polimerasa, puede permanecer activa incluso después de ser calentada a 95 °C y puede extender los cebadores a temperaturas de hasta 72 °C. Cuando la síntesis está completa, la mezcla total se calienta a 95 °C para desnaturalizar los DNA dúplex recién formados. Después de que se vuelve a disminuir la temperatura, se inicia otro ciclo de síntesis, ya que el exceso de cebador todavía está presente. Repetidos ciclos de desnaturalización (calentamiento) seguidos de hibridación y síntesis (enfriamiento) amplifican rápidamente la secuencia de interés. En cada ciclo, el número de copias de la secuencia entre los sitios cebadores se duplica; por lo tanto, la secuencia deseada se incrementa exponencialmente —alrededor de un millón después de 20 ciclos— mientras que todas las otras secuencias en la muestra de DNA original permanecen sin amplificar.

Aislamiento directo de un segmento específico de DNA genómico
Para los organismos en los cuales todo el genoma o la mayor parte de éste ha sido secuenciado, la amplificación por PCR comienza con el DNA genómico total, ya que es el camino más fácil para obtener una región de DNA específica de interés para la clonación. En esta aplicación, los dos cebadores de oligonucleótidos se diseñan para ser hibridados a las secuencias que flanquean la región genómica de interés y para incluir las secuencias que son reconocidas por enzimas específicas de restricción (Fig. 5-21). Después de la amplificación de la secuencia diana, alrededor de 20 ciclos de PCR, la escisión con enzimas de restricción adecuadas produce extremos cohesivos que permiten la ligación eficiente del fragmento en un vector plasmídico cortado por la misma enzima de restricción en el policonector. Los plásmidos recombinantes resultantes —todos llevan el segmento de DNA genómico idéntico— pueden clonarse en células de *E. coli*. Con ciertos refinamientos de la PCR, pueden amplificarse y clonarse, incluso segmentos de DNA superiores a 10 kb de longitud.



Nótese que este método no implica la clonación de grandes cantidades de fragmentos de restricción derivados del DNA genómico ni sus posteriores búsquedas para identificar el fragmento específico de interés. En efecto, el método de PCR invierte esta técnica tradicional y, por ende, evita sus aspectos más tediosos. El método de PCR es útil para aislar secuencias de genes con el fin de manipularlas

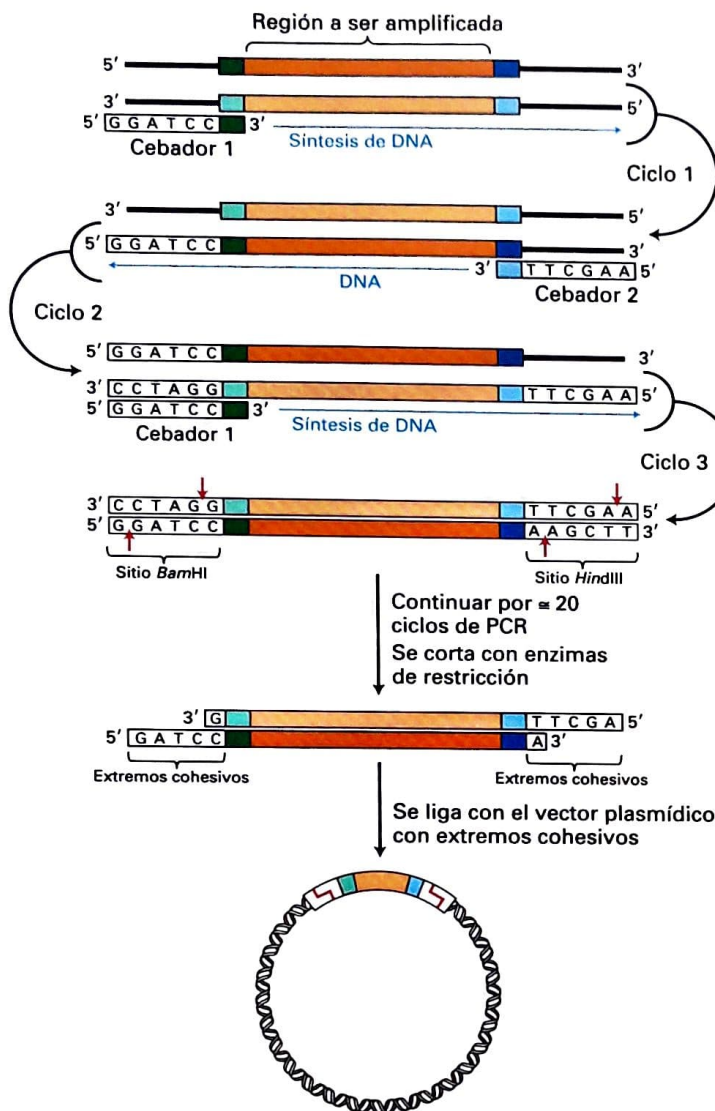


FIGURA EXPERIMENTAL 5-21 Una región diana específica en el DNA genómico total puede ser amplificada por PCR para el uso en clonación. Cada cebador de PCR es complementario a un extremo de la secuencia diana e incluye la secuencia de reconocimiento para una enzima de restricción que no tiene un sitio dentro de la región diana. En este ejemplo, el cebador 1 contiene una secuencia *Bam*HI, mientras que el cebador 2 contiene una secuencia *Hind*III. (nótese que para mayor claridad, en cualquier ronda de amplificación solo se muestra una, la que está entre corchetes, de las dos hebras). Después de la amplificación, los segmentos diana se tratan con enzimas de restricción adecuadas que generan fragmentos con extremos cohesivos. Estos pueden incorporarse en vectores plasmídicos complementarios y ser clonados en *E. coli* mediante el procedimiento usual (véase la Fig. 5-13).

La RT-PCR puede realizarse de manera tal que la cantidad inicial de un mRNA celular particular puede determinarse con precisión. Para llevar a cabo una reacción de RT-PCR cuantitativa, se determina la cantidad de secuencia de DNA de doble hebra producida en cada ciclo de amplificación a medida que tiene lugar la amplificación de una secuencia de mRNA particular. Por extrapolación de estas cantidades, puede obtenerse una estimación de la cantidad de secuencia de mRNA inicial. Esta RT-PCR cuantitativa, llevada a cabo en tejidos o en organismos enteros con el uso de cebadores para los genes de interés, proporciona una de las mediciones más precisas para seguir los cambios en la expresión génica.

Preparación de las sondas Al comienzo, se mencionó que las sondas de oligonucleótidos para los ensayos de hibridación por amplificación de PCR requieren la síntesis química de solo dos cebadores relativamente cortos correspondientes a los dos extremos de la secuencia diana. La muestra de partida para la amplificación por PCR de la secuencia diana puede ser una preparación de DNA genómico o una preparación de cDNA sintetizado a partir del mRNA celular total. Para generar un producto radiomarcado a partir de PCR, se incluyen dNTP marcados con ^{32}P durante los últimos ciclos de amplificación o puede obtenerse un producto marcado con fluorescencia mediante el empleo de dNTP marcados con fluorescencia durante los últimos ciclos de amplificación. Como las sondas preparadas por PCR son relativamente largas y tienen incorporados muchos nucleótidos radiactivos o marcados con fluorescencia, estas sondas suelen dar una señal más fuerte y específica que las sintetizadas químicamente.

Etiquetado de genes mediante inserción de mutaciones Otra aplicación útil de la PCR consiste en amplificar un gen "etiquetado" a partir de DNA genómico de una cepa mutante. Este método es más simple, para la identificación de genes asociados con un fenotipo mutante particular, que una búsqueda en una biblioteca mediante complementación funcional (véase la Fig. 5-18).

La clave de este uso de la PCR es utilizar la capacidad para producir mutaciones por inserción de una secuencia de DNA conocida en el genoma de un organismo experimental. Dichas mutaciones por inserción pueden generarse mediante el uso de elementos de DNA móviles, que pueden moverse (o transponer) desde un sitio cromosómico a otro. Como se analizará en más detalle en el Capítulo 6, estas secuencias de DNA se producen naturalmente en los genomas de la mayoría de los organismos y pueden dar lugar a las mutaciones de pérdida de función si se transponen a una región que codifica una proteína.

Por ejemplo, los investigadores han modificado un elemento de DNA móvil de *Drosophila*, conocido como *elemento P*, para optimizar

en una variedad de formas útiles descritas más adelante. Además, el método de PCR puede utilizarse para aislar las secuencias de genes de organismos mutantes con el objeto de determinar cuánto difieren respecto del tipo silvestre.

Una variación del método de PCR permite la amplificación de una secuencia de cDNA específica a partir de los mRNA celulares. Este método, conocido como PCR con *transcripción inversa* (RT-PCR), comienza con los mismos procedimientos descritos anteriormente para el aislamiento de cDNA a partir de una colección de mRNA celulares. Típicamente, un cebador de oligo dT, que se hibridará a la cola 3' poli(A) del mRNA, se emplea como cebador para la primera hebra de síntesis de cDNA mediante la transcriptasa inversa. Un cDNA específico puede aislarse a partir de esta mezcla compleja de los cDNA, por medio de la amplificación, con el uso de dos cebadores de oligonucleótidos diseñados para hacer coincidir secuencias en los extremos 5' y 3' del mRNA correspondiente. Como ya se mencionó, estos cebadores podrían ser diseñados para incluir sitios de restricción con el fin de facilitar la inserción del cDNA amplificado en un vector plasmídico adecuado.

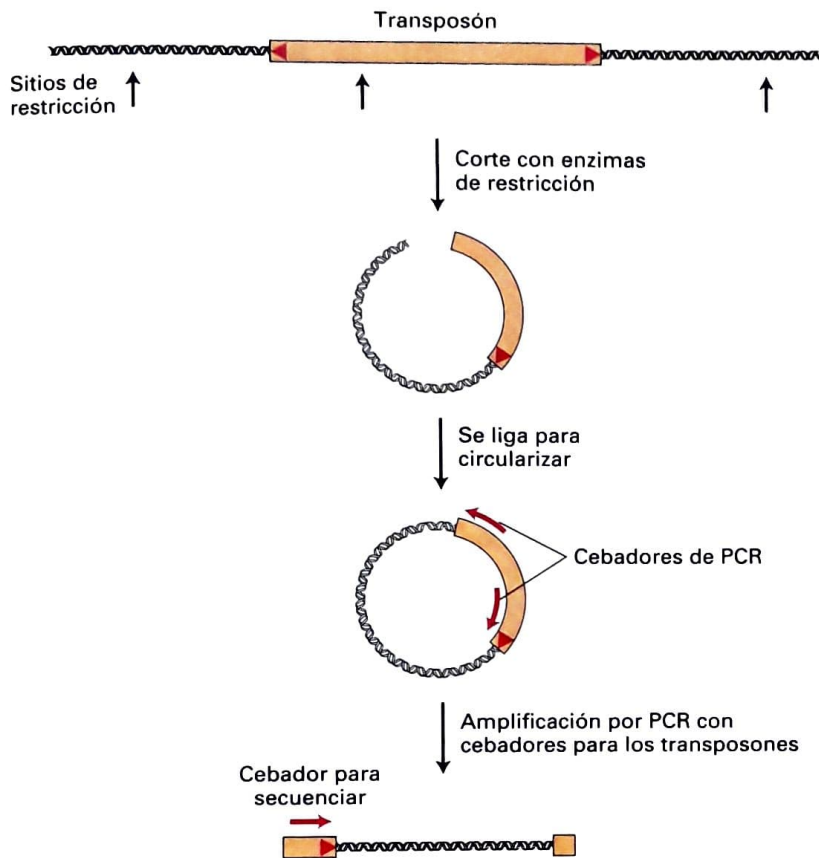


FIGURA 5-22 La secuencia genómica en el sitio de inserción de un transposón se revela mediante amplificación por PCR y secuenciación. Para obtener la secuencia de DNA del sitio de inserción de un transposón de elemento P, es necesario amplificar por PCR la unión entre secuencias de transposones conocida y secuencias cromosómicas desconocidas que flanquean. Un método para lograrlo consiste en segmentar el DNA genómico con una enzima de restricción que lo corta una vez dentro de la secuencia del transposón. El ligamiento de los fragmentos de restricción generará moléculas de DNA circular. Mediante el uso de cebadores de DNA, diseñados adecuadamente, que se aparean con la secuencia del transposón, es posible amplificar por PCR el fragmento de unión deseado. Finalmente, se lleva a cabo una reacción de secuenciación de DNA (véanse las Figs. 5-23 y 5-24), con la utilización del fragmento amplificado por PCR como un molde y un cebador de oligonucleótido que coincide, en la secuencia, cerca del extremo del transposón para obtener la secuencia de la unión entre el transposón y el cromosoma.

su uso en la generación experimental de mutaciones por inserción. Una vez que se ha demostrado que la inserción de un elemento P causa una mutación con un fenotipo de interés, las secuencias genómicas adyacente al sitio de inserción pueden amplificarse mediante una variación del protocolo de PCR estándar que utiliza cebadores sintéticos complementarios a la secuencia del elemento P conocido, pero que permite que secuencias vecinas desconocidas sean amplificadas. Uno de estos métodos, descritos en la Figura 5-22, comienza por la rotura del DNA genómico de *Drosophila* que contiene una inserción de elemento P con una enzima de restricción que corta una vez dentro del DNA del elemento P. La colección de los fragmentos de DNA escindidos tratados con DNA ligasa producen moléculas circulares, algunas de las cuales contendrán el DNA del elemento P. La región cromosómica que flanquea al elemento P puede, más tarde, ser amplificada por PCR con el uso de cebadores que coinciden con las secuencias del elemento P y son alargadas en direcciones opuestas. La secuencia del fragmento amplificado resultante puede, entonces, determinarse mediante la utilización de un tercer cebador de DNA. La secuencia crítica para la identificación del sitio de inserción del elemento P es la unión entre el extremo del elemento P y las secuencias genómicas. En general, este enfoque evita la clonación de grandes cantidades de fragmentos de DNA y su búsqueda para detectar un DNA clonado correspondiente al gen mutado de interés.

Se han aplicado técnicas similares en otros organismos cuyas mutaciones por inserción pueden generarse con el uso de elementos móviles de DNA o virus con genomas secuenciados que pueden insertarse de manera aleatoria en el genoma.

Las moléculas de DNA clonado se secuencian de forma rápida mediante métodos basados en la PCR

La caracterización completa de cualquier fragmento de DNA clonado requiere la determinación de su secuencia nucleotídica. La tecnología utilizada para determinar la secuencia de un segmento de DNA representa uno de los campos con mayor crecimiento en la biología molecular. En la década de 1970, F. Sanger y cols. desarrollaron el procedimiento de terminación de la cadena, que sirvió de base para la mayoría de los métodos de secuenciación del DNA de los siguientes 30 años. La idea, detrás de este método, es la de sintetizar a partir del fragmento de DNA a ser secuenciado un conjunto de hebras hijas que están marcadas en un extremo y terminan en uno de los cuatro nucleótidos. La separación de las hebras hijas truncadas mediante electroforesis en gel, que puede resolver las hebras que difieren en longitud por un nucleótido, puede luego revelar la longitud de todas las hebras que terminan en G, A, T, o C. A partir de estos conjuntos de hebras de diferente longitud, puede establecerse la secuencia de nucleótidos del fragmento de DNA original. El método de Sanger ha experimentado numerosos refinamientos y, en la actualidad, puede automatizarse por completo; pero debido a que cada secuencia nueva de DNA requiere una reacción de secuenciación individual separada, la velocidad global a la cual pueden producirse secuencias de DNA nuevas por este método se encuentra limitada por el número total de reacciones que pueden llevarse a cabo cada vez.

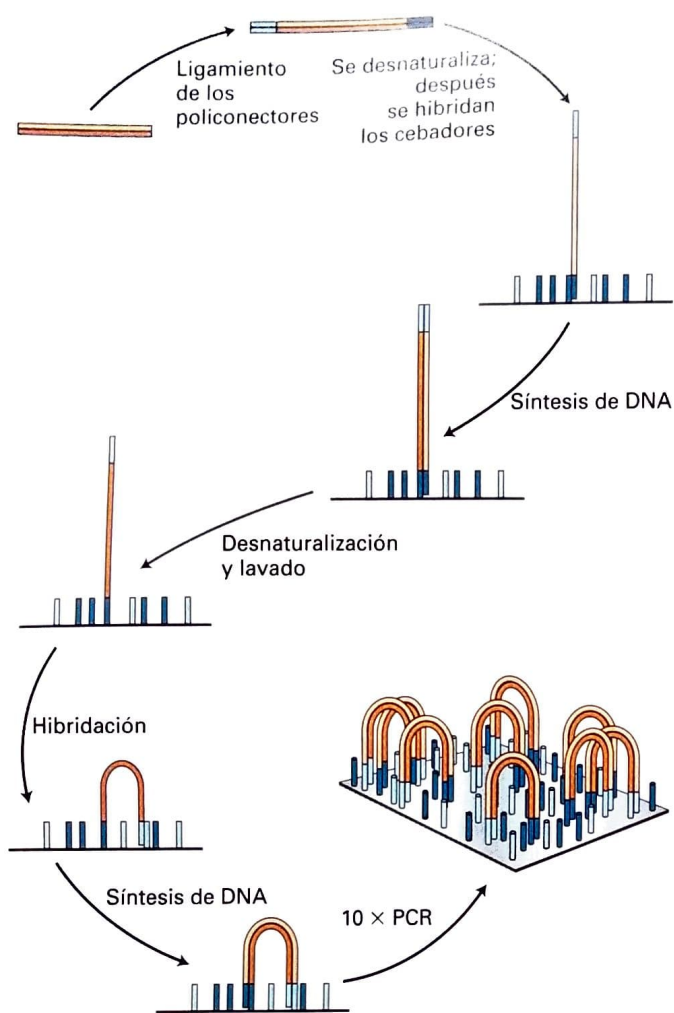


FIGURA EXPERIMENTAL 5-23 Generación de grupos de moléculas idénticas de DNA adheridas a un soporte sólido. Un grupo grande de moléculas de DNA a ser secuenciadas se liga a policonectores de doble hebra, que se unen en cada extremo del fragmento. Luego, el DNA se amplifica por PCR mediante el uso de cebadores que formen apareamiento de bases con las secuencias de los conectores que están unidos por enlaces covalentes a un sustrato sólido. Diez ciclos de amplificación producen alrededor de 1 000 copias idénticas del fragmento de DNA localizado en un grupo pequeño, que se adhiere a ambos extremos del sustrato sólido. Estas reacciones se optimizan para producir aproximadamente 3×10^9 grupos discretos, no solapantes, que están listos para ser secuenciados.

Un gran avance en la tecnología de secuenciación se produjo cuando se diseñaron métodos para permitir que un único instrumento de secuenciación llevara a cabo miles de millones de reacciones de secuenciación simultáneamente al localizar dichas reacciones en diminutos grupos, sobre la superficie de un sustrato sólido. Desde 2007, cuando estuvieron disponibles comercialmente los denominados secuenciadores de la *siguiente generación*, la capacidad para producir secuencias nuevas se incrementó en gran medida y, desde entonces, se ha duplicado cada año. En un método de secuenciación muy difundido, miles de millones de diferentes hebras de DNA para ser secuenciadas son preparadas mediante la unión de policonectores de doble hebra a sus extremos (Fig. 5-23). A continuación, los fragmentos de DNA son amplificados por PCR con el uso de cebadores que forman apareamiento con

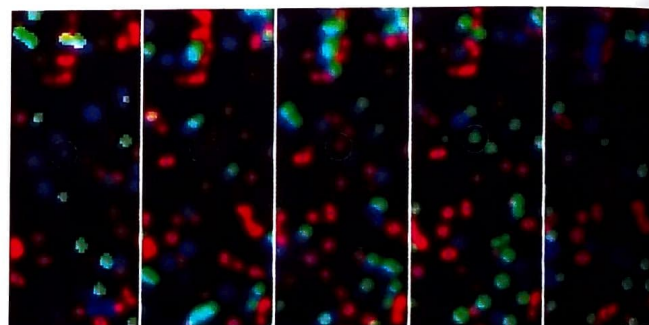
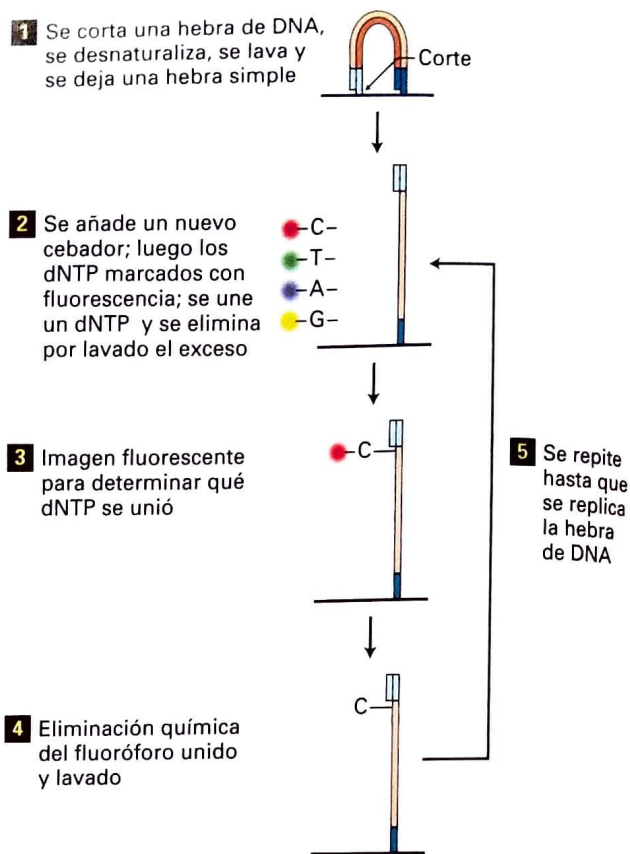


FIGURA EXPERIMENTAL 5-24 Uso de desoxirribonucleótidos trifosatos marcados con fluorescencia para la determinación de la secuencia. La reacción comienza con la rotura de una hebra del DNA agrupado. Después de la desnaturalización, una sola hebra de DNA permanece adherida. Se utiliza un oligonucleótido sintético como cebador, que contiene dNTP para la reacción de polimerización, cada uno con una marca fluorescente de un color diferente. La marca fluorescente está diseñada para bloquear el grupo 3' OH de los dNTP, de manera tal que una vez que se haya incorporado el dNTP fluorescente, no será posible continuar con la elongación. Debido a que la DNA polimerasa incorporará el mismo dNTP fluorescente en cada una de las 100 copias de DNA en un grupo, el grupo entero estará uniformemente marcado con el mismo color fluorescente, del que pueden obtenerse imágenes en un microscopio especial. Una vez que los grupos emiten la imagen, las marcas fluorescentes son eliminadas mediante una reacción química que deja un nuevo extremo de cebador disponible para el siguiente ciclo de adición de dNTP, marcado con fluorescencia. Una reacción de secuenciación típica puede llevar a cabo 100 ciclos de polimerización; esto permite determinar 100 bases de secuencia para cada grupo. Así, una reacción de secuenciación total de este tipo puede generar aproximadamente 3×10^{11} bases de información de secuencia en el término de dos días. (OpenWetWare user Andrea Loehr (http://openwetware.org/wiki/User:Andrea_Loehr)).

las secuencias policonectoras. Esta reacción de amplificación por PCR difiere de la amplificación por PCR estándar mostrada en la Figura 5-20, en la que los cebadores usados están unidos de manera covalente a un sustrato sólido. Así, a medida que se procede a la amplificación por PCR, un extremo de cada hebra de DNA hija se une de modo covalente al sustrato y, al final de la amplificación, se obtienen ~1 000 productos de PCR idénticos unidos a la superficie, en un grupo compacto.

Luego, estos grupos pueden ser secuenciados con el uso un microscopio especial para los desoxirribonucleótidos (dNTP) marcados con fluorescencia a medida que son incorporados por la DNA polimerasa, uno cada vez, en una cadena de DNA creciente (Fig. 5-24). Primero, se corta una hebra y se la elimina con lavado, lo que deja un molde de DNA de una hélice. Luego, se lleva a cabo la secuenciación sobre los ~1 000 moldes idénticos en grupos, un nucleótido por vez. Los cuatro dNTP están marcados con fluorescencia y se añaden a la reacción de secuenciación. Después de que se les permite hibridar, se forma la imagen del sustrato y se registra el color de cada grupo. A continuación, la marca fluorescente se elimina químicamente y se permite que se una un nuevo dNTP. Este ciclo se repite alrededor de 100 veces y da como resultado miles de millones de secuencias de ~100 nucleótidos.

Con el fin de secuenciar una región continua larga del DNA genómico o incluso el genoma completo de un organismo, los investigadores, por lo general, utilizan una de las estrategias esquematizadas en la Figura 5-25. El primer método requiere el aislamiento de una colección de fragmentos de DNA cuya secuencia se solapa. Una vez que se determina la secuencia de uno de estos fragmentos, los oligonucleótidos basados en esa secuencia pueden sintetizarse químicamente para ser utilizados como cebadores en la secuenciación de los fragmentos solapados adyacentes. De esta forma, se determina la secuencia de un segmento largo de DNA que se incrementa progresivamente mediante la secuenciación de los fragmentos de DNA solapados clonados que lo componen. Un segundo método, que se denomina *secuenciación aleatoria del genoma*, evita el paso de aislar una colección ordenada de segmentos de DNA que abarca el genoma. Este método involucra simplemente la secuenciación aleatoria de clones a partir de una biblioteca genómica. Se elige el número total de clones para la secuenciación de manera tal que, en promedio, cada segmento del genoma sea secuenciado alrededor de 10 veces. Este grado de cobertura asegura que cada segmento del genoma es secuenciado más de una vez. Después, la secuencia genómica completa se ensambla mediante el empleo de un algoritmo computacional que alinea todas las secuencias, con el uso de sus regiones superpuestas. La secuenciación aleatoria del genoma es el método más rápido y más rentable para secuenciar segmentos largos de DNA, y la mayoría de los genomas—incluso el genoma humano— han sido secuenciados con esta técnica.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 5.2

Clonación del DNA y caracterización

- En la clonación del DNA, las moléculas de DNA recombinantes se forman in vitro mediante la inserción de fragmentos de DNA en moléculas de DNA vector. Las moléculas de DNA recombinantes luego son introducidas en las células huéspedes, donde se replican; esto produce grandes cantidades de moléculas de DNA recombinantes.
- Las enzimas de restricción (endonucleasas) típicamente cortan el DNA en secuencias palindrómicas específicas, de 4- a 8-pb, y producen

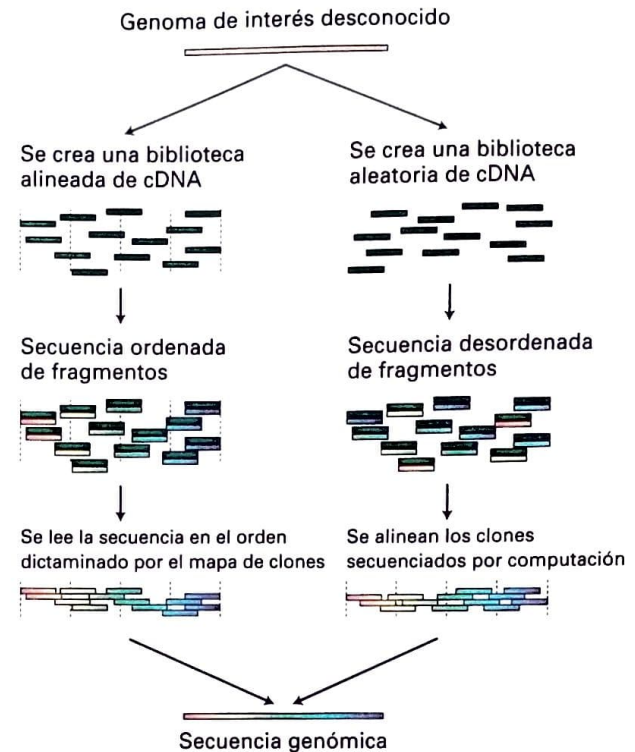


FIGURA EXPERIMENTAL 5-25 Dos estrategias para el ensamblado de las secuencias genómicas completas. Un método (izquierda) depende del aislamiento y ensamblado de un grupo de segmentos de DNA clonados a lo largo del genoma. Esto puede realizarse si se hacen coincidir segmentos clonados mediante hibridación o por alineamiento de mapas de sitios de restricción. Luego, la secuencia de DNA de los clones ordenados puede ser ensamblada en una secuencia genómica completa. El método alternativo (derecha) depende de la relativa facilidad de la secuenciación de DNA automatizada y de si es posible evitar los laboriosos pasos de ordenar la biblioteca. Mediante la secuenciación de clones lo suficientemente aleatorios de la biblioteca, de manera tal que cada segmento del genoma esté representado entre 3 y 10 veces, es posible reconstruir la secuencia genómica mediante alineamiento por computación de un número muy grande de fragmentos de secuencia.

fragmentos que suelen tener colas de una hélice autocomplementarias (extremos cohesivos).

- Dos fragmentos de restricción con extremos cohesivos pueden unirse con la DNA ligasa para formar una molécula (véase la Fig. 5-12).
- Los vectores de clonación de *E. coli* son moléculas de DNA circulares pequeñas (plásmidos) que incluyen tres regiones funcionales: un origen de replicación, un gen de resistencia a un fármaco y un sitio donde puede insertarse un fragmento de DNA. Las células transformadas que llevan un vector se convierten en colonias sobre el medio de selección (véase la Fig. 5-13).
- Una biblioteca de cDNA es un conjunto de clones de cDNA preparados a partir de los mRNA aislados de un tipo particular de tejido. Una biblioteca genómica consiste en un conjunto de clones que llevan fragmentos de restricción producidos por escisión del genoma completo.
- En la clonación de cDNA, los mRNA expresados son convertidos mediante transcripción inversa en DNA complementarios o cDNA. Mediante una serie de reacciones, los cDNA de una hélice son convertidos

en DNA de doble hebra, que luego pueden unirse a un vector plasmídico (véase la Fig. 5-15).

- Puede detectarse un fragmento de DNA clonado particular dentro de una biblioteca mediante hibridación con un oligonucleótido radio-marcado cuya secuencia es complementaria a una parte del fragmento (véase la Fig. 5-16).

- Los vectores lanzadera que se replican tanto en levaduras como en *E. coli* pueden usarse para construir una biblioteca genómica de levadura. Pueden aislarse genes específicos mediante su capacidad para complementar los genes mutantes correspondientes en las células de levadura (véase la Fig. 5-17).

- Los fragmentos de DNA clonado pueden escindirse con enzimas de restricción, lo que produce fragmentos pequeños que luego son separados por electroforesis en gel y subclonados en vectores plasmídicos, antes de que sean secuenciados o manipulados experimentalmente.

- La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permite la amplificación exponencial de un segmento específico de DNA a partir de solo una molécula inicial de DNA molde si se conoce la secuencia que flanquea la región de DNA a ser amplificada (véase la Fig. 5-20).

- La PCR es un método altamente versátil que puede programarse para amplificar una secuencia de DNA genómica, un cDNA o una secuencia en la unión entre un elemento transponible y las secuencias cromosómicas flanqueantes.

- Los fragmentos de DNA de hasta aproximadamente 100 nucleótidos de longitud son secuenciados mediante la generación de agrupamientos de moléculas idénticas por PCR y por la imagen de los precursores nucleotídicos marcados con fluorescencia, incorporados por la DNA polimerasa (véanse las Figs. 5-23 y 5-24).

- Las secuencias de genomas completos pueden ensamblarse a partir de las secuencias de un gran número de clones solapados desde una biblioteca genómica (véase la Fig. 5-25).

5.3 Uso de los fragmentos de DNA clonados para estudiar la expresión génica

En la última sección, se describen las técnicas básicas para el uso de tecnología de DNA recombinante con el fin de aislar DNA específicos y formas en las cuales los clones pueden caracterizarse aún más. Ahora, se considerará como un clon de DNA aislado puede usarse para estudiar la expresión génica. Se analizan diversas técnicas generales, ampliamente utilizadas, que se basan en la hibridación de los ácidos nucleicos para elucidar cuándo y dónde se expresan los genes, como así también métodos para generar grandes cantidades de proteínas y, por otro lado, manipular secuencias de aminoácidos para determinar sus patrones de expresión, estructura y función. En las siguientes secciones, se analizarán aplicaciones más específicas de todas las técnicas básicas.

Las técnicas de hibridación permiten la detección de fragmentos de DNA específicos y mRNA

Dos métodos muy sensibles para la detección de una secuencia de DNA y RNA, dentro de una mezcla compleja, combinan la electrofo-

resis en gel y la hibridación con una sonda de DNA complementaria marcada con radiactividad o fluorescencia. Un tercer método implica la hibridación de sondas marcadas directamente sobre una muestra de tejido preparada. Encontraremos referencias a las tres técnicas, que tienen numerosas aplicaciones, en otros capítulos.

Transferencia Southern (Southern blotting) La primera técnica de hibridación para detectar fragmentos de DNA de una secuencia específica se conoce como *transferencia Southern*, en honor a su creador E. M. Southern. Esta técnica es capaz de detectar un fragmento de restricción específico en la mezcla altamente compleja de fragmentos producidos por la fragmentación del genoma humano completo con una enzima de restricción. Cuando se somete esta mezcla compleja a electroforesis en gel, de manera tal que muchos fragmentos diferentes de casi la misma longitud estén presentes, no es posible resolver los fragmentos de DNA particulares como una banda discreta en el gel. No obstante, puede identificarse un fragmento particular que migra como una banda sobre el gel por su capacidad de hibridar a una sonda de DNA específica. Para lograr esto, los fragmentos de restricción presentes en el gel son desnaturalizados con álcali y transferidos a un filtro de nitrocelulosa o membrana de nailon mediante transferencia (Fig. 5-26). Este procedimiento preserva la distribución de los fragmentos en el gel y crea una réplica del gel en el filtro. (La transferencia se usa debido a que las sondas no se difunden rápidamente en el gel original). Después, el filtro se incuba en condiciones de hibridación con una sonda de DNA específica marcada, que suele ser generada a partir de un fragmento de restricción clonado. El fragmento de restricción de DNA que es complementario a la sonda se hibrida, y su localización sobre el filtro puede revelarse mediante autorradiografía para una sonda radiomarcada o por imagen fluorescente para una sonda marcada con fluorescencia. A pesar de que la PCR se utiliza muy comúnmente para detectar la presencia de una secuencia particular en una mezcla compleja, la transferencia Southern todavía es útil para reconstruir la relación entre secuencias genómicas que están demasiado separadas como para ser amplificadas por PCR en una única reacción.

Transferencia Northern Una de las formas más básicas para caracterizar un gen clonado consiste en determinar cuándo y dónde se expresa el gen en un organismo. La expresión de un gen particular puede seguirse a través de la evaluación del mRNA correspondiente mediante **transferencia Northern**—denominada así por un juego de palabras— después del método relacionado de transferencia Southern. Una muestra de RNA, a menudo el RNA celular total, se desnaturaliza mediante tratamiento con un agente, como el formaldehído, que interrumpe los enlaces de hidrógeno entre pares de bases, lo que asegura que todas las moléculas de RNA tengan una conformación lineal, desplegada. Los RNA individuales se separan de acuerdo con su tamaño por electroforesis en gel y se los transfiere a un filtro de nitrocelulosa al cual se adhieren los RNA desnaturalizados extendidos. Al igual que en la transferencia Southern, después se expone el filtro a una sonda de DNA marcada que es complementaria al gen de interés; finalmente, el filtro marcado es sometido a autorradiografía. Como la cantidad de RNA específico en una muestra puede estimarse a partir de una transferencia Northern, el procedimiento es ampliamente utilizado para comparar cantidades de un mRNA particular en células que se encuentran en diferentes condiciones (Fig. 5-27).

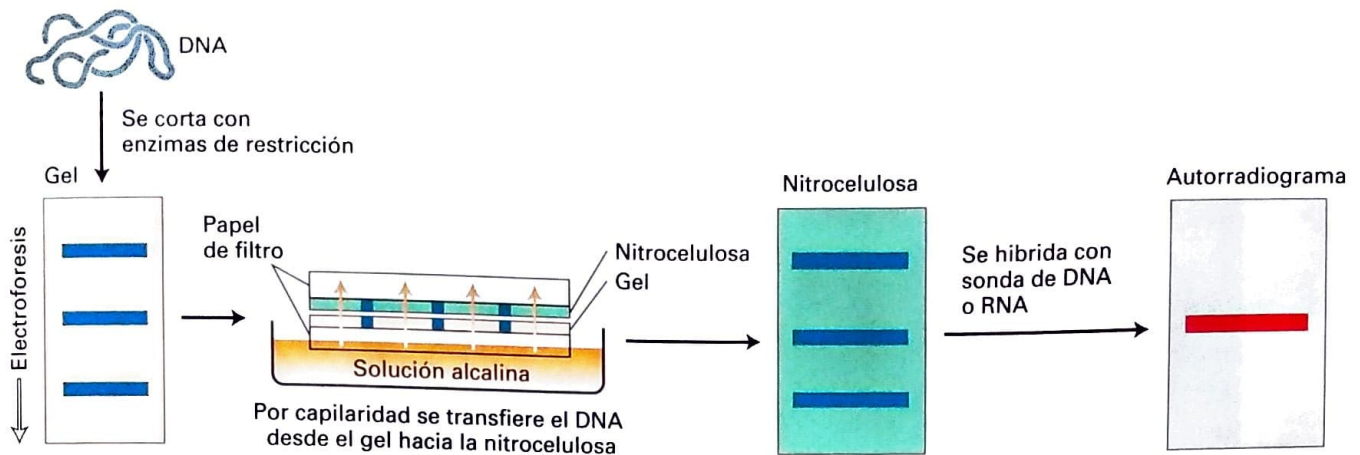


FIGURA EXPERIMENTAL 5-26 La técnica de transferencia Southern puede detectar un fragmento de DNA específico en una mezcla compleja de fragmentos de restricción. El diagrama describe tres fragmentos de restricción en el gel, pero el procedimiento puede ampliarse a una mezcla

de millones de fragmentos de DNA. Solo los fragmentos que se hibridan a una sonda marcada darán una señal sobre un autorradiograma. Una técnica similar, denominada transferencia Northern, detecta los mRNA específicos dentro de una mezcla. (Véase E. M. Southern, 1975, *J. Mol. Biol.* **98**:508.)

Hibridación in situ La transferencia Northern requiere la extracción de mRNA a partir de una célula o mezcla de células, lo que significa que las células se eliminan de sus localizaciones normales dentro de un organismo o tejido. Como resultado, se pierde la localización de una célula y su relación con sus vecinas. Para retener esa información posicional en estudios precisos de expresión génica, un tejido seccio-

nado o entero, o incluso un embrión permeabilizado entero, puede ser sometido a hibridación in situ para detectar el mRNA codificado por un gen particular. Esta técnica permite que la transcripción por gen sea monitorizada en tiempo y en espacio (Fig. 5-28).

Las micromatrices de DNA pueden utilizarse para evaluar la expresión de muchos genes a la vez

La monitorización simultánea de la expresión de miles de genes es posible mediante el análisis de las micromatrices de DNA, otra técnica basada en el concepto de hibridación de ácido nucleico. Una **micromatriz de DNA** consiste en una disposición organizada de miles de secuencias específicas de genes individuales, estrechamente empaquetados, adheridos a la superficie de un portaobjeto de vidrio. Al acoplar el análisis de las micromatrices con los resultados de los proyectos de secuenciación genómica, los investigadores pueden analizar los patrones globales de expresión génica de un organismo durante las respuestas fisiológicas o los procesos del desarrollo.

Preparación de las micromatrices de DNA En un método para la preparación de micromatrices, una parte de ≈ 1 kb de la región codificante de cada gen analizado se amplifica individualmente por PCR. Se utiliza un dispositivo robótico para aplicar cada muestra de DNA amplificado a la superficie de un portaobjeto de vidrio, que luego es procesado químicamente para que las secuencias de DNA se adhieran en forma permanente a la superficie de vidrio y para desnaturalizarlas. Un ordenamiento típico podría contener $\approx 6\,000$ puntos de DNA en una matriz de 2×2 cm.

Con un método alternativo, se sintetizan múltiples oligonucleótidos de DNA, en general de al menos 20 nucleótidos de longitud, a partir de un nucleótido inicial que se une de forma covalente a la superficie de un portaobjeto. Puede programarse la síntesis de un oligonucleótido de secuencia específica en una región pequeña, sobre la superficie de un portaobjeto. Diversas secuencias de oligonucleótidos de un único gen son, por ende, sintetizadas en las regiones vecinas del portaobjeto para analizar la expresión de ese gen. Por medio de este método, pueden producirse los oligonucleótidos que representan miles de genes en un

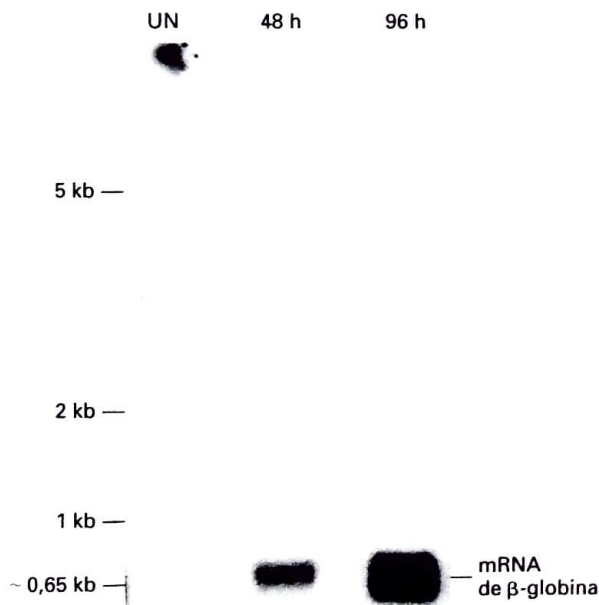


FIGURA EXPERIMENTAL 5-27 El análisis de transferencia Northern revela la expresión elevada del mRNA de la β-globina en las células de eritrocitos diferenciados. El mRNA total, en extractos de células de eritroleucemia que fueron cultivadas pero no inducidas y en células inducidas a detener el crecimiento, a las que se les permitió diferenciarse por 48 o 96 horas, fue analizado por transferencia Northern para el mRNA de la β-globina. La intensidad de una banda es proporcional a la cantidad de mRNA presente. El mRNA de la β-globina apenas se detecta en las células inducidas (carril UN), pero aumenta más de 1 000 veces a las 96 horas posteriores a la inducción de la diferenciación. (Cortesía de K. Kole.)

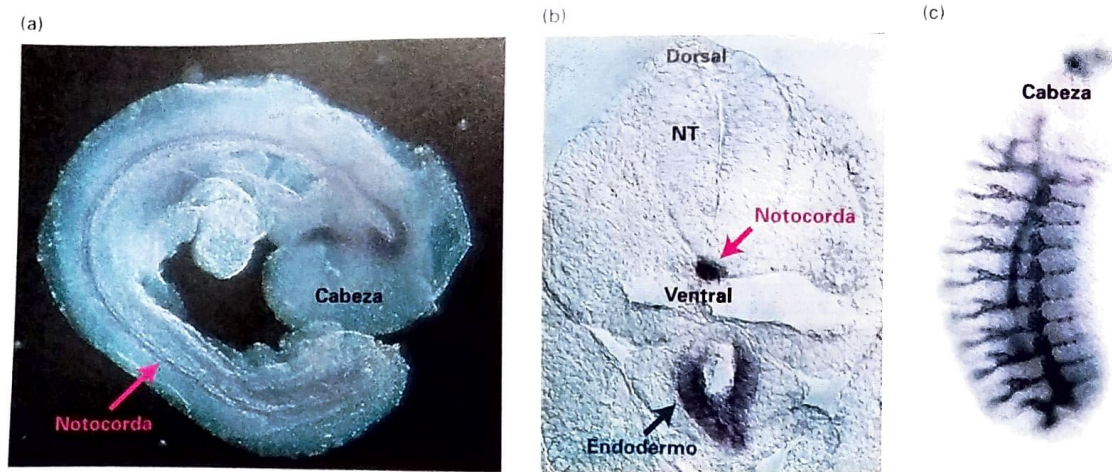


FIGURA EXPERIMENTAL 5-28 La hibridación in situ puede detectar actividad de genes específicos en embriones completos o seccionados. El espécimen se permeabiliza mediante tratamiento con detergente y una proteasa, para exponer el mRNA a la sonda. Una sonda de DNA o RNA, específica para el mRNA de interés, se sintetiza con análogos de nucleótido que contienen grupos químicos que pueden ser reconocidos por anticuerpos. Después de que el espécimen permeabilizado se ha incubado con la sonda bajo condiciones que estimulan la hibridación, se elimina el exceso de sonda con una serie de lavados. Luego, el espécimen es incubado en una solución que contiene un anticuerpo que se une a la sonda. Este anticuerpo está unido, mediante enlaces covalentes, a una enzima informadora (p. ej., peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina) que produce un producto de reacción coloreado. Después de eliminar el exceso de anticuerpo, se añade el sustrato

para la enzima informadora. Se forma un precipitado coloreado en el que la sonda se ha hibridado al mRNA que se está detectando. (a) Un embrión completo de ratón de alrededor de 10 días de desarrollo analizado para el mRNA *Sonic hedgehog*. La tinción marca la notocorda (flecha roja), un cilindro de mesodermo que transcurre a lo largo de la futura médula espinal. (b) Una sección de un embrión murino similar al de la parte (a). Pueden observarse el eje dorsal/ventral del tubo neural (TN), con la notocorda, que expresa *Sonic hedgehog* (flecha roja) por debajo de éste, y el endodermo (flecha azul), aún más ventral. (c) Embrión completo de *Drosophila*, analizado para un mRNA producido durante el desarrollo de la tráquea. Se evidencia el patrón repetitivo de los segmentos corporales. La parte anterior (cabeza) se encuentra arriba; la ventral, abajo. (Cortesía de L. Milenkovic y M. P. Scott.)

único portaobjeto. Debido a que estos métodos para diseñar esos ordenamientos de oligonucleótidos sintéticos fueron adaptados a partir de otros, diseñados para la fabricación de circuitos integrados microscópicos utilizados en las computadoras, estos tipos de disposiciones de micromatrices de oligonucleótidos suelen denominarse *chips* de DNA.

Uso de las micromatrices para comparar la expresión génica en diferentes condiciones. El paso inicial, en un estudio de expresión de micromatrices, consiste en preparar los cDNA marcados con fluorescencia que corresponden a los mRNA expresados por las células en estudio. Cuando se aplican los cDNA a una micromatriz, los puntos que representan genes que son expresados se hibridarán, en condiciones adecuadas, a sus cDNA complementarios en la sonda marcada y pueden, posteriormente, detectarse con un microscopio láser de barrido.

La Figura 5-29 describe cómo puede aplicarse este método para analizar los cambios en la expresión génica observada después de que fibroblastos humanos son transferidos desde un medio de crecimiento pobre a uno rico, que contiene suero. En este tipo de experimento, se marcan las preparaciones de cDNA separadas, provenientes de estos dos tipos de fibroblastos, en medios de crecimiento pobre y rico, con diferentes colorantes fluorescentes. Después, una matriz de DNA con 8 600 genes de mamíferos es incubada con una mezcla que contiene iguales cantidades de dos preparaciones de cDNA no hibridado, se mide la intensidad de la fluorescencia verde y roja en cada punto del DNA con el uso de un microscopio de fluorescencia; esto se almacena en archivos de computación con el nombre de cada gen, según su posición conocida en el portaobjeto. Las intensidades relativas de las señales de fluorescencia verde y roja de cada punto son una medida de los niveles de expresión

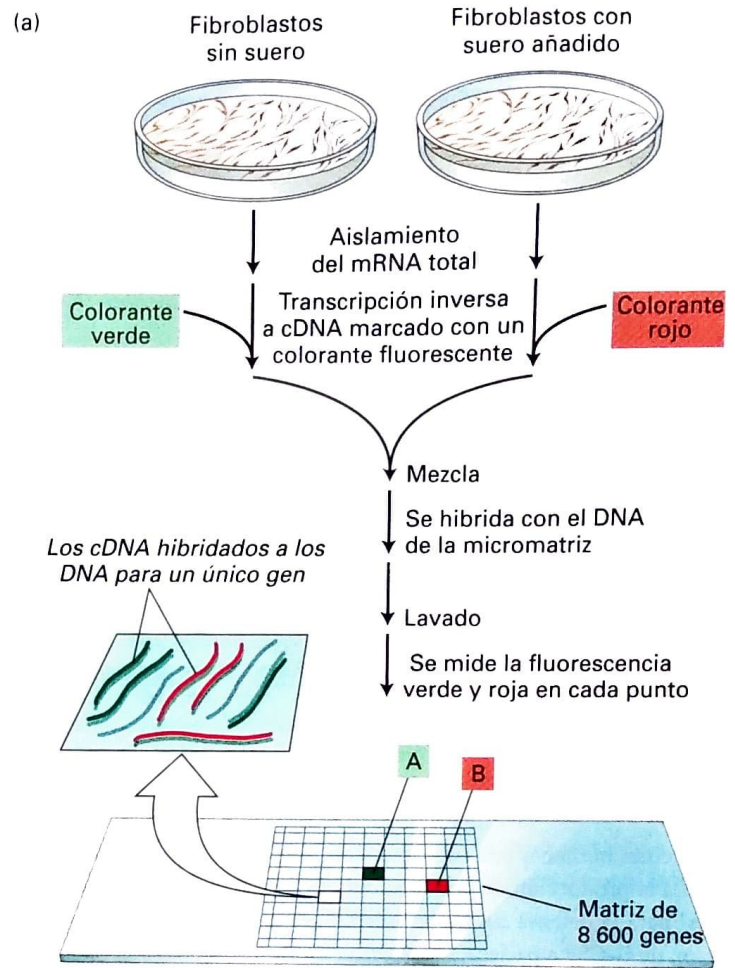
de ese gen en respuesta al suero. Los genes que no se transcriben en estas condiciones de crecimiento no dan señal detectable. Los genes que se transcriben a igual nivel en ambas condiciones se hibridarán por igual a las dos preparaciones de cDNA, marcadas con verde y rojo. El análisis de micromatrices de la expresión génica, en fibroblastos, demostró que la transcripción de alrededor de 500 de los 8 600 genes analizados cambiaba sustancialmente después del agregado de suero.

El análisis de grupos de experimentos de expresión múltiple identifica los genes corregulados

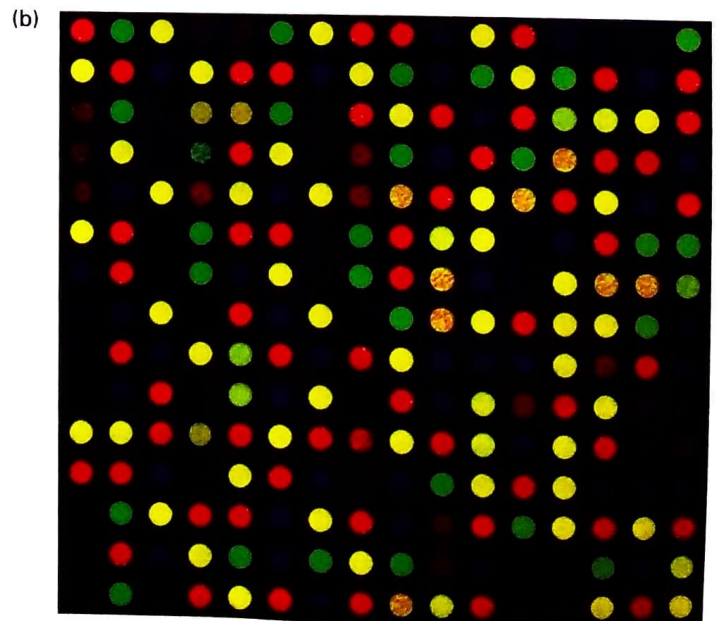
Raramente, pueden extraerse conclusiones firmes a partir de un único experimento de micromatrices acerca de si los genes que exhiben similares cambios en la expresión están regulados conjuntamente y, por lo tanto, es probable que estén relacionados funcionalmente. Por ejemplo, muchas de las diferencias observadas en la expresión génica recién descrita en los fibroblastos podrían ser consecuencias indirectas de los numerosos cambios diferentes que se producen en la fisiología celular cuando las células son transferidas de un medio a otro. En otras palabras, los genes que parecen estar corregulados en un único experimento de micromatrices pueden sufrir cambios en la expresión por diversas razones y, en realidad, pueden tener funciones biológicas muy diferentes. Una solución a este problema es combinar la información de un conjunto de experimentos de matrices de expresión para encontrar genes que están regulados de forma similar, bajo una variedad de condiciones o durante un período de tiempo.

Este uso, más informativo de los experimentos de matrices de expresión múltiple, es ilustrado por el examen de la expresión relativa de los 8 600 genes en distintos momentos después de la adición del

FIGURA EXPERIMENTAL 5-29 El análisis de micromatrices de DNA puede revelar diferencias de la expresión génica en los fibroblastos en distintas condiciones experimentales. (a) En este ejemplo, el cDNA, preparado a partir de mRNA aislado de fibroblastos privados de suero o después de añadir suero, se marcó con diferentes colorantes privados de suero o después de añadir suero, se marcó con diferentes colorantes fluorescentes. Se expone una micromatriz compuesta de puntos de DNA que representan 8 600 genes de mamífero, en una mezcla de partes iguales de dos preparaciones de cDNA, en condiciones de hibridación. La relación de las intensidades de fluorescencia roja y verde en cada punto, detectada con un microscopio láser confocal de barrido, indica la expresión relativa de cada gen en respuesta al suero. (b) Una microfotografía de un segmento pequeño de una micromatriz de DNA genúina. Cada punto, en esta matriz de 16 x 16, contiene DNA de un gen diferente hibridado a muestras de cDNA control y experimental, marcadas con colorantes fluorescentes rojo y verde. (Un punto amarillo indica igual hibridación de la fluorescencia verde y roja, lo que evidencia que no hay cambio en la expresión génica). (Parte [b] Alfred Pasieka/Photo Researchers, Inc.)



- A** Si un punto es verde, la expresión de ese gen disminuye en las células después de la adición del suero
- B** Si un punto es rojo, la expresión para ese gen aumenta en las células después de la adición de suero



suero, lo que genera más de 104 piezas individuales de información. Un programa de ordenador, relacionado con el que se emplea para determinar el grado de relación de diferentes secuencias de proteínas, puede organizar esta información y agrupar los genes que muestran expresión similar en el transcurso del tiempo, después del agregado de suero. Notablemente, estos *análisis de agrupamientos (cluster)* reúnen conjuntos de genes cuyas proteínas codificadas participan en un proceso celular en común, como la biosíntesis de colesterol o el ciclo celular (Fig. 5-30).



En el futuro, el análisis de micromatrices será una herramienta de diagnóstico muy poderosa en medicina. Por ejemplo, se ha encontrado que grupos particulares de mRNA distinguen tumores con un mal pronóstico de aquellos que presentan uno bueno. Enfermedades anteriormente indistinguibles ahora son detectables. El análisis de las biopsias de tumores para estos mRNA ayudará a los médicos a seleccionar el tratamiento más adecuado. A medida que se reconozcan más patrones de expresión génica característicos de varios tejidos diseccionados, el uso diagnóstico de las micromatrices de DNA se extenderá a otros trastornos. ■

Los sistemas de expresión de *E. coli* pueden producir grandes cantidades de proteínas a partir de genes clonados



Muchas hormonas proteicas y otras proteínas de señalización o regulación se expresan normalmente en concentraciones muy bajas, si se excluye su aislamiento y purificación en grandes cantidades mediante técnicas bioquímicas estándar. El uso terapéutico generalizado de estas proteínas, como así también la investigación básica de su estructura y función, depende de los procedimientos eficaces para su producción en grandes cantidades, a un costo razonable. Las técnicas de DNA recombinantes que convierten las células de *E. coli* en fábricas para la síntesis de proteínas de baja abundancia, en la actualidad, se utilizan para producir comercialmente factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), insulina, hormona del crecimiento y otras

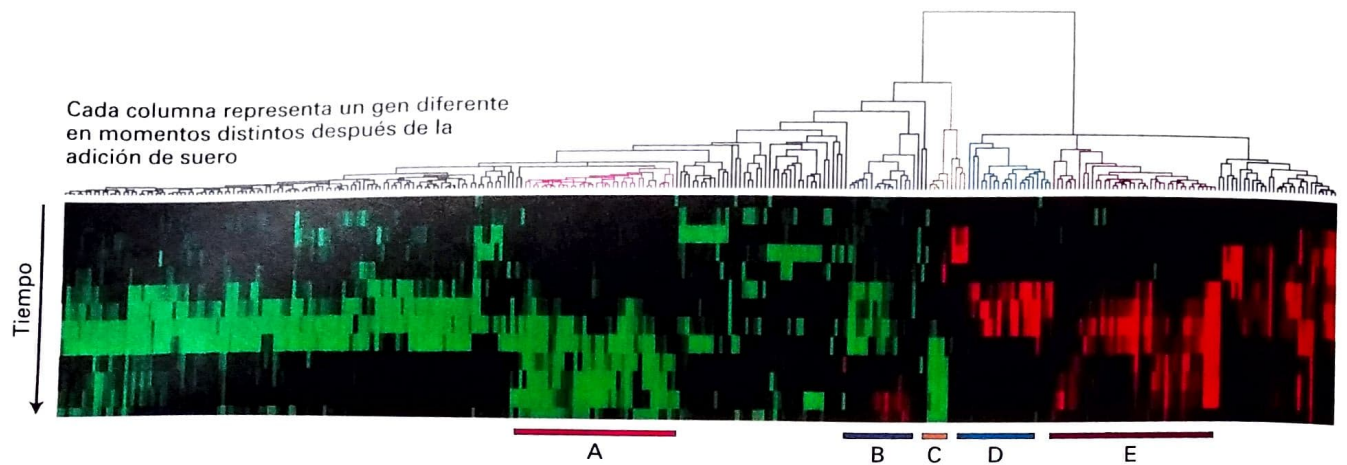


FIGURA EXPERIMENTAL 5-30 El análisis de grupo (cluster) de datos de múltiples experimentos de expresión de micromatrices pueden identificar los genes coregulados. La expresión de 8 600 genes de mamífero fue detectada mediante análisis de micromatrices, en intervalos, durante un período de 24 horas después de añadir suero a los fibroblastos cultivados en un medio pobre. El diagrama de grupo que se muestra aquí se basa en un algoritmo informático que agrupa genes que evidencian cambios similares en la expresión, en comparación con una muestra control sin suero, a lo largo del tiempo. Cada columna de los recuadros coloreados representa un único gen, y cada fila representa un punto del tiempo. Un recuadro rojo indica un incremento en la expresión en relación con el control; un recuadro verde, una

disminución en la expresión; y un recuadro negro, sin cambio significativo en la expresión. El esquema del "árbol", en la parte superior, muestra cómo la expresión de los patrones para genes individuales puede organizarse de modo jerárquico para agrupar los genes con la mayor similitud en sus patrones de expresión, a lo largo del tiempo. En este experimento, se identificaron cinco grupos de genes regulados coordinadamente, como lo indican las barras en la parte inferior. Cada grupo contiene múltiples genes cuyas proteínas codificadas funcionan en un proceso celular particular: biosíntesis de colesterol (A), el ciclo celular (B), la respuesta inmediata-temprana (C), señalización y angiogénesis (D), y reparación del tejido y cicatrización de heridas (E). (Cortesía de Michael B Eisen, Lawrence Berkeley National Laboratory)

proteínas humanas con usos terapéuticos. Por ejemplo, el G-CSF estimula la producción de granulocitos, el glóbulo blanco fagocítico crucial para la defensa contra las infecciones bacterianas. La administración de G-CSF a pacientes con cáncer ayuda a compensar la reducción en la producción de granulocitos causada por los agentes quimioterapéuticos; de este modo, se protege a los pacientes de las infecciones graves mientras reciben quimioterapia. ■

El primer paso en la producción de grandes cantidades de una proteína de baja abundancia es obtener un clon de cDNA que codifica la proteína en su longitud total mediante métodos que se analizaron anteriormente. El segundo paso consiste en diseñar vectores plasmídicos que expresarán grandes cantidades de la proteína codificada cuando se los inserte en las células de *E. coli*. La clave para diseñar dichos vectores de expresión es incluir un promotor, una secuencia de DNA a partir de

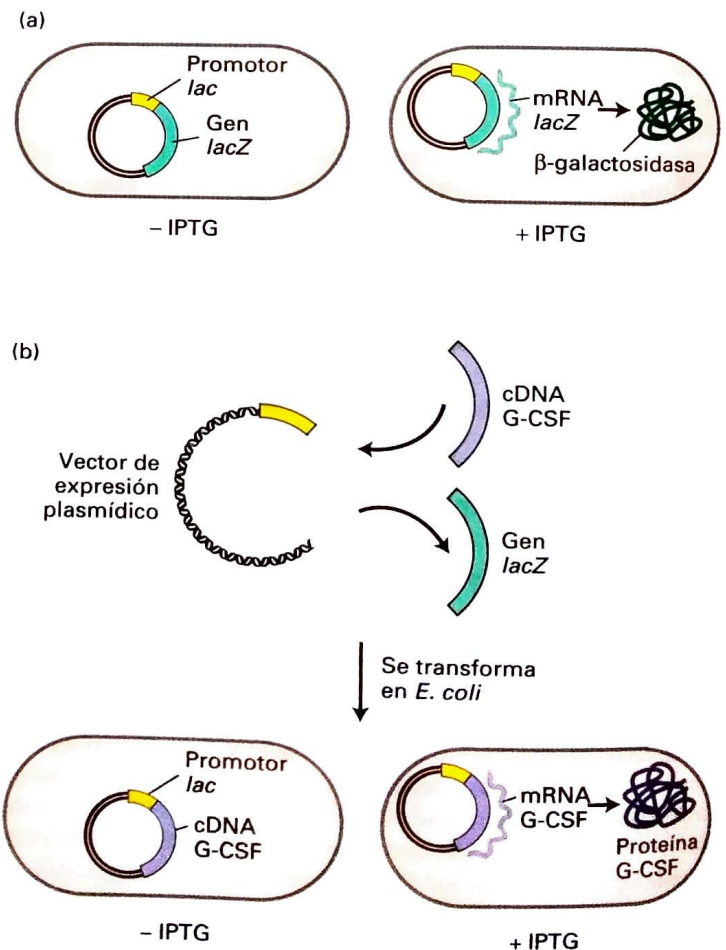


FIGURA EXPERIMENTAL 5-31 Algunas proteínas eucariotas pueden producirse en células de *E. coli* a partir de vectores plasmídicos que contienen el promotor *lac*. (a) El vector de expresión plasmídico contiene un fragmento de cromosoma de *E. coli*, que tiene el promotor *lac* y el gen *lacZ* vecino. En presencia del análogo de lactosa IPTG, la RNA polimerasa normalmente transcribe el gen *lacZ*, produciendo mRNA *lacZ*, que es traducido a la proteína codificada, β -galactosidasa. (b) El gen *lacZ* puede ser cortado para extraerlo del vector de expresión, con enzimas de restricción, y reemplazarlo por un cDNA clonado; en este caso, uno que codifica el factor estimulador de colonias de granulocito (G-CSF). Cuando el plásmido resultante es transformado en células de *E. coli*, la adición de IPTG y su transcripción posterior, a partir del promotor *lac*, produce el mRNA G-CSF, que se traduce en la proteína G-CSF.

la cual puede comenzar la transcripción del cDNA. Considérese, por ejemplo, el sistema relativamente simple para la expresión de G-CSF que se muestra en la Figura 5-31. En este caso, G-CSF se expresa en *E. coli* transformada con vectores plasmídicos que contienen el promotor *lac* adyacente al cDNA clonado que codifica G-CSF. La transcripción a partir del promotor *lac* se produce a altas velocidades solo cuando se añade al medio de cultivo un análogo de la lactosa, como el isopropiltiogalactosidasa (IPTG). Incluso pueden producirse cantidades más grandes de una proteína deseada en sistemas de expresión de *E. coli* más complicados.

Para ayudar en la purificación de una proteína eucarionte producida en un sistema de expresión de *E. coli*, los investigadores suelen modificar el cDNA que codifica la proteína recombinante para facilitar su separación de las proteínas endógenas de *E. coli*. Una modificación de este tipo, que se utiliza con frecuencia, es añadir una secuencia nucleotídica al extremo del cDNA, de manera tal que la proteína expresada tendrá seis residuos de histidina en el C-terminal. Las proteínas modificadas de esta forma se unen más fuertemente a una matriz de afinidad que contiene átomos de níquel quelados, mientras que la mayoría de las proteínas de *E. coli* no se unen a esa matriz. Las proteínas unidas pueden liberarse de los átomos de níquel mediante disminución del pH del medio circundante. En la mayoría de los casos, este procedimiento genera una proteína recombinante pura que es funcional, puesto que la adición de secuencias de aminoácidos cortas al C-terminal o al N-terminal de una proteína no suele interferir en la actividad bioquímica de la proteína.

Los vectores de expresión plasmídicos pueden ser diseñados para utilizarlos en sistemas animales

Aunque los sistemas de expresión bacterianos pueden utilizarse para crear grandes cantidades de algunas proteínas, las bacterias no pueden usarse en todos los casos. Numerosos experimentos para examinar la función de una proteína en un contexto celular adecuado requieren la expresión de una proteína genéticamente modificada en células animales cultivadas. Los genes se clonan en vectores de expresión eucariontes especializados y son introducidos en células animales cultivadas mediante un proceso de **transfección** celular. Dos métodos comunes para transfectar células animales difieren en lo siguiente: si el vector de DNA está integrado en el DNA genómico de la célula huésped o no lo está.

En ambos métodos, las células animales cultivadas deben ser tratadas para facilitar la incorporación del vector plasmídico recombinante. Esto puede realizarse exponiendo las células a una preparación de lípidos que penetran la membrana plasmática y aumentan su permeabilidad al DNA. Alternativamente, se somete a las células a un breve impulso eléctrico de varios miles de volts, una técnica que se conoce como **electroporación** que las torna, de manera transitoria, permeables al DNA. Por lo general, el DNA del plásmido se añade en concentración suficiente como para asegurar que una gran proporción de las células cultivadas recibirá, al menos, una copia del DNA plasmídico. Los investigadores también han aprovechado los virus para utilizarlos en el laboratorio; los virus pueden ser modificados para que contengan DNA de interés, que luego es introducido en células huéspedes simplemente infectándolas con el virus recombinante.

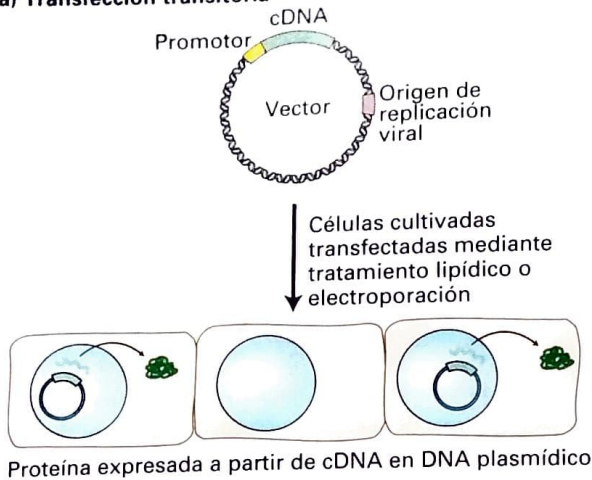
Transfección transitoria El más simple de los dos métodos de expresión, denominado *transfección transitoria*, emplea un vector similar a los vectores lanzadera de levadura descritos anteriormente. Para su

uso en células de mamífero, los vectores plasmídicos son modificados también para que lleven un origen de replicación derivado de un virus que infecta células de mamífero, un promotor fuerte reconocido por las RNA polimerasas de mamífero, y el cDNA clonado que codifica la proteína a ser expresada adyacente al promotor (Fig. 5-32a). Una vez que el vector plasmídico ingresa en una célula de mamífero, el origen de replicación viral le permite replicarse de manera eficiente y generar numerosos plásmidos a partir de los cuales se expresa la proteína. Sin embargo, durante la división celular, estos plásmidos no son segregados fielmente en ambas células hijas y, por un tiempo, una fracción sustancial de las células en un cultivo no contendrá un plásmido, de allí el nombre *transfección transitoria*.

Transfección estable (transformación) Si un vector introducido se integra en el genoma de la célula huésped, el genoma se altera permanentemente y, en cuanto a la célula, se dice que está *transformada*. Es muy probable que la integración se logre mediante enzimas de mamífero que normalmente funcionan en la reparación y la recombinación del DNA. Un marcador de selección comúnmente utilizado es el gen de la neomicina fosfotransferasa (designado *neo^r*), que confiere resistencia a un compuesto tóxico químicamente relacionado con la neomicina, conocido como G-418. En la Figura 5-32b, se esquematiza el procedimiento básico para la expresión de un cDNA clonado mediante *transfección estable*. Solo aquellas células que han integrado el vector de expresión en el cromosoma huésped sobrevivirán y darán origen a un clon, en una concentración elevada de G-418. Como la integración se produce en sitios aleatorios en el genoma, los clones individuales transformados resistentes a G-418 diferirán en sus velocidades de transcripción del cDNA insertado. Por lo tanto, los transfectantes estables suelen rastrearse para identificar aquellos que producen la proteína de interés en las concentraciones más elevadas.

Sistemas retrovirales de expresión Los investigadores han explotado los mecanismos básicos usados por los virus para la introducción de material genético en las células animales y posterior inserción en el DNA cromosómico para incrementar, en gran medida, la eficiencia por la cual un gen modificado puede ser expresado de manera estable en células animales. Un ejemplo de uno de estos vectores de expresión proviene de una clase de retrovirus conocidos como *lentivirus*. Como se muestra en la Figura 5-33, tres plásmidos diferentes, introducidos en las células por transfección transitoria, se utilizan para producir partículas de lentivirus recombinantes adecuadas, para la introducción eficiente de un gen clonado en células diana de animales. El primer plásmido, conocido como *vector plasmídico*, contiene un gen clonado de interés próximo a un marcador de selección como *neo^r*, flanqueado por secuencias LTR lentivirus. Como se describe en el Capítulo 6, las secuencias LTR víricas que dirigen la síntesis de una molécula de RNA viral pueden ser copiadas en el DNA mediante transcripción inversa y, luego, integrarse al DNA cromosómico. Un segundo plásmido, conocido como plásmido de empaquetamiento, lleva todos los genes virales, excepto para la proteína principal de la envoltura viral, necesaria para el empaquetamiento del RNA viral, que contiene los LTR en una partícula de lentivirus funcional. El plásmido final permite la expresión de una proteína de la envoltura viral que, cuando se incorpore a un lentivirus recombinante, permitirá que las partículas virales híbridas resultantes infecten un tipo deseado de célula diana. Una proteína común de la envoltura empleada en este contexto es la glucoproteína del virus de la estomatitis vesicular (proteína VSV-G), que rápidamente puede

(a) Transfección transitoria



(b) Transfección estable (transformación)

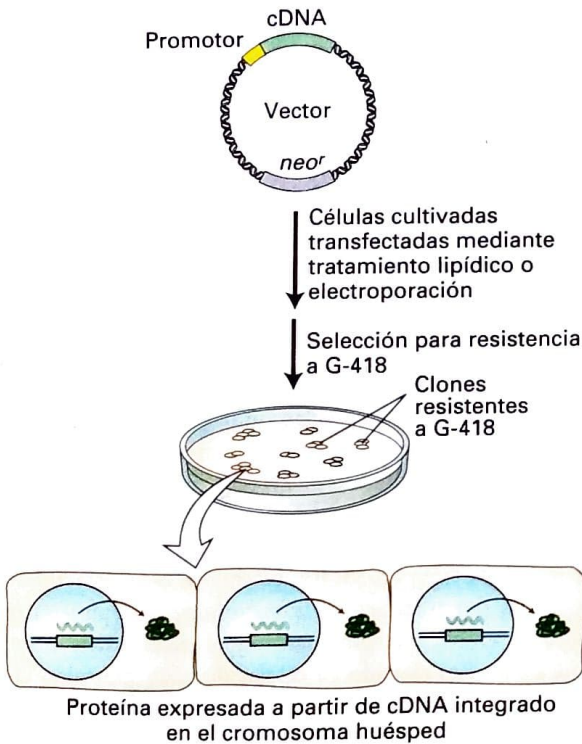


FIGURA EXPERIMENTAL 5-32 La transfección estable y transitoria con vectores plasmídicos diseñados especialmente permite la expresión de genes clonados en células animales cultivadas. Ambos métodos emplean vectores plasmídicos que contienen los elementos usuales –ORI, marcador seleccionable (p. ej., *amp^r*), y policonector– que permiten la propagación en *E. coli* y la inserción de un cDNA con un promotor animal adyacente. Por simplicidad, estos elementos no se describen. (a) En la transfección transitoria, el vector plasmídico contiene un origen de replicación para un virus que puede replicarse en las células animales cultivadas. Como el vector no se incorpora en el genoma de las células cultivadas, la producción de la proteína codificada por el cDNA continúa solo por un tiempo limitado. (b) En la transfección estable, el vector lleva un marcador seleccionable como *neo^r*, que confiere resistencia a G-418. Como el vector está integrado en el genoma, estas células transformadas, o transfectadas, continuarán produciendo la proteína codificada por el cDNA mientras se mantenga el cultivo. Véase el texto para más detalles.

la transfección estable, las células con un gen clonado integrado de manera estable y el marcador *neo^r* pueden seleccionarse por su resistencia a G-418. Muchas de las técnicas para la inactivación de la función de genes específicos (véase la Sección 5-5) requieren que una población de células cultivadas sea modificada genéticamente de manera simultánea. Los lentivirus modificados genéticamente son particularmente útiles, ya que infectan células con una eficiencia muy elevada, de manera tal que cada célula de una población recibirá, al menos, una copia del plásmido transmitido por el virus.

Marcado de proteínas y genes. Los vectores de expresión pueden aportar una forma de estudiar la expresión y la localización intracelular de proteínas eucariontes. Este método suele depender del uso de una proteína informadora, como la *proteína verde fluorescente (GFP)*, que puede ser detectada en las células de manera conveniente. Aquí, describimos dos modos de crear un gen híbrido que conecta la expresión de la proteína informadora a la proteína de interés. Cuando el gen híbrido es reintroducido en las células, ya sea por transfección con un vector de expresión plasmídico que contiene un gen modificado o por creación de un animal transgénico –como se describe en la Sección 5.5–, la expresión de la proteína informadora puede utilizarse para determinar dónde y cuándo se expresa un gen. Este método proporciona datos similares a los experimentos de hibridación in situ descritos anteriormente; pero, a menudo, con una mayor resolución y sensibilidad.

La Figura 5-34 ilustra el uso de dos tipos diferentes de experimentos de marcado con GFP para estudiar la expresión de una proteína receptora odorante en *C. elegans*. Cuando el promotor para el receptor odorante se une directamente a la secuencia codificante de la GFP en una configuración conocida como *promotor de fusión*, la GFP se expresa en neuronas específicas y llena el citoplasmas de estas neuronas. Por el contrario, cuando el gen híbrido se construye mediante unión de la GFP a la secuencia codificante del receptor, la *proteína de fusión* resultante puede localizarse por la fluorescencia de la GFP en los cilios distales, en las neuronas sensitivas, el sitio en el cual se localiza normalmente la proteína receptora.

Una alternativa al marcado con GFP para detectar la localización intracelular de una proteína es modificar el gen de interés mediante la fusión de éste con una secuencia de DNA corta que codifica un

reemplazar la proteína normal de la envoltura del lentivirus sobre la superficie de partículas virales completas y permitirá que las partículas virales resultantes infecten una variedad de tipos celulares de mamíferos, incluso células madre hematopoyéticas y neuronas, además de células hepáticas y musculares. Después de la infección celular, el gen clonado, flanqueado por secuencias LTR virales, se transcribe a la inversa en el DNA, que es transportado hacia el interior del núcleo y luego es integrado en el genoma huésped. Si es necesario, como en el caso de

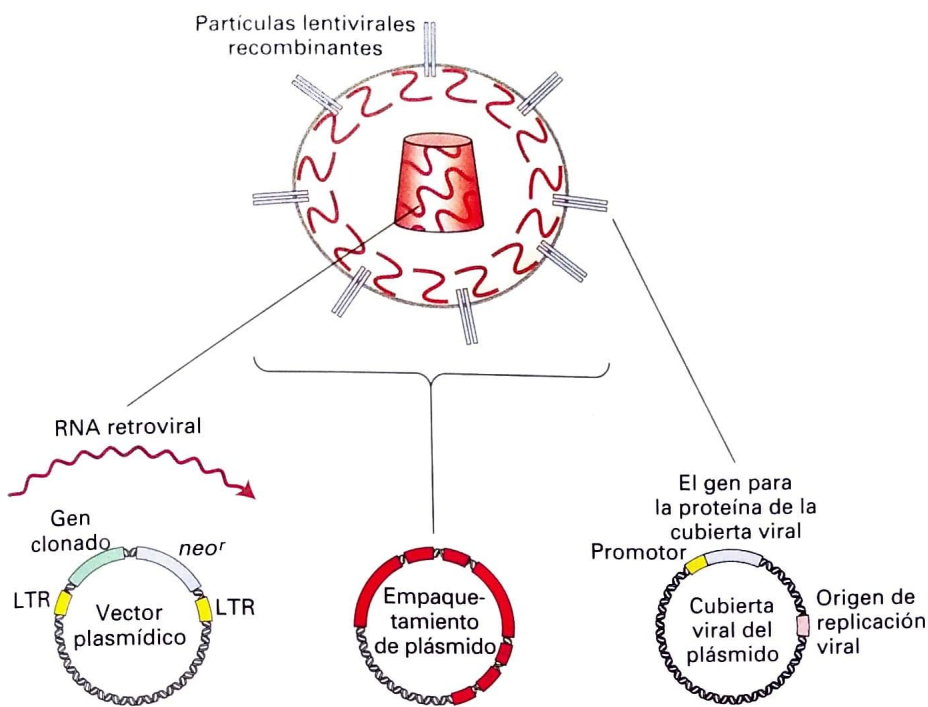
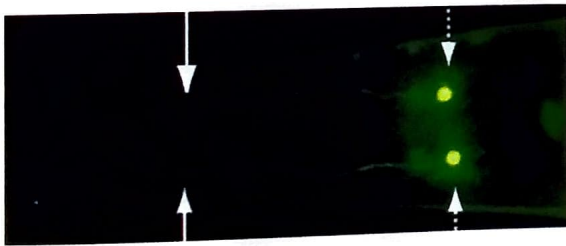


FIGURA EXPERIMENTAL 5-33 Los vectores retrovirales pueden utilizarse para la integración eficiente de genes clonados en el genoma de mamíferos. Véase el texto para más detalles.

segmento corto de aminoácidos, reconocido por un anticuerpo monoclonal conocido. Este péptido corto, que puede ser unido por un anticuerpo, se denomina epítipo; por ende, este método es conocido como *marcage de epítipo*. Después de la transfección con un vector

plasmídico de expresión que contiene un gen modificado, puede detectarse el marcaje de epítipo expresado de la proteína, mediante marcación inmunofluorescente de las células con anticuerpos monoclonales específicos contra el epítipo. La elección de un epítipo corto o una GFP para marcar una proteína determinada, a menudo, suele depender de los tipos de modificaciones que un gen clonado puede tolerar y aún permanecer funcional.

(a) Fusión de promotor; promotor ODR10 fusionado a GFP



(b) Fusión de proteína; proteína ODR10-GFP



FIGURA EXPERIMENTAL 5-34 El marcaje de proteínas y genes facilita la localización celular de proteínas expresadas a partir de genes clonados. En este experimento, el gen que codifica un receptor odorante químico, Odr10, de *C. elegans* se fusionó a la secuencia génica para la proteína verde fluorescente (GFP). (a) Se generó un promotor-fusión al unir la GFP al promotor y los primeros cuatro codones de aminoácidos de Odr10. Esta proteína se expresa en el citoplasma de neuronas sensitivas específicas, en la cabeza de *C. elegans*. Nótese que el cuerpo celular (flechas punteadas) y las dendritas sensitivas (flechas sólidas) están marcadas con fluorescencia. (b) Se construyó una proteína-fusión al unir la GFP al final de la secuencia codificante de Odr10 de longitud completa. En este caso, la proteína-fusión Odr10-GFP se dirige a la membrana, en la punta de las neuronas sensitivas, y solo aparentemente, en el extremo distal de los cilios sensitivos. De la distribución observada puede inferirse que reflejan la localización normal de la proteína Odr10 en neuronas específicas. Como el promotor-fusión mostrado en (a) carece de la secuencia de localización de Odr10, la GFP expresada llena por completo el citoplasma de la célula, en lugar de localizarse en la punta distal de los cilios sensitivos. (P. Sengupta y cols., 1996, *Cell* **84**:899 [derivado de las Figs. 4 y 5].)

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 5.3

Uso de los fragmentos de DNA clonados para estudiar la expresión génica

- La transferencia Southern puede detectar un fragmento de DNA específico, único dentro de una mezcla compleja, al combinar la transferencia (*blotting*) de las bandas separadas a un filtro y la hibridación con una sonda de DNA radiomarcada complementaria (véase la Fig. 5-26). La técnica similar de transferencia Northern detecta un RNA específico dentro de una mezcla.
- La presencia y la distribución de los mRNA específicos pueden detectarse en las células vivas mediante hibridación *in situ*.
- El análisis simultáneo de micromatrices de DNA detecta el nivel relativo de expresión de cientos de genes en diferentes tipos de células o en las mismas células bajo distintas condiciones (véase la Fig. 5-29).
- El análisis de grupo de los datos de múltiples experimentos de micromatrices de expresión puede identificar los genes que están regulados de un modo similar en diversas condiciones. Estos genes coregulados comúnmente codifican proteínas que tienen funciones biológicas relacionadas.
- Los vectores de expresión derivados de los plásmidos permiten la producción de cantidades abundantes de una proteína a partir de un gen clonado.
- Los vectores de expresión eucarionte pueden utilizarse para expresar genes clonados en células de levadura o de mamífero. Una aplicación importante de estos métodos es el marcaje de proteínas con GFP o un epitopo para su detección con anticuerpos.

5.4 Localización e identificación de genes de enfermedades humanas

 Las enfermedades humanas hereditarias son las consecuencias fenotípicas de genes humanos defectuosos. El Cuadro 5-2 enumera varias de las patologías hereditarias que se producen comúnmente. Aunque un gen de “enfermedad” puede ser el resultado de una mutación nueva que surge en la generación precedente, la mayoría de los casos de las enfermedades hereditarias son causados por alelos mutantes preexistentes que han pasado de una generación a la siguiente, durante muchas generaciones. ■

El típico primer paso para descifrar la causa de cualquier patología humana consiste en identificar el gen afectado y su proteína codificada. La comparación de las secuencias de un gen de enfermedad y su producto con aquellos genes y proteínas cuyas secuencias y funciones son conocidas puede proporcionar pistas acerca de las causas moleculares y celulares de la enfermedad. Históricamente, los investigadores han utilizado cualquier pista de fenotipo que podría ser relevante para hacer conjeturas acerca de las bases moleculares de las patologías hereditarias. Un primer ejemplo del éxito de las conjeturas fue la hipótesis según la cual la anemia falciforme, conocida por ser una enfermedad de

los glóbulos rojos, podría ser causada por una hemoglobina defectuosa. Esta idea condujo a la identificación de una sustitución de aminoácidos específicos en la hemoglobina, que causa polimerización de las moléculas de hemoglobina defectuosa, que produce la deformación falciforme de los eritrocitos en los individuos que han heredado dos copias del alelo *Hb^s* para la hemoglobina de las células falciformes.

Sin embargo, muy a menudo, los genes causantes de las enfermedades hereditarias deben ser encontrados sin conocimiento previo o hipótesis razonable acerca de la naturaleza del gen afectado o su proteína codificada. En esta sección se verá cómo los genetistas, siguiendo la segregación de la enfermedad en las familias, pueden encontrar el gen causante de una enfermedad hereditaria. La segregación de la enfermedad puede correlacionarse con la segregación de muchos otros marcadores genéticos que, eventualmente, llevan la identificación de la posición cromosómica del gen afectado. Esta información, junto con el conocimiento de la secuencia del genoma humano, puede —en última instancia— permitir que el gen afectado y las mutaciones causantes de la enfermedad se establezcan claramente.

Las enfermedades monogénicas muestran uno de los tres patrones de herencia

Las enfermedades genéticas humanas que resultan de mutaciones en un gen específico son denominadas *enfermedades monogénicas* y exhiben patrones de herencia diferentes, según la naturaleza y la localización cromosómica de los alelos que las causan. Un patrón característico es el exhibido por un alelo dominante en un autosoma (es decir, uno de los 22 cromosomas humanos que no es un cromosoma sexual). Debido a que un alelo *dominante autosómico* se expresa en el heterocigoto, en general, al menos uno de los progenitores de un individuo afectado también tendrá la enfermedad. Suele ser el caso de las patologías causadas por alelos dominantes que aparecen de un modo tardío en la vida, después de la edad reproductiva. Si este no fuese el caso, la selección natural podría haber eliminado el alelo durante la evolución humana. Un ejemplo de enfermedad autosómica dominante es la enfermedad de Huntington, una patología neuronal degenerativa que suele manifestarse en la mediana edad o en la edad avanzada. Si cualquiera de los progenitores porta un alelo mutante *HD*, cada uno de sus hijos (independientemente del sexo) tiene el 50% de probabilidad de heredar el alelo mutante y estar afectado (Fig. 5-35a).

Un alelo recesivo en un autosoma exhibe un patrón de segregación diferente. Para un alelo *autosómico recesivo*, ambos progenitores deben ser *portadores* heterocigotos del alelo para que sus hijos corran el riesgo de estar afectados por la enfermedad. Cada niño de padres heterocigotos tiene el 25% de probabilidad de recibir ambos alelos recesivos y, por lo tanto, estar afectado; el 50% de probabilidad de recibir un alelo normal y uno mutante y, por ende, ser un portador; y el 25% de probabilidad de recibir dos alelos normales. Un ejemplo claro de una enfermedad recesiva autosómica es la fibrosis quística, que resulta de un gen defectuoso del canal de cloruro conocido como *CFTR* (Fig. 5-35b). Los individuos relacionados (p. ej., primos hermanos o primos segundos) tienen una probabilidad relativamente elevada de ser portadores de ambos alelos recesivos. Así, los niños nacidos de padres emparentados presentan una mayor probabilidad de ser homocigotos para un trastorno recesivo autosómico que aquellos nacidos de padres no emparentados, y por lo tanto, estar afectados.

El tercer patrón común de herencia es la de un alelo *recesivo ligado al X*. Un alelo recesivo en el cromosoma X se expresará más frecuentemente en los varones, que solo reciben un cromosoma X proveniente de

Cuadro 5-2

Enfermedades humanas hereditarias comunes

Enfermedad	Defecto molecular y celular	Incidencia
Autosómica recesiva		
Anemia falciforme	La hemoglobina anómala causa deformación de los eritrocitos, que pueden quedar atrapados en los capilares; también confiere resistencia al paludismo.	1/625 en oriundos de África Subsahariana
Fibrosis quística	Un canal de cloruro defectuoso (CFTR) en las células epiteliales conduce a un exceso de moco de los pulmones.	1/2 500 de origen europeo
Fenilketonuria (PKU)	La enzima defectuosa en el metabolismo de la fenilalanina (tirosina hidroxilasa) produce un exceso de fenilalanina que provoca un retraso mental, a menos que se siga una dieta restrictiva.	1/10 000 de origen europeo
Enfermedad de Tay-Sachs	La enzima hexosaminidasa defectuosa conduce a la acumulación de un exceso de esfingolípidos en los lisosomas de las neuronas, lo que dificulta el desarrollo neuronal.	1/1 000 judíos de Europa del Este
Autósomica dominante		
Enfermedad de Huntington	La proteína neuronal defectuosa (huntigntina) puede ensamblarse y formar agregados, lo que produce daño en el tejido neuronal.	1/10 000 de origen europeo
Hipercolesterolemia	El receptor LDL defectuoso produce colesterol en exceso en la sangre, lo que produce infartos tempranos.	1/122 francocanadienses
Recesivos ligados al X		
Distrofia muscular de Duchenne (DMD)	La proteína del citoesqueleto defectuosa, la distrofina, conduce a una función muscular deficiente.	1/3 500 varones
Hemofilia A	El factor VIII de la coagulación defectuoso conduce a hemorragias descontroladas.	1-2/10 000 varones

sus madres; pero no en las mujeres, que reciben un cromosoma X tanto de su madre como de su padre. Esto conduce al patrón de segregación distintivo ligado al sexo, en el que la enfermedad se presenta con mayor frecuencia en los varones que las mujeres. Por ejemplo, la distrofia muscular de Duchenne, una patología muscular degenerativa que afecta específicamente a los varones, es causada por un alelo recesivo en el cromosoma X. La distrofia muscular de Duchenne exhibe el típico patrón de segregación ligado al sexo en el cual las madres que son heterocigotas y, por lo tanto, fenotípicamente normales pueden actuar como portadoras y transmitir el alelo de la distrofia muscular de Duchenne y, por ende, la enfermedad al 50% de su progenie masculina (Fig. 5-35c).

Los polimorfismos de DNA se utilizan como marcadores para el mapeo por ligamiento de mutaciones humanas

Una vez que se ha determinado el modo de herencia, el siguiente paso en la determinación de la posición de un alelo de enfermedad con-

siste en mapear genéticamente su posición con respecto a los marcadores genéticos conocidos mediante el principio básico de ligamiento genético, como se describe en la Sección 5.1. La presencia de muchos rasgos genéticos o marcadores ya mapeados, distribuidos en toda la longitud de un cromosoma, facilita el mapeo de una mutación nueva: puede evaluarse su posible ligamiento a estos genes marcadores en cruzamientos adecuados. Cuantos más marcadores estén disponibles, con más precisión podrá mapearse una mutación. La densidad de los marcadores genéticos necesarios para un mapa genético humano de alta resolución es de alrededor de un marcador cada 5 centimorgans (cM) (como se analizó previamente, una unidad de mapa genético o centimorgan se define como la distancia entre dos posiciones a lo largo de un cromosoma que resulta en un individuo recombinante de cada 100 de la progenie). Por lo tanto, un mapa genético de alta resolución requiere 25 o más marcadores genéticos de posición conocida diseminados a lo largo de cada cromosoma humano.

En los organismos experimentales comúnmente usados en los estudios genéticos, están disponibles numerosos fenotipos fácilmente

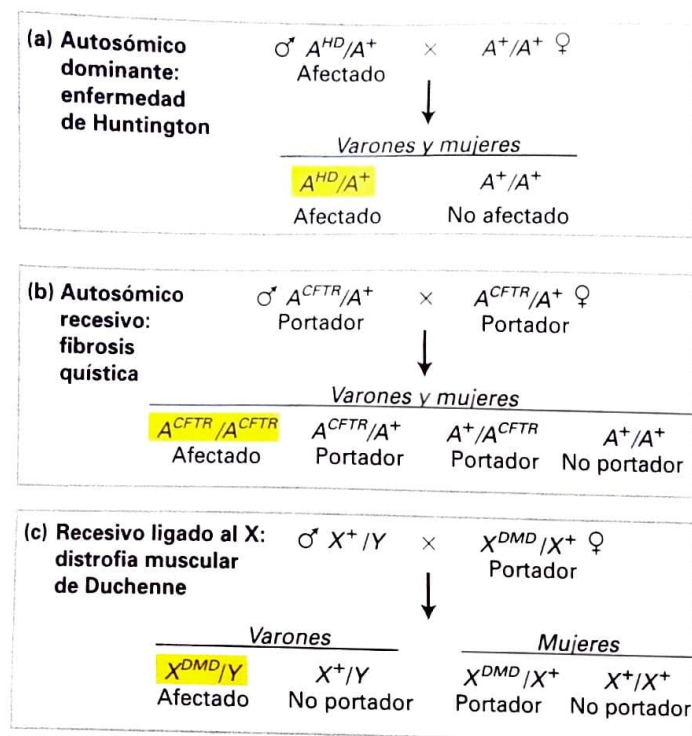


FIGURA 5-35 Tres patrones de herencia común para las enfermedades genéticas humanas. Los cromosomas autosómicos (A) y sexuales (X e Y) de tipo silvestre se indican mediante signo más superíndice. (a) En un trastorno autosómico dominante, como la enfermedad de Huntington, solo se necesita un alelo mutante para conferir la enfermedad. Si cualquier progenitor es heterocigoto para el alelo mutante HD , sus hijos tendrán el 50% de posibilidades de heredar el alelo mutante y presentar la enfermedad. (b) En un trastorno autosómico recesivo, como la fibrosis quística, dos alelos mutantes deben estar presentes para conferir la enfermedad. Ambos progenitores deben ser portadores heterocigotos del gen mutante $CFTR$ para que sus hijos tengan el riesgo de estar afectados o ser portadores. (c) Una enfermedad recesiva ligada al X, como la distrofia muscular de Duchenne, es causada por una mutación recesiva en el cromosoma X y exhibe el típico patrón de segregación ligado al sexo. Los varones nacidos de madres heterocigotas para un alelo mutante DMD tienen el 50% de posibilidades de heredar el alelo mutante y ser afectados. Las mujeres nacidas de madres heterocigotas tienen el 50% de posibilidades de ser portadoras.

detectables para el mapeo genético de mutaciones. Este no es el caso para el mapeo de genes cuyos alelos están asociados con enfermedades hereditarias en los seres humanos. Sin embargo, la tecnología de DNA recombinante ha puesto a disposición una gran cantidad de marcadores moleculares útiles basados en el DNA. Debido a que la mayoría del genoma humano no codifica proteínas, existe una gran cantidad de variaciones de secuencia entre los individuos. En efecto, se estima que las diferencias de nucleótidos entre individuos no relacionados pueden detectarse, en promedio, cada 10^3 nucleótidos. Si estas variaciones en la secuencia del DNA, que se denominan *polimorfismos de DNA*, pueden seguirse de una generación a la siguiente, pueden servir como marcadores para estudios de ligamiento. En la actualidad, se utiliza un panel de tantas como 10^4 diferentes polimorfismos conocidos, cuyas localizaciones han sido mapeadas en el genoma humano para estudios de ligamiento genético en los seres humanos.

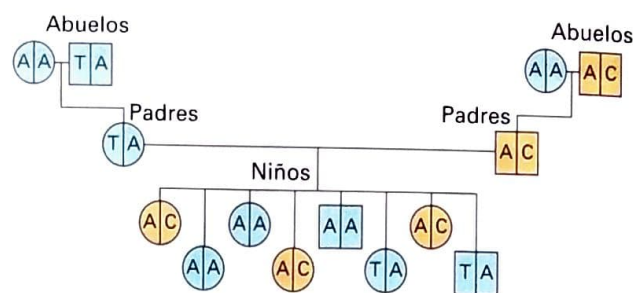


FIGURA EXPERIMENTAL 5-36 Los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) pueden ser utilizados como marcadores genéticos. Un hipotético pedigree con base en el análisis de SNP del DNA de una región de un cromosoma. En esta familia, los SNP existen como nucleótidos A, T o C. Cada individuo tiene dos alelos: algunos contienen A en ambos cromosomas, y otros son heterocigotas en este sitio. Los círculos indican mujeres; los cuadrados indican varones. Azul indica individuos no afectados; anaranjado indica individuos con el rasgo característico. El análisis revela que el rasgo se segrega con una C en los SNP.

Los *polimorfismos de un solo nucleótido* (SNP) constituyen el tipo más abundante y útil para la construcción de mapas genéticos de máxima resolución (Fig. 5-36). Otro tipo útil de polimorfismo de DNA consiste en un número variable de repeticiones de secuencias de una, dos, o tres bases. Estos polimorfismos, conocidos como repeticiones de secuencia simple (SSR) o *microsatélites*, presumiblemente estén formados por recombinaciones o por un mecanismo de deslizamiento, tanto de la hebra molde como de la recién sintetizada durante la replicación del DNA. Una propiedad útil de las SSR es que diferentes individuos, a menudo, tendrán diferentes números de repeticiones. La existencia de múltiples versiones de una SSR hace más probable la producción de un patrón de segregación informativo en una estirpe determinada y, por ende, será de uso más general en el mapeo de las posiciones de los genes de enfermedades. Estos polimorfismos pueden detectarse mediante ampliificaciones de PCR y secuenciación de DNA.

Los estudios de ligamiento pueden mapear genes de enfermedades con una resolución de alrededor de 1 centimorgan

Si entrar en todas las consideraciones técnicas, veamos cómo se podría mapear el alelo que confiere un rasgo dominante particular (p.ej., hipercolesterolemia familiar). El primer paso consiste en obtener muestras de DNA de todos los miembros de una familia que contiene muestras que exhiben la enfermedad. Luego, se analiza el DNA de cada individuo afectado y no afectado para determinar la identidad de un gran número de polimorfismos de DNA conocidos (pueden utilizarse marcadores SSR o SNP). A continuación, se comparan los patrones de segregación de cada polimorfismo de DNA, dentro de la familia con la segregación de la enfermedad en estudio, para encontrar aquellos polimorfismos que tienden a segregarse junto con la enfermedad. Finalmente, el análisis computacional de la información de la segregación se emplea para calcular la probabilidad de ligamiento entre cada polimorfismo de DNA y el alelo causante de enfermedad.

En la práctica, se recolectan y se agrupan los datos de segregación de diferentes familias que presentan la misma enfermedad. Cuantas

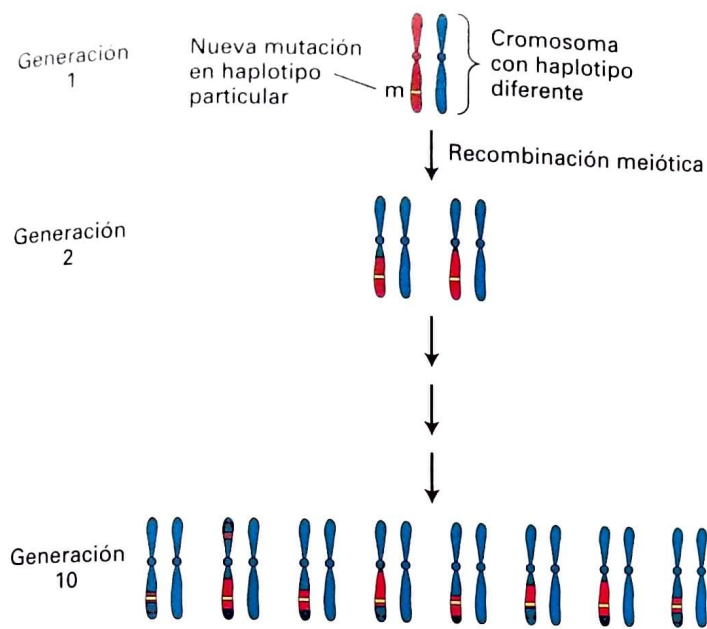


FIGURA 5-37 Los estudios de desequilibrio de ligamiento de las poblaciones humanas pueden utilizarse para mapear genes a alta resolución.

Una nueva mutación de enfermedad surgirá en el contexto de un cromosoma ancestral entre un grupo de polimorfismos conocidos como *haplotipo* (indicado por el sombreado rojo). Después de muchas generaciones, los cromosomas que llevan la mutación de enfermedad también llevarán segmentos de haplotipo ancestral que no hayan sido separados de la mutación de enfermedad mediante recombinación. Los segmentos azules de estos cromosomas representan haplotipos ancestrales en los cuales surge la mutación originalmente. Este fenómeno se conoce como *desequilibrio de ligamiento*. La posición de la mutación de enfermedad puede ser localizada mediante escaneado de cromosomas que contengan la mutación de la enfermedad para polimorfismos altamente conservados correspondientes al haplotipo ancestral.

más familias exhiban una enfermedad particular que puede ser examinada, mayor es la significación estadística de evidencia para el ligamiento que puede obtenerse y mayor es la precisión con la cual puede medirse la distancia entre el polimorfismo de DNA ligado y un alelo de una enfermedad. La mayoría de los estudios familiares tienen un máximo de alrededor de 100 individuos en los cuales puede evaluarse el ligamiento entre un gen de una enfermedad y un panel de polimorfismos de DNA. Este número de individuos establece el límite superior práctico en la resolución de un estudio de mapeo en aproximadamente 1 centimorgan, o una distancia física de $7,5 \times 10^5$ pares de bases.

Un fenómeno denominado *desequilibrio de ligamiento* constituye la base para una estrategia alternativa, que a menudo puede permitir un mayor grado de resolución en los estudios de mapeo. Este enfoque depende de la circunstancia particular en la cual una enfermedad genética comúnmente encontrada en una población particular resulta de una mutación única que se produjo hace muchas generaciones anteriores. Los polimorfismos de DNA que lleva este cromosoma ancestral se conocen colectivamente como el *haplotipo* del cromosoma. A medida que el alelo es pasado de una generación a la siguiente, solo los polimorfismos que están más cercanos al gen de una enfermedad no se separarán de este por recombinación. Después de muchas generaciones, la región que contiene el gen de la enfermedad se detectará debido a

que éste será la única región del cromosoma que portará el haplotipo del cromosoma ancestral conservado a través de muchas generaciones (Fig. 5-37). Mediante ensayos de la distribución de marcadores específicos en todos los individuos afectados de una población, los genetistas pueden identificar marcadores de DNA fuertemente asociados con la enfermedad y localizar, de este modo, el gen asociado a una enfermedad en una región relativamente pequeña. En circunstancias ideales, los análisis de desequilibrio de ligamiento pueden mejorar la resolución de los estudios de mapeo a menos de 0,1 centimorgan. El poder de resolución de este método proviene de la capacidad para determinar si un polimorfismo y el alelo de enfermedad alguna vez fueron separados por un acontecimiento de recombinación meiótica en algún momento desde que el alelo de la enfermedad apareció por primera vez en el cromosoma ancestral; en algunos casos, esto puede equivaler a encontrar marcadores que están estrechamente asociados al gen de la enfermedad que —incluso después de cientos de meiosis— nunca pueden ser separados por recombinación.

Se requiere un análisis posterior para localizar un gen de enfermedad en el DNA clonado

Aunque el mapeo de ligamiento casi siempre puede localizar un gen de enfermedad humana en una región que contiene alrededor de 10^5 pares de bases, pueden localizarse hasta 10 genes diferentes en una región de este tamaño. El objetivo final de un estudio de mapeo es localizar el gen dentro de un segmento clonado de DNA y, luego, determinar la secuencia de nucleótidos de este fragmento. En la Figura 5-38, se muestran las escalas relativas a un mapa genético cromosómico y a los mapas físicos correspondientes a los conjuntos ordenados de clones de plásmidos y las secuencias nucleotídicas.

Una estrategia para localizar posteriormente un gen de enfermedad dentro del genoma es identificar el mRNA codificado por DNA en la región del gen en estudio. La comparación de la expresión génica entre tejidos de individuos sanos y afectados puede sugerir los tejidos en los cuales normalmente se expresa un gen de una enfermedad particular. Por ejemplo, una mutación que afecta fenotípicamente los músculos, pero no otros tejidos, podría ser un gen que se expresa solo en el tejido muscular. La expresión de mRNA tanto en los individuos sanos como afectados, en general, se determina mediante transferencia Northern, hibridación in situ o experimentos de micromatrices que permiten la comparación del nivel de expresión y el tamaño de los mRNA en los tejidos mutantes y de tipo silvestre. Aunque la sensibilidad de la hibridación in situ es menor que la del análisis de transferencia Northern, puede ser muy útil para la identificación de un mRNA que se expresa a niveles bajos en un tejido determinado, pero a niveles muy altos en una subclase de células dentro de ese tejido. Un mRNA que está alterado o ausente en varios individuos afectados por una enfermedad, en comparación con los individuos de tipo silvestre, podría ser un excelente candidato a codificar la proteína cuya función interrumpida causa la patología.

En muchos casos, las mutaciones puntuales que dan origen a los alelos causantes de enfermedad pueden ser el resultado de cambios no detectables en el nivel de expresión o en la movilidad electroforética de los mRNA. Por lo tanto, si las comparaciones entre los mRNA expresados en los individuos sanos y afectados no revelan diferencias detectables en los mRNA candidatos, se emprende una búsqueda de mutaciones puntuales en las regiones de DNA que codifican los

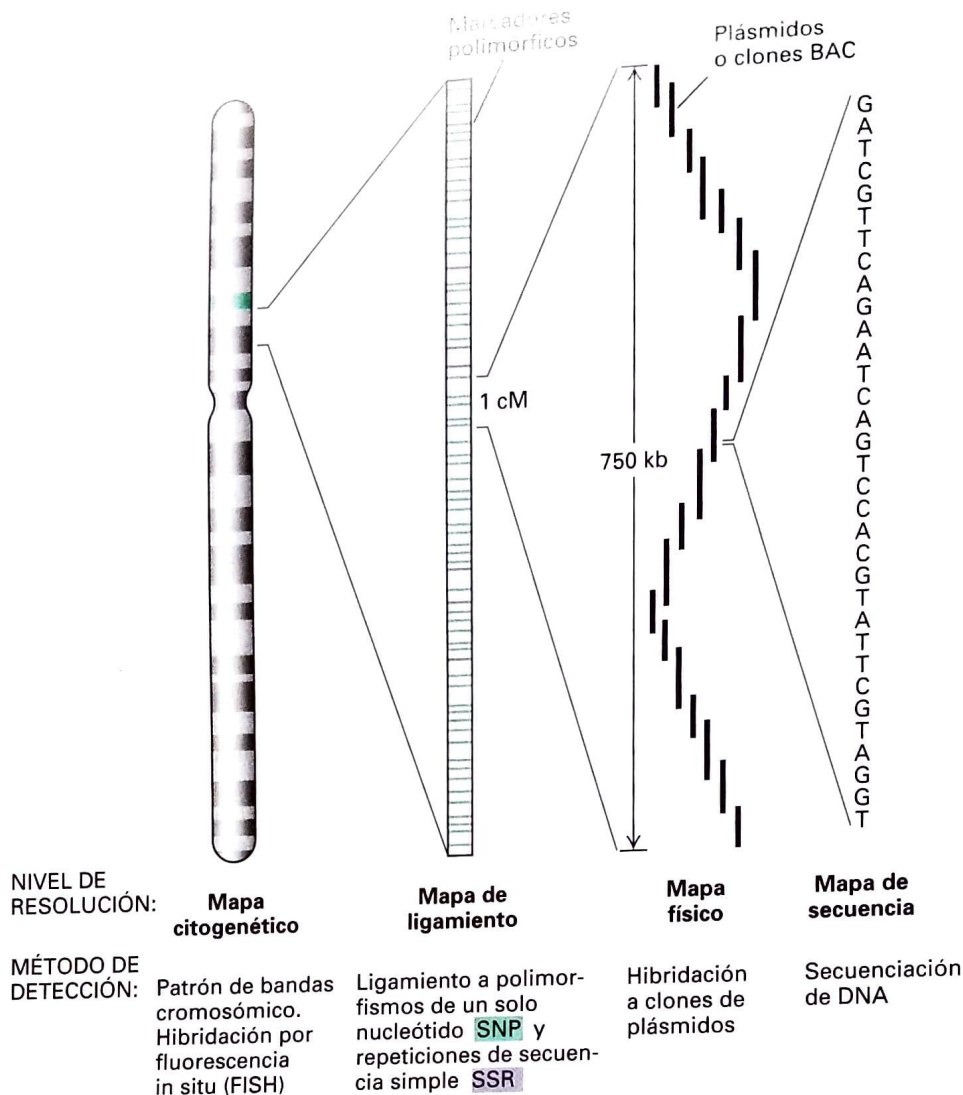


FIGURA 5-38 La relación entre los mapas genético y físico de un cromosoma humano. El diagrama describe un cromosoma humano analizado en diferentes niveles de detalle. El cromosoma como un todo puede visualizarse en el microscopio óptico cuando está en un estado condensado, que se produce en la metafase, y puede determinarse la localización aproximada de secuencias específicas mediante hibridación in situ con fluorescencia (FISH). En el siguiente nivel de detalle, pueden mapearse los rasgos genéticos en

relación con marcadores genéticos basados en DNA. Los segmentos locales del cromosoma pueden analizarse a nivel de la secuencia de DNA identificada por hibridación Southern o PCR. La mayoría de las diferencias genéticas importantes pueden definirse con precisión mediante diferencias en la secuencia nucleotídica del DNA cromosómico. (Adaptado de L. Hartwell y cols., 2003, *Genetics: From Genes to Genomes*, 2ª ed., McGraw-Hill.)

mRNA. En la actualidad, con los métodos altamente eficientes para la secuenciación del DNA disponibles, los investigadores frecuentemente determinan la secuencia de regiones candidatas de DNA aislado a partir de individuos afectados, para identificar mutaciones puntuales. La estrategia global consiste en buscar una secuencia codificante que evidencie, de manera consistente, posibles alteraciones deletéreas en el DNA de los individuos que exhiben la enfermedad. Una limitación de este enfoque radica en que la región cercana al gen afectado puede llevar naturalmente polimorfismos no relacionados al gen de interés. Tales polimorfismos, no relacionados funcionalmente con la enfermedad, pueden conducir a la identificación errónea del fragmento de DNA que lleva el gen de interés. Por esta razón, cuantos más alelos mutantes estén disponibles para el análisis, más probable será la identificación correcta de un gen.

Muchas enfermedades hereditarias son el resultado de múltiples defectos genéticos

La mayoría de las enfermedades hereditarias humanas, que actualmente se comprenden a nivel molecular, son enfermedades monogénicas; es decir, se produce un estado de enfermedad claramente discernible por un defecto en un único gen. Las enfermedades monogénicas causadas por una mutación en un gen específico exhiben uno de los patrones de herencia característicos que se muestran en la Figura 5-35. Los genes asociados con la mayoría de las enfermedades monogénicas ya han sido mapeados con el uso marcadores basados en el DNA, como se describió anteriormente.

Sin embargo, muchas otras patologías hereditarias muestran patrones de herencia más complicados y tornan dificultosa la identificación

de la causa genética subyacente. Un tipo de complejidad añadida, que se encuentra con frecuencia, es la heterogeneidad genética. En esos casos, las mutaciones en cualquiera de los múltiples genes diferentes pueden causar la misma enfermedad. Por ejemplo, la retinitis pigmentosa, caracterizada por la degeneración de la retina y que suele conducir a la ceguera, puede ser causada por mutaciones en cualquiera de más de 60 genes diferentes. En los estudios de ligamiento humano, por lo general, la información de múltiples familias debe combinarse para determinar si existe un ligamiento significativo, desde el punto de vista estadístico, entre un gen de la enfermedad y los marcadores moleculares conocidos. La heterogeneidad genética como la exhibida por la retinitis pigmentosa puede desconcertar esta metodología debido a que cualquier tendencia estadística en la información del mapeo de una familia tiende a ser anulada por la otra familia, con un gen causal no relacionado.

Los especialistas en genética humana utilizan dos enfoques diferentes para identificar los numerosos genes asociados con la retinitis pigmentosa. El primer enfoque se basa en los estudios de mapeo en familias excepcionalmente grandes que contienen el suficiente número de individuos afectados como para proveer evidencia estadísticamente significativa para el ligamiento entre los polimorfismos de DNA y el único gen causal. Los genes identificados mediante estos estudios muestran que diversas mutaciones que causan retinitis pigmentosa se encuentran dentro de genes que codifican proteínas abundantes de la retina. Siguiendo esta pista, los genetistas concentraron su atención en aquellos genes que más se expresan en la retina cuando se analizan otros individuos con retinitis pigmentosa. Este método según el cual se emplea información adicional para centrar los esfuerzos de búsqueda en un subgrupo de genes candidatos conduce a la identificación de mutaciones causales adicionales raras en muchos genes diferentes que codifican proteínas de la retina.

Una complicación adicional en la disección genética de las enfermedades humanas es mostrada por la diabetes, las enfermedades coronarias, la obesidad, la predisposición al cáncer y una variedad de trastornos mentales que tienen, al menos, alguna propiedad heredable. Estas y muchas otras pueden ser consideradas *enfermedades poligénicas*, ya que los alelos de múltiples genes que actúan juntos en un individuo contribuyen tanto a la aparición como a la gravedad de la enfermedad. Uno de los problemas más significativos y desafiantes de la genética humana actual es cómo mapear de forma sistemática rasgos poligénicos complejos en los seres humanos.

Uno de los métodos más prometedores para estudiar enfermedades que exhiben heterogeneidad genética o son poligénicas consiste en buscar una correlación estadística entre la herencia de una región particular de un cromosoma y la propensión a padecer una enfermedad, con el uso un procedimiento conocido como estudio de asociación del genoma completo. La identificación de genes causantes de enfermedad, mediante este estudio, se basa en el fenómeno de desequilibrio de ligamiento descrito anteriormente. Si un alelo que causa o incluso predispone a un individuo a una enfermedad se produjo en un momento relativamente reciente durante la evolución humana, el alelo causante de la enfermedad tenderá a permanecer asociado con un conjunto particular de marcadores basados en el DNA, en la vecindad de su localización cromosómica. Al examinar una gran cantidad de marcadores de DNA en poblaciones de individuos que presentan una enfermedad particular, como así también en poblaciones control de individuos que no padecen la enfermedad, las regiones cromosómicas que tienden a correlacionarse con la aparición de la enfermedad pueden identificarse por medio del estudio de asociación del genoma completo. La secuenciación genómica y otros métodos pueden, posteriormente, ser usados

para identificar posibles mutaciones causantes de enfermedad en estas regiones. A pesar de que el estudio de asociación del genoma completo puede ser una herramienta útil para identificar genes candidatos de enfermedades, se requiere mucho trabajo adicional para determinar de qué manera un individuo que lleva una mutación particular podría estar predispuesto a la enfermedad.

Los modelos de enfermedades humanas en organismos experimentales pueden también contribuir a desentrañar la genética de los rasgos complejos, como obesidad y diabetes. Por ejemplo, los experimentos de cruzamientos controlados a gran escala en ratones pueden identificar los genes murinos asociados con enfermedades análogas en los seres humanos. Los ortólogos humanos de los genes murinos, identificados en estos estudios, podrían ser candidatos a su implicación en la correspondiente enfermedad humana. El DNA de poblaciones humanas podría, entonces, ser analizado para determinar si alelos particulares de los genes candidatos muestran una tendencia a estar presentes en los individuos afectados por la enfermedad, pero ausentes en quienes no están afectados. Este enfoque de "gen candidato" está siendo utilizado en la actualidad para buscar genes que puedan contribuir a las principales enfermedades poligénicas en los seres humanos.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 5.4

Localización e identificación de genes de enfermedades humanas

- Las enfermedades hereditarias y otros rasgos en los seres humanos muestran tres patrones principales de herencia: autosómico dominante, autosómico recesivo y recesivo ligado al X (véase la Fig. 5-35).
- Los genes de las enfermedades humanas y otros rasgos pueden ser mapeados, para determinar su cosegregación durante la meiosis, con marcadores cuya localización en el genoma es conocida. Cuanto más cerca está un gen de un marcador particular, más probable es que se cosegreden.
- El mapeo de los genes humanos con gran precisión requiere miles de marcadores moleculares distribuidos a lo largo de los cromosomas. Los marcadores más útiles son diferencias en la secuencia de DNA (polimorfismos) entre los individuos, en las regiones no codificantes del genoma.
- Los polimorfismos de DNA útiles en el mapeo de genes humanos incluyen polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) y repeticiones de secuencia simple (SSR).
- El mapeo de ligamiento, por lo general, puede localizar un gen de una enfermedad humana en una región cromosómica que incluye tanto como 10 genes. Para identificar el gen de interés dentro de esta región candidata, típicamente se requiere el análisis de expresión y la comparación de secuencias de DNA entre los individuos normales y los afectados por enfermedad.
- Algunas enfermedades hereditarias pueden ser el resultado de mutaciones en diferentes genes en distintos individuos (heterogeneidad genética). La presentación y la gravedad de otras enfermedades dependen de la presencia de alelos mutantes de múltiples genes en los mismos individuos (rasgos poligénicos). El mapeo de los genes asociados con estas enfermedades puede lograrse mediante hallazgo de una correlación estadística entre la enfermedad y una localización cromosómica particular en un estudio de asociación del genoma completo.

5.5 Inactivación de la función de genes específicos en los eucariontes

La dilucidación de las secuencias de DNA y proteínas, en los últimos años, ha conducido a la identificación de numerosos genes, con el uso de patrones de secuencia en el DNA genómico y la similitud de secuencia de las proteínas codificadas con proteínas de función conocida. Como se analiza en el Capítulo 6, las funciones generales de las proteínas, identificadas por búsquedas de secuencia, pueden predecirse por analogía con proteínas conocidas. Sin embargo, las funciones precisas *in vivo* de esas proteínas “nuevas” pueden ser inciertas en ausencia de formas mutantes de los genes correspondientes. En esta sección, se describen diversas formas de interrumpir la función normal de un gen específico en el genoma de un organismo. El análisis del fenotipo mutante resultante suele contribuir a revelar la función *in vivo* del gen normal y su proteína codificada.

Tres enfoques básicos subyacen a estas técnicas de inactivación de genes: (1) reemplazo de un gen normal con otras secuencias, (2) introducción de un alelo cuya proteína codificada inhibe el funcionamiento de la proteína normal expresada y (3) promoción de la destrucción del mRNA expresado a partir de un gen. El gen endógeno normal es modificado mediante técnicas basadas en el primer enfoque, pero no es modificado en los otros dos.

Los genes normales de levadura pueden reemplazarse con alelos mutantes por recombinación homóloga

Modificar el genoma de la levadura *S. cerevisiae* es particularmente fácil por dos razones: las células de levadura incorporan rápidamente el DNA exógeno en ciertas condiciones, y el DNA introducido es intercambiado eficientemente por el sitio cromosómico homólogo en la célula receptora. Esta recombinación específica y focalizada de segmentos idénticos de DNA permite que cualquier gen en los cromosomas de levadura sea reemplazado con un alelo mutante. (Como se analizó en la Sección 5.1, la recombinación entre cromosomas homólogos también se produce durante la meiosis.)

En un método muy difundido para la interrupción de genes de levadura de esta manera, se usa PCR para generar una *construcción interrumpida* que contiene un marcador seleccionable que subsecuentemente es transfectedo a las células de levadura. Como se muestra en la Figura 5-39a, los cebadores para la amplificación por PCR del marcador seleccionable se diseñan para incluir alrededor de 20 nucleótidos idénticos, con secuencias que flanquean al gen de levadura a ser reemplazado. La construcción amplificada resultante abarca el marcador seleccionable (p. ej., el gen *kanMX* que, al igual que *neo^r*, confiere resistencia a G-418) flanqueada por cerca de 20 pares de bases que se aparean en los extremos del gen diana de levadura. Las células de levadura diploides transformadas, en las cuales una de las dos copias del gen endógeno diana ha sido reemplazada por la construcción interrumpida, son identificadas por sus resistencias a G-418 u otro fenotipo seleccionable. Estas células diploides heterocigotas de levadura, en general, crecen con normalidad independientemente de la función del gen diana, pero la mitad de las esporas haploides derivadas de estas células llevarán solo los alelos interrumpidos (Fig. 5-39b). Si un gen es esencial para la viabilidad, las esporas que llevan un alelo interrumpido no sobrevivirán.

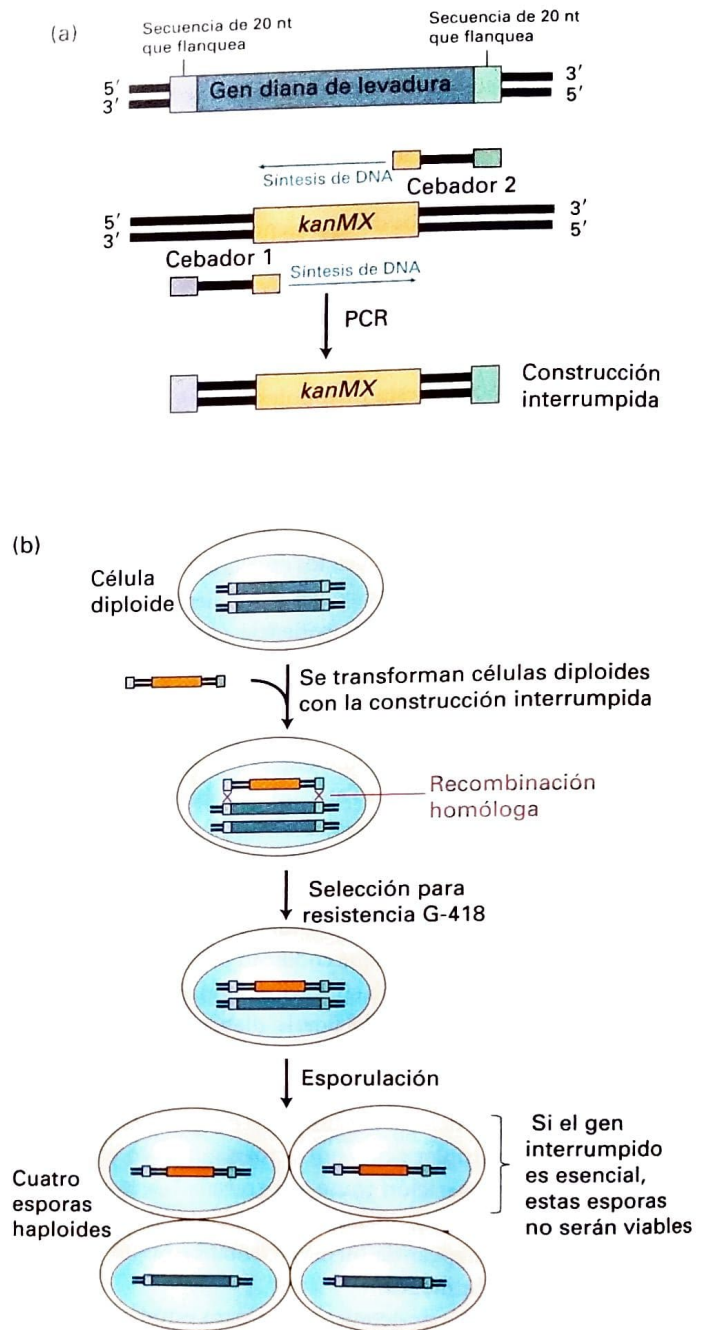


FIGURA EXPERIMENTAL 5-39 La recombinación homóloga con construcciones interrumpidas transfectedas puede inactivar genes diana específicos en la levadura. (a) Una construcción adecuada para interrumpir un gen diana puede prepararse por PCR. Cada uno de los dos cebadores diseñados para este propósito contiene una secuencia de alrededor de 20 nucleótidos (nt), que es homóloga a un extremo del gen de levadura diana, como así también de las secuencias necesarias para amplificar un segmento de DNA que lleva un gen marcador seleccionable como *kanMX*, que confiere resistencia a G-418. (b) Cuando las células de *Saccharomyces* diploides receptoras son transformadas mediante la construcción con el gen interrumpido, la recombinación homóloga entre los extremos de la construcción y las secuencias cromosómicas correspondientes integrarán el gen *kanMX* en el cromosoma, lo que reemplaza la secuencia génica diana. Las células diploides recombinantes crecerán en un medio que contiene G-418, mientras que las células no transformadas no lo harán. Si el gen diana es esencial para la viabilidad, la mitad de las esporas haploides que se forman después de la esporulación de las células diploides recombinantes no serán viables.

La interrupción de los genes de levadura mediante este método es particularmente útil para la asignación de funciones de proteínas identificadas por el análisis de la secuencia de DNA genómica completa (véase el Capítulo 6). Un gran grupo de investigación científica reemplazó cada uno de los aproximadamente 6 000 genes identificados por medio de este análisis con la construcción interrumpida de *kanMX* y determinaron qué interrupciones de genes conducen a las esporas haploides. Estos análisis demostraron que aproximadamente 4 500 de los 6 000 genes de levadura no son necesarios para la viabilidad, una cantidad inesperadamente grande de genes aparentemente no esenciales. En algunos casos, la interrupción de un gen particular puede dar lugar a defectos sutiles que no comprometen la viabilidad de las células de levadura que crecen en condiciones de laboratorio. Alternativamente, las células que llevan un gen interrumpido pueden ser viables debido al funcionamiento de respaldo o a las vías compensatorias. Para investigar esta posibilidad, los genetistas especialistas en levaduras actualmente investigan mutaciones letales sintéticas que podrían revelar genes no esenciales con funciones redundantes (véase la Fig. 5-9c).

La transcripción de genes ligados a un promotor regulado puede controlarse experimentalmente

Aunque la interrupción de un gen esencial requerido para el crecimiento celular producirá esporas no viables, este método proporciona poca información acerca de lo que la proteína codifica, en realidad, en las células. Para aprender más acerca de cómo un gen específico contribuye al crecimiento y la viabilidad celular, los investigadores deben ser capaces de inactivar selectivamente el gen en una población de células en crecimiento. Un método para realizar esto consiste en utilizar un promotor regulado para apagar, de modo selectivo, la transcripción de un gen esencial.

Un promotor útil para este propósito es el promotor *GAL1* de levadura, que está activo en las células que crecen en galactosa, pero completamente inactivo en las células que crecen en glucosa. En este enfoque, la secuencia que codifica un gen esencial (X) ligado al promotor *GAL1* se inserta en un vector lanzadera (véase la Fig. 5-17a). A continuación, se introduce el vector recombinante en células haploides de levadura en las cuales el gen X en el vector se expresa en presencia de galactosa. Cuando las células se transfieren a un medio que contiene glucosa, el gen X ya no se transcribe más; a medida que las células se dividen, la cantidad de proteína X codificada disminuirá hasta alcanzar, eventualmente, un estado de agotamiento que imita una mutación con pérdida de función completa. Los cambios observados en el fenotipo de estas células, después de cambiar el medio por glucosa, pueden sugerir qué procesos celulares dependen de la proteína codificada por el gen X esencial.

En una aplicación temprana de éste método, los investigadores exploraron la función de los genes *Hsc70* citosólicos en levadura. Las células haploides con una interrupción en los cuatro genes redundantes fueron no viables, a menos que estas células llevaran un vector que contiene una copia del gen *Hsc70*, que podría ser expresada a partir de promotor *GAL1* en un medio con galactosa. En la transferencia de glucosa, las células que llevan el vector eventualmente dejan de crecer debido a la actividad insuficiente de *Hsc70*. El cuidadoso análisis de estas células que mueren reveló que sus proteínas secretoras no podían entrar ya en el retículo endoplasmático (RE). Este estudio aportó la

primera evidencia para la inesperada función de la proteína *Hsc70* en el traslado de las proteínas secretoras al interior del RE, un proceso que se describe en detalle en el Capítulo 13.

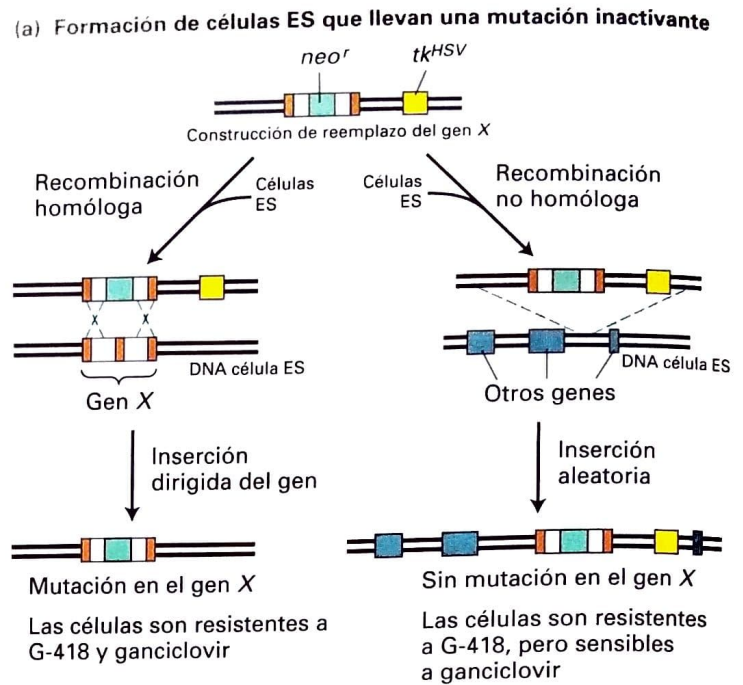
Genes específicos pueden ser inactivados de forma permanente en la línea germinal de ratones

Muchos de los métodos para la interrupción de genes en levadura pueden aplicarse a los genes de los eucariontes superiores. Estos genes alterados pueden introducirse en la línea germinal a través de recombinación homóloga para producir animales con un **gen inactivado (knockout)**. Los ratones con inactivación de genes, en los cuales se interrumpe un gen específico, constituyen un sistema experimental poderoso para el estudio del desarrollo, del comportamiento y la fisiología de mamíferos. También son útiles para el estudio de las bases moleculares de ciertas enfermedades genéticas humanas.

Los ratones con inactivación dirigida de genes se generan a través de un procedimiento de dos etapas. En la primera etapa, una construcción de DNA que contiene un alelo interrumpido de un gen diana particular es introducido en células madre embrionarias (ES). Estas células, que derivan de los blastocitos, pueden crecer en cultivos a través de muchas generaciones (véase la Fig. 21-7). En una pequeña fracción de células transfectadas, el DNA introducido sufre recombinación homóloga con el gen diana, aunque la recombinación en sitios cromosómicos no homólogos se produce con mayor frecuencia. Para seleccionar las células en las cuales se produce la inserción dirigida por gen homólogo, la construcción de DNA recombinante introducido en las células madre embrionarias necesita incluir dos genes marcadores seleccionables (Fig. 5-40). Uno de estos genes (*neo^r*), que confiere resistencia a G-418, se inserta dentro del gen (X) diana, el que es interrumpido. El otro gen seleccionable, el gen de la timidina cinasa a partir del virus del herpes simple (*tk^{HSV}*), se inserta en la construcción fuera de la secuencia del gen diana. Las células madre embrionarias que sufren recombinación entre la construcción de DNA y el sitio homólogo en el cromosoma contendrán el *neo^r*, pero no incorporarán *tk^{HSV}*. Como *tk^{HSV}* confiere sensibilidad al nucleótido citotóxico análogo al ganciclovir, las células madre embrionarias recombinantes pueden ser seleccionadas por su capacidad de sobrevivir en presencia tanto de G-418 como de ganciclovir. En estas células, un alelo del gen X se interrumpirá.

En la segunda etapa, en la producción de ratones con inactivación de genes, las células madre embrionarias heterocigotas, para una mutación inactivante en el gen X, son inyectadas en un receptor de blastocisto murino de tipo silvestre, que luego es transferido a un ratón hembra pseudopreñado subrogante (Fig. 5-41). Las progenies resultantes serán quimeras que contendrán tejidos derivados de ambas células madre embrionarias trasplantadas y de las células huésped. Si las células madre embrionarias también son homocigotas para un marcador visible (p. ej., color del pelaje), la progenie quimérica en la que sobrevivieron las células madre embrionarias puede identificarse fácilmente. Después, los ratones quiméricos son apareados con ratones homocigotos para otro alelo del rasgo marcador, con el fin de determinar si la mutación inactivante se incorpora a la línea germinal. Finalmente, con el apareamiento de los ratones, cada heterocigoto para el alelo inactivado, producirá progenie homocigota para la mutación inactivante.

FIGURA EXPERIMENTAL 5-40 El aislamiento de células madre de ratón con una alteración dirigida al gen es el primer paso en la producción de un ratón con desactivación génica. (a) Cuando se introduce DNA exógeno en células madre embrionarias (ES), ocurre una inserción al azar a través de una recombinación no homóloga con mucha más frecuencia que una inserción dirigida a un gen a través de una recombinación homóloga. Las células recombinantes en las que un alelo del gen *X* (anaranjado y amarillo) es alterado puede obtenerse usando un vector recombinante que porta el gen *X* alterado con *neo^r* (verde), que confiere resistencia a G-418, y, fuera de la región de homología, *tk^{HSV}* (amarillo), el gen de la timidina cinasa del virus del herpes simple. La timidina cinasa viral, a diferencia de la enzima endógena del ratón, puede convertir el análogo de nucleótidos ganciclovir en la forma monofosfato; este es modificado a la forma trifosfato, que inhibe la replicación celular del DNA en las células ES. Ahí, el ganciclovir es citotóxico para las células recombinantes ES que portan el gen *tk^{HSV}*. La inserción no homóloga incluye el gen *tk^{HSV}*, mientras que la inserción homóloga no lo contiene; por lo tanto, solo las células con una inserción no homóloga son sensibles al ganciclovir. (b) Se seleccionan células recombinantes mediante el tratamiento con G-418, dado que las células que no pueden tomar DNA o integrarlo en su genoma son sensibles a este compuesto citotóxico. Las células recombinantes supervivientes se tratan con ganciclovir. Solo sobrevivirán las células con la alteración deseada en el gen *X*, y por lo tanto carentes de *tk^{HSV}* y su toxicidad acompañante. (Véase S.L. Manosour y cols., 1988, *Nature*, 336:348.)



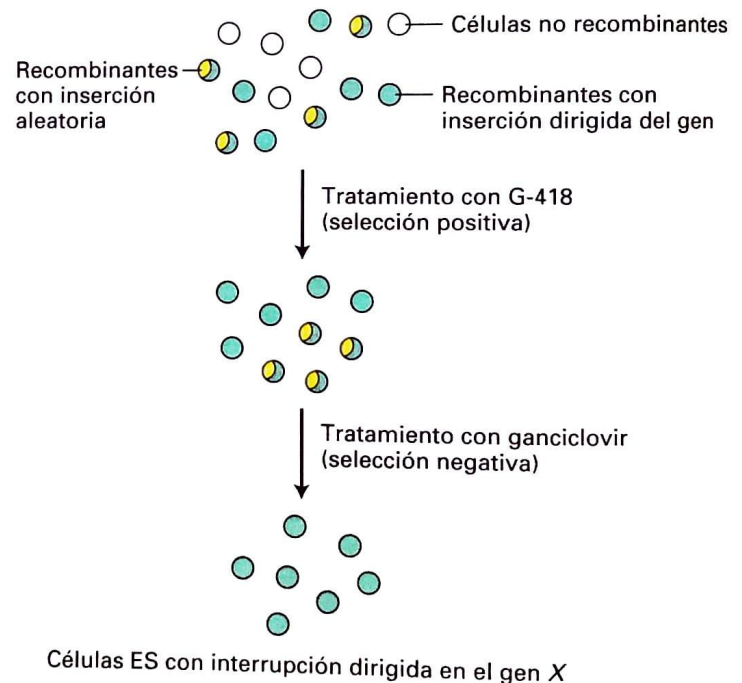
El desarrollo de ratones con inactivación de genes que imitan ciertas enfermedades humanas puede ilustrarse con la fibrosis quística. Mediante métodos analizados en la Sección 5.4, la mutación recesiva que causa esta enfermedad finalmente se demostró que estaba localizada en un gen conocido como *CFTR*, que codifica un canal de cloruro. Con el uso del gen *CFTR* humano de tipo silvestre, los investigadores aislaron el gen murino homólogo y, posteriormente, introdujeron mutaciones en éste. La técnica de inactivación de genes luego se utilizó para producir ratones mutantes, que mostraron síntomas (p. ej., un fenotipo), incluso perturbaciones en el funcionamiento de células epiteliales, similares a las de los seres humanos con fibrosis quística. Estos ratones con inactivación de genes están siendo utilizados en la actualidad como un sistema modelo para estudiar esta enfermedad y el desarrollo de terapias efectivas. ■

La recombinación de células somáticas puede inactivar genes en tejidos específicos

Los investigadores suelen estar interesados en analizar los efectos de las mutaciones inactivantes en un tejido particular del ratón, en un estadio específico del desarrollo o en ambos. Sin embargo, los ratones que llevan una inactivación en la línea germinal pueden presentar defectos en numerosos tejidos o morir antes del estadio del desarrollo de interés. Para abordar esta cuestión, los genetistas han ideado una técnica ingeniosa para inactivar genes diana en tipos específicos de células somáticas o en momentos particulares durante el desarrollo.

Esta técnica utiliza los sitios de recombinación del DNA (denominados *sitios loxP*) y la enzima Cre, que cataliza la recombinación entre ellos. El sistema de recombinación loxP-Cre deriva del bacteriófago P1, pero este sistema de recombinación en un sitio específico también

(b) Selección positiva y negativa de las células ES recombinantes



funciona cuando se lo coloca en células murinas. Una característica esencial de esta técnica es que la expresión de Cre está controlada por un promotor específico de tipo de célula. En los ratones *loxP-Cre* generados por el procedimiento descrito en la Figura 5-42, la inactivación del gen de interés (*X*), se produce solo en las células en las cuales el promotor que controla el gen *cre* está activo.

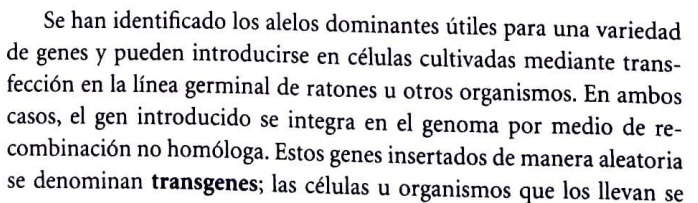
Una aplicación temprana de esta técnica proporciona fuerte evidencia de que un receptor neurotransmisor particular es importante para el aprendizaje y la memoria. Estudios farmacológicos y fisiológicos anteriores habían indicado que el aprendizaje normal requiere la clase

narias heterocigotas para una mutación inactivante (*knockout*) en un gen de interés (X) y homocigotas para un alelo dominante de un gen marcador (aquí, pelaje color marrón, A) son trasplantadas a una cavidad del blastocelo de embriones de 4,5 días, que son homocigotos para un alelo recesivo del marcador (aquí, color de pelaje negro, a). Paso 2: los embriones tempranos luego son implantados en una hembra seudopregnada. Toda la progenie que contiene células derivadas de células madre embrionarias son quimeras, indicadas por sus pelajes marrón y negro. Paso 3: los ratones quiméricos luego son cruzados nuevamente con ratones negros; la progenie marrón, a partir de este cruzamiento, tiene células derivadas de células madre embrionarias en la línea germinal. Pasos 4-6: el análisis de DNA aislados a partir de una pequeña cantidad de tejido de cola puede identificar los ratones marrones heterocigotos para el alelo inactivado. Los inter cruzamientos de estos ratones producen algunos individuos homocigotos para el alelo interrumpido, es decir, ratones inactivados. (Adaptado de M. R. Capecchi, 1989, *Trends Genet* 5:70.)

Los alelos dominantes negativos pueden inhibir funcionalmente algunos genes

Para ciertos genes, las dificultades en la producción de mutantes homocigotos inactivados pueden evitarse mediante el uso de un alelo que lleve una mutación dominante negativa. Estos alelos son genéticamente dominantes; es decir, producen un fenotipo mutante incluso en células que llevan una copia de tipo silvestre del gen. Sin embargo, a diferencia de otros tipos de alelos dominantes, los alelos dominantes negativos producen un fenotipo equivalente al de pérdida de la función.

Para ciertos genes, las dificultades en la producción de mutantes homocigotos inactivados pueden evitarse mediante el uso de un alelo que lleve una mutación dominante negativa. Estos alelos son genéticamente dominantes; es decir, producen un fenotipo mutante incluso en células que llevan una copia de tipo silvestre del gen. Sin embargo, a diferencia de otros tipos de alelos dominantes, los alelos dominantes negativos producen un fenotipo equivalente al de pérdida de la función.



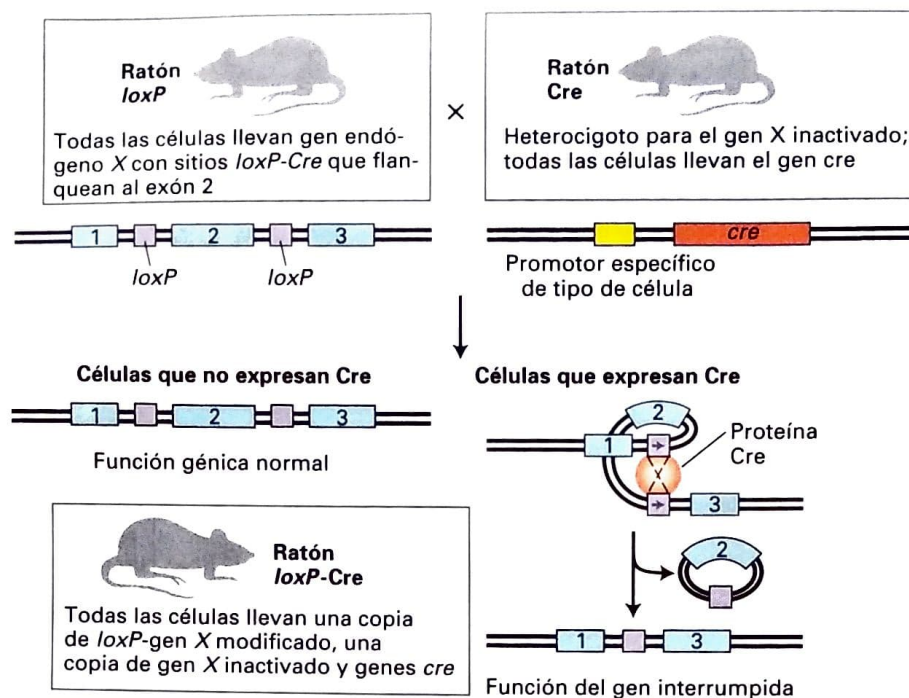


FIGURA EXPERIMENTAL 5-42 El sistema de recombinación *loxP*-*Cre* puede inactivar genes en tipos celulares específicos. Un sitio *loxP* (púrpura) se inserta a cada lado del exón 2 esencial del gen X diana (azul) mediante recombinación homóloga, lo que produce un ratón *loxP*. Puesto que los sitios *loxP* están en los intrones, no interrumpen la función de X. El ratón *Cre* lleva un alelo inactivado del gen X y un gen *cre* introducido (anaranjado) del bacteriófago P1 unido a un promotor específico del tipo de célula (amarillo). El gen *cre* se incorpora en el genoma murino mediante recombinación no homóloga y no afecta la función de otros genes. En los ratones *loxP*-*Cre* que resultan del cruce-

miento, la proteína *Cre* se produce solo en aquellas células en las cuales el promotor está activo. Por lo tanto, estas solo son células en las cuales se produce la recombinación entre los sitios *loxP* catalizados por *Cre*, lo que conduce a la delección del exón 2. Como el otro alelo es un gen X constitutivo inactivado, la delección entre los sitios *loxP* da como resultado la pérdida de función completa del gen X en todas las células que expresan *Cre*. Mediante el uso de diferentes promotores, los investigadores pueden estudiar los efectos de la inactivación del gen X en diversos tipos de células.

llaman transgénicos. Los transgenes que llevan un alelo dominante negativo son modificados de manera tal que el alelo es controlado por un promotor regulado, lo que permite la expresión de la proteína mutante en tejidos diferentes, en distintos momentos. Como se mencionó anteriormente, la integración aleatoria del DNA exógeno mediante recombinación no homóloga se produce a una frecuencia mucho más alta que la inserción a través de recombinación homóloga. Debido a este fenómeno, la producción del ratón transgénico es un proceso directo y eficiente (Fig. 5-43).

Entre los genes que pueden inactivarse funcionalmente mediante introducción de un alelo dominante negativo, están aquellos que codifican pequeñas proteínas de unión a GTP, pertenecientes a la superfamilia de las GTPasas. Como se describirá en varios capítulos más adelante, estas proteínas (Ras, Rac y Rab) actúan como interruptores intracelulares. La conversión de las pequeñas GTPasas del estado inactivo con GDP unido en un estado activo con GTP unido depende de su interacción con un factor intercambiador de guanina (GEF) correspondiente. Una pequeña GTPasa mutante que se une permanentemente a la proteína GEF bloqueará la conversión del tipo silvestre endógeno de GTPasas del estado GTP unido, impidiéndoles llevar a cabo su función de interruptor (Fig. 5-44).

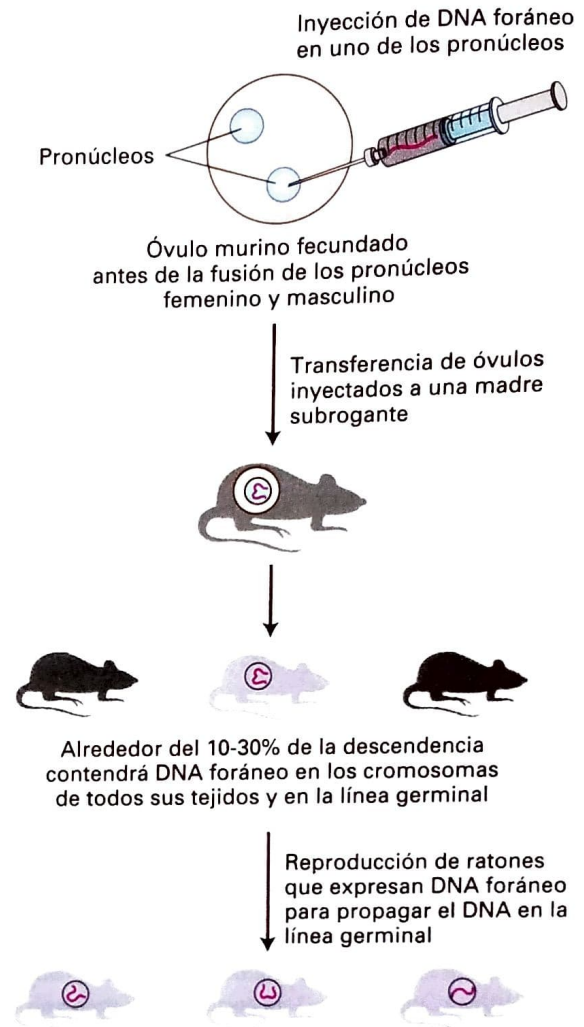
La interferencia del RNA causa inactivación génica mediante destrucción del mRNA correspondiente

El fenómeno conocido como **interferencia de RNA (RNAi)** es, tal vez, el método más directo para inhibir la función de genes específicos. Este enfoque es técnicamente más simple que los métodos descritos anteriormente para interrumpir genes. Como se observó por primera vez en el gusano *C. elegans*, el RNAi se refiere a la capacidad de un RNA de doble hebra para bloquear la expresión de sus mRNA de simple hebra correspondientes, pero no los mRNA con secuencias diferentes.

Como se describirá en el Capítulo 8, el fenómeno de RNAi se basa en la capacidad general de las células eucariontes de escindir el RNA de doble hebra en cortos segmentos de doble hebra (23 nt) conocidos como RNA de interferencia pequeño o RNA inhibidor pequeño (siRNA). La RNA endonucleasa que cataliza esta reacción, conocida como Dicer, se encuentra en todos los metazoos, pero no en los eucariontes más simples, como las levaduras. Las moléculas de siRNA, a su vez, pueden causar un corte de las moléculas de mRNA de secuencia coincidente, en una reacción catalizada por un complejo proteico conocido como RISC. RISC media el reconocimiento y la hibridación entre una hebra del siRNA y su secuencia complementaria en el mRNA diana;

ANIMACIÓN TÉCNICA: Creación de un ratón transgénico
VIDEO DE ANIMACIÓN: DNA inyectado en un pronúcleo de un cigoto murino

FIGURA EXPERIMENTAL 5-43 Los ratones transgénicos se producen mediante integración de un gen foráneo en la línea germinal murina. El DNA foráneo inyectado en uno de los dos pronúcleos (los núcleos haploides femenino y masculino aportados por los progenitores) tiene una alta probabilidad de integrarse al azar en los cromosomas de los cigotos diploides. Como un transgen se integra en el genoma receptor mediante recombinación no homóloga, no interrumpe los genes endógenos. (Véase R. L. Brinster y cols., 1981, *Cell* **27**:233.)

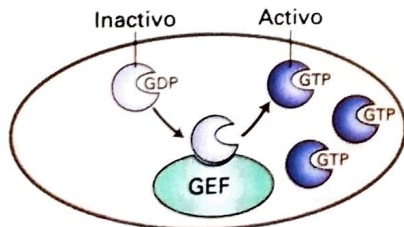


después, las nucleasas específicas del complejo RISC segmentan el híbrido RNA-siRNA. Este modelo explica la especificidad de la RNAi, puesto que depende del apareamiento de bases y de su potencia para silenciar la función génica, ya que se destruye en forma permanente el RNA complementario por degradación nucleotídica. La función normal de Dicer y RISC es permitir la regulación de genes mediante moléculas de RNA endógeno, conocidas como micro-RNA o miRNA.

Los investigadores aprovechan la vía de los micro-RNA para silenciar, de manera intencional, un gen de interés mediante el uso de cualquiera de los dos métodos generales para generar los siRNA de secuencia definida. En el primer método, se produce un RNA de doble hebra correspondiente a la secuencia del gen diana por medio de transcripción in vitro de las copias, en sentido y antisentido de esta secuencia (Fig. 5-45a).

(a) Las células expresan solo alelos de tipo silvestre de una GTPasa pequeña

De tipo silvestre



(b) Las células expresan ambos alelos y un alelo dominante negativo

Mutante dominante negativo

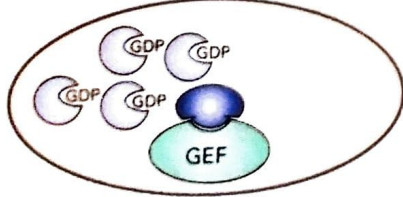


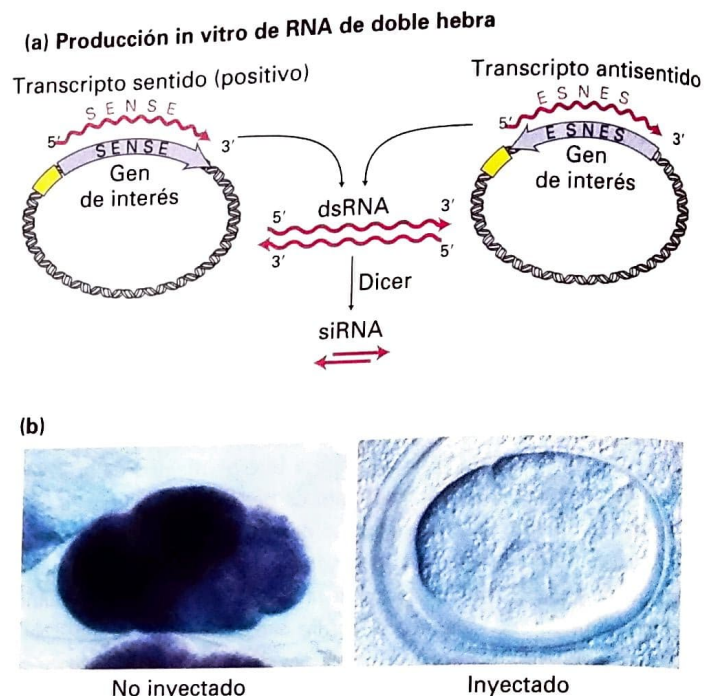
FIGURA 5-44 Inactivación de la función de una GTPasa del tipo silvestre mediante la acción de un alelo mutante dominante negativo. (a) Pequeñas GTPasas monoméricas (violeta) son activadas por su interacción con el factor intercambiador del nucleótido guanina (GEF), que cataliza el intercambio de GDP por GTP. (b) La introducción de un alelo negativo dominante de un gen GTPasa pequeña en células cultivadas o animales transgénicos lleva a la expresión de una GTPasa mutante que se une e inactiva el GEF. Como resultado, las copias tipo silvestre endógenas de la misma GTPasa pequeña quedan atrapadas en el estado de unión inactivo. Un solo alelo negativo dominante causa un fenotipo anulador (pérdida de la función) en heterocigóticos, similar al visto en portadores homocigóticos que tienen los dos alelos anuladores.

Este dsRNA se inyecta en la gónada de un gusano adulto, donde es convertido en siRNA por la Dicer en los embriones en desarrollo. En conjunto con el complejo RISC, las moléculas siRNA hacen que las moléculas de mRNA correspondientes se destruyan rápidamente. Los gusanos resultantes muestran un fenotipo similar al que hubiera resultado a partir de la interrupción del gen correspondiente en sí mismo. En algunos casos, la entrada de solo unas pocas moléculas de un dsRNA particular en una célula es suficiente para inactivar muchas copias del mRNA correspondiente. La Figura 5-45b ilustra la capacidad de un dsRNA inyectado para interferir en la producción del mRNA endógeno correspondiente en los embriones de *C. elegans*. En este experimento, los niveles de mRNA en embriones se determinaron por hibridación in situ, como se describió anteriormente, con el uso una sonda marcada con fluorescencia.

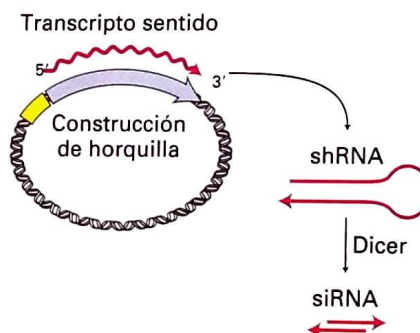
El segundo método es para producir un RNA de doble hebra in vivo. Una forma eficiente de realizarlo es expresar un gen sintético que está diseñado para contener segmentos en tándem, tanto de la secuen-

FIGURA EXPERIMENTAL 5-45 La interferencia de RNA (RNAi) puede inactivar funcionalmente genes en *C. elegans* y otros organismos.

(a) Producción in vitro del RNA de doble hebra (dsRNA) para RNAi de un gen diana específico. La secuencia codificante del gen, derivada de un cDNA o un segmento genómico de DNA, se coloca en dos orientaciones en un vector plasmidico adyacente a un promotor fuerte. La transcripción de ambas construcciones in vitro, mediante el uso de RNA polimerasa y ribonucleósidos trifosfatos, produce muchas copias de RNA en la misma orientación (idéntica a la secuencia de mRNA) o en orientación antisentido complementaria. En condiciones adecuadas, las moléculas de RNA complementarias se hibridarán para formar dsRNA. Cuando los dsRNA se inyectan dentro de las células, son cortados por Dicer en siRNA. (b) La inhibición de la expresión del RNA *mex3* en los embriones de gusano por RNAi (véase el texto para detalles del mecanismo). (Izquierda) La expresión del RNA *mex3* en embriones se analizó mediante hibridación in situ, con una sonda específica para este mRNA, es decir, unida a una enzima que produce un producto coloreado (púrpura). (Derecha) El embrión derivado de un gusano inyectado con mRNA *mex3* de doble hebra produce poco mRNA *mex3* endógeno o nada, como lo indica la ausencia de color. Cada embrión en estadio de cuatro células tiene $\approx 50 \mu\text{m}$ de longitud. (c) La producción in vitro del RNA de doble hebra se produce mediante plásmidos modificados genéticamente introducidos directamente en las células. La construcción del gen sintético es un arreglo en tándem de las secuencias en sentido y en antisentido del gen diana. Cuando es transcrito, se forma un RNA de doble hebra pequeño, con forma de horquilla (shRNA). El shRNA es escindido por Dicer para formar siRNA. (Parte [b] de A. Fire y cols., 1998, *Nature* 391:806.)



(c) Producción in vitro de RNA de doble hebra



cia en sentido como de la antisentido correspondiente al gen diana (Fig. 5-45c). Cuando este gen se transcribe, se forma una estructura de RNA de doble hebra "horquilla", conocida como *RNA horquilla pequeña* o *shRNA*. El shRNA luego será cortado por Dicer para formar moléculas siRNA. Los vectores de expresión lentivirales son particularmente útiles para introducir genes sintéticos para la expresión de las construcciones shRNA en células animales.

Ambos métodos de RNAi son utilizados en estudios sistemáticos para inactivar cada uno de los genes conocidos en un organismo y para observar cualquier dificultad. Por ejemplo, en estudios iniciales con *C. elegans*, la interferencia de RNA con 16 700 genes (alrededor del 86% del genoma) produce 1 722 fenotipos anómalos visibles. Los genes cuya inactivación funcional causa fenotipos anormales particulares pueden ser agrupados en conjuntos; cada miembro de un conjunto, presumiblemente, controla las mismas señales o acontecimientos. Las relaciones reguladoras entre los genes en el conjunto – por ejemplo, los genes que controlan el desarrollo muscular – pueden ser resueltas.

Otros organismos en los cuales la inactivación génica medida por RNAi ha sido exitosa incluye *Drosophila*, muchas clases de plantas, el pez cebra y la rana *Xenopus*, y los ratones son sometidos, en la actualidad, a búsquedas por iRNA a gran escala. Por ejemplo, los vectores lentivirales han sido diseñados para inactivar por iRNA más de 10 000 genes diferentes, expresados en las células cultivadas de mamífero. La función de los genes inactivados puede inferirse a partir de los defectos en el crecimiento o la morfología de los clones celulares transfectados con los vectores lentivirales.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 5.5

Inactivación de la función de genes específicos en los eucariontes

- Una vez que se ha clonado un gen, pueden deducirse pistas importantes acerca de su función normal in vivo a partir de los efectos fenotípicos observados de la mutación del gen.
- Es posible interrumpir genes en levadura mediante la inserción de un gen marcador seleccionable en un alelo de un gen de tipo silvestre, a través de recombinación homóloga, y producir un mutante heterocigoto. Cuando dicho heterocigoto esporula, la interrupción de un gen esencial producirá dos esporas haploides no viables (véase la Fig. 5-39).

- Un gen de levadura puede ser inactivado de un modo controlado mediante el uso del promotor GAL1 para apagar la transcripción de un gen, cuando las células son transferidas a un medio con glucosa.
- En los ratones, los genes modificados pueden incorporarse a la línea germinal en sus localizaciones genómicas originales mediante recombinación homóloga, lo que produce inactivaciones (véanse las Figs. 5-40 y 5-41). Las inactivaciones murinas pueden proporcionar modelos para enfermedades genéticas humanas, como la fibrosis quística.
- El sistema de recombinación *loxP*-Cre permite la producción de ratones en los cuales un gen es inactivado en un tejido específico.
- En la producción de las células u organismos transgénicos, el DNA exógeno se integra en el genoma del huésped mediante recombinación no homóloga (véase la Fig. 5-43). La introducción de un alelo dominante negativo en esta forma puede inactivar funcionalmente un gen sin alterar su secuencia.
- En muchos organismos, incluso el gusano *C. elegans*, el RNA de doble hebra desencadena la destrucción de todas las moléculas de mRNA con la misma secuencia (véase la Fig. 5-45). Este fenómeno, conocido como RNAi (interferencia de RNA), aporta una forma específica y potente de inactivar funcionalmente genes sin alterar sus estructuras.

Perspectivas para el futuro

Como los ejemplos expuestos en este capítulo y a lo largo de todo el libro, nuestra comprensión de muchos procesos fundamentales en la biología celular se basa en el análisis genético. Mediante análisis de las consecuencias fenotípicas de las mutaciones que inactivan un gen particular, los genetistas son capaces de conectar el conocimiento acerca de la secuencia, estructura y actividades bioquímicas de la proteína codificada con su función en el contexto de una célula viviente u organismos multicelulares. El enfoque clásico para establecer estas conexiones, tanto en los seres humanos como en los organismos más simples experimentalmente accesibles, apunta a identificar nuevas mutaciones de interés en base a sus fenotipos y, luego, a aislar el gen afectado y su producto proteico.

Aunque los científicos continúan utilizando este enfoque genético clásico para analizar los procesos celulares fundamentales y las vías bioquímicas, la disponibilidad de la información de la secuencia genómica completa para la mayoría de los organismos de experimentación ha cambiado fundamentalmente la forma en que se llevan a cabo los experimentos genéticos. Con el uso de diversos métodos de computación, los científicos han identificado secuencias génicas que codifican proteínas en la mayoría de los organismos de experimentación, incluidos *E. coli*, levadura, *C. elegans*, *Drosophila*, *Arabidopsis*, ratón y seres humanos. Las secuencias génicas, a su vez, revelan la secuencia de aminoácidos de los productos proteicos codificados y aportan una lista casi completa de las proteínas encontradas en cada uno de los principales organismos de experimentación.

Por lo tanto, el objetivo de la mayoría de los investigadores ha cambiado del hallazgo de genes nuevos y proteínas al descubrimiento de las funciones de los genes y proteínas cuya secuencia ya se conoce. Una vez que se ha identificado el gen de interés, la información de la secuencia genómica acelera, en gran medida, las subsiguientes manipulaciones

genéticas del gen, incluyendo su inactivación diseñada, incluso su inactivación diseñada; por consiguiente, se puede aprender más acerca de su función. Los grupos de vectores para la inactivación de RNAi de la mayoría de los genes definidos en el nematodo *C. elegans* permiten la búsqueda genética eficiente a realizarse en este organismo multicelular. Estos métodos, en la actualidad, están siendo aplicados a una gran colección de genes en las células de mamífero cultivadas; y en el futuro cercano, métodos de RNAi o de inactivación se utilizarán para inactivar cada gen en el ratón.

En el pasado, un científico podía pasar muchos años estudiando un único gen, pero actualmente los investigadores, por lo general, estudian grupos enteros de genes a la vez. Por ejemplo, con las micromatrices de DNA, el nivel de expresión de todos los genes en un organismo puede medirse casi tan fácilmente como la expresión de un gen único. Uno de los desafíos más grandes que afrontan los genetistas en el siglo XXI es explorar la vasta cantidad de información disponible acerca de la función y la regulación de los genes individuales, con el fin de comprender cómo están organizados los grupos de genes para formar vías bioquímicas complejas y redes regulatorias.

Palabras clave

alelo 172	transferencia Northern 198
clon 185	fenotipo 172
DNA complementario	plásmidos 184
(cDNA) 186	mutación puntual 173
clonación de DNA 182	reacción en cadena de la
biblioteca de DNA 185	polimerasa (PCR) 192
micromatrices de DNA 199	sondas 188
dominante 173	recesivo 173
complementación	DNA recombinante 182
funcional 189	recombinación 180
inactivación de genes 213	enzimas de restricción 183
genómica 222	interferencia de RNA
genotipo 172	(RNAi) 216
heterocigoto 173	segregación 175
homocigoto 173	transferencia Southern 198
hibridación 188	transfección 203
hibridación in situ 199	transformación 184
ligamiento 182	transgenes 215
mutágeno 172	vector 182
mutación 172	de tipo silvestre 172

Revisión de los conceptos

1. Las mutaciones genéticas pueden proporcionar conocimientos acerca de los mecanismos de los complejos procesos celulares y del desarrollo. Dependiendo de si una mutación particular es recesiva o dominante, ¿cómo podría ser el análisis de una mutación genética diferente?
2. ¿Qué es una mutación sensible a la temperatura? ¿Por qué las mutaciones sensibles a la temperatura son útiles para dejar al descubierto la función de un gen?
3. Describa cómo puede utilizarse el análisis de complementación para revelar si dos mutaciones están en los mismos genes o en diferentes.

Explicar por qué el análisis de complementación no funcionará con mutaciones dominantes.

4. Jane ha aislado una cepa mutante de levadura que forma colonias rojas, en lugar de las blancas normales, cuando se las cultiva. Para determinar el gen mutante, ella decide usar complementación funcional con una biblioteca de DNA que contiene un marcador de selección de lisina. Además de la mutación desconocida, la levadura carece del gen necesario para sintetizar los aminoácidos leucina y lisina. ¿En qué medios cultivará Jane sus levaduras para asegurarse de que hayan adquirido los plásmidos de la biblioteca? ¿Cómo sabrá ella cuando un plásmido de la biblioteca ha complementado la mutación de la levadura?

5. Las enzimas de restricción y la DNA ligasa cumplen funciones esenciales en la clonación del DNA. ¿Cómo es que una bacteria que produce una enzima de restricción no corta su propio DNA? Describa algunas características generales de los sitios de enzimas de restricción. ¿Cuáles son los tres tipos de extremos de DNA que pueden generarse después de cortar el DNA con enzimas de restricción? ¿Qué reacción cataliza la DNA ligasa?

6. Los plásmidos bacterianos suelen servir como vectores de clonación. Describa las características esenciales de un vector plasmídico. ¿Cuáles son las ventajas y las aplicaciones de los plásmidos como vectores de clonación?

7. Una biblioteca de DNA es una colección de clones, cada uno de los cuales contiene un fragmento diferente de DNA, insertado en un vector. ¿Cuál es la diferencia entre una biblioteca de cDNA y una de DNA genómico? A usted le gustaría clonar un gen X, un gen que solo se expresa en neuronas, en un vector, usando una biblioteca como fuente del inserto. Si usted dispone de las siguientes bibliotecas (biblioteca genómica de células epiteliales, biblioteca de cDNA de células epiteliales, biblioteca genómica a partir de neuronas, biblioteca de cDNA de neuronas), ¿cuál utilizaría y por qué?

8. En 1993, Kary Mullis ganó el premio Nobel en Química por su invención del proceso de PCR. Describa los tres pasos de cada ciclo de una reacción de PCR. ¿Por qué el descubrimiento de una polimerasa de DNA termoestable (p. ej., *Taq* polimerasa) es tan importante para el desarrollo de la PCR?

9. Las transferencias Northern y Southern son herramientas poderosas en la biología molecular, basadas en la hibridación de ácidos nucleicos. ¿En qué aspectos son iguales estas técnicas? ¿En qué difieren? Aporte algunas aplicaciones específicas para cada técnica de transferencia.

10. Se ha expresado un número de proteínas foráneas en células bacterianas y de mamífero. Describa las características esenciales de un plásmido recombinante, necesarias para la expresión de un gen foráneo. ¿Cómo puede usted modificar la proteína foránea para facilitar su purificación? ¿Cuál es la ventaja de la expresión de una proteína en células de mamífero frente a células de bacterias?

11. La transferencia Northern, la RT-PCR y las micromatrices pueden usarse para analizar la expresión génica. Un laboratorio estudia células de levadura y compara su crecimiento con dos azúcares diferentes, glucosa y galactosa. Un estudiante está comparando la expresión del gen *HMG2* en diferentes condiciones. ¿Qué técnica(s) podrían utilizarse y por qué? Otro estudiante quiere comparar la expresión de todos los genes en el cromosoma 4, de los cuales existen aproximadamente 800. ¿Qué técnica(s) podría emplear?

12. En la determinación de la identidad de la proteína que corresponde al gen recién descubierto, a menudo, ayuda saber el patrón de expresión de tejido para ese gen. Por ejemplo, los investigadores han encontrado que un gen denominado *SERPINA6* se expresa en el hígado, el riñón y

el páncreas, pero no en otros tejidos. ¿Qué técnicas podrían usar los investigadores para averiguar en qué tejidos se expresa un gen particular?

13. Los polimorfismos de DNA pueden utilizarse como marcadores de DNA. Describa las diferencias entre los polimorfismos SNP y SSR. ¿Cómo pueden usarse estos marcadores para estudios de mapeo de DNA?

14. ¿De qué modo el mapeo de desequilibrio de ligamiento a veces proporciona una mejor resolución de la localización de genes que el mapeo de ligamiento clásico?

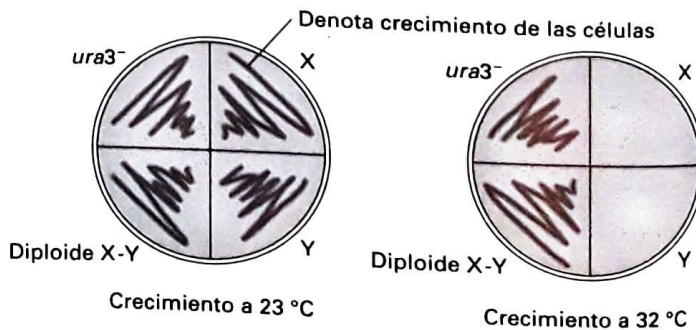
15. Los estudios de ligamiento genético, en general, apenas pueden localizar la posición cromosómica de un gen de "enfermedad". ¿Cómo los análisis de expresión y el análisis de secuencia de DNA contribuyen a localizar un gen de enfermedad dentro de la región identificada por mapeo de ligamiento?

16. La capacidad para modificar selectivamente el genoma, en el ratón, ha revolucionado la genética murina. Esquematice el procedimiento para generar un ratón nokeado en un locus genético específico. ¿Cómo puede utilizarse el sistema *loxP*-Cre para inactivar condicionalmente un gen? ¿Cuál es una aplicación médica importante de los ratones inactivados?

17. Existen dos métodos para la inactivación funcional de un gen sin alterar la secuencia génica: mediante mutaciones dominantes negativas y por interferencia de RNA (RNAi). Describa de qué forma cada método puede inhibir la expresión de un gen.

Análisis de los datos

1. Un cultivo de levaduras que requiere uracilo para crecer (*ura3⁻*) fue mutagenizado, y se aislaron dos colonias mutantes, X e Y. Las células de tipo de apareamiento α del mutante X se aparearon con las células de tipo de apareamiento α del mutante Y para formar células diploides. Las células progenitoras (*ura3⁻*), X, Y, y las diploides se sembraron en placas de agar que contienen uracilo y se las incubó a 23 o a 32 °C. El crecimiento celular fue monitorizado por la formación de colonias en las placas de cultivo, como se muestra en la siguiente figura.



a. ¿Qué puede deducirse acerca de los mutantes X e Y a partir de los datos proporcionados?

b. Una biblioteca de cDNA de levadura de tipo silvestre, preparada en un plásmido que contiene el gen de tipo silvestre *URA3⁺*, se usó para transformar células, que luego se cultivaron como se indicó. Cada punto negro a continuación representa un único clon que crece en una

placa de Petri. ¿Cuáles son las diferencias moleculares entre los clones que crecen en las dos placas? ¿Cómo pueden usarse estos resultados para identificar el plásmido que contiene una copia del gen X de tipo silvestre? Sobre la base de estos resultados, ¿cómo puede descubrirse la identidad del gen X?

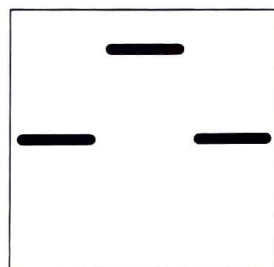


Crecimiento a 23 °C en un medio que carece de uracilo

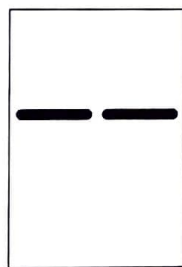


Crecimiento a 32 °C en un medio que carece de uracilo

c. Se extrae el DNA de las células parentales, a partir de las células X y de las células Y. Se utilizan cebadores de PCR para amplificar el gen que codifica X en ambas células parentales y en las células X. Los cebadores son complementarios a las regiones del DNA, justo en la parte externa al gen que codifica X. Los resultados de la PCR se muestran en un gel a la derecha. ¿Qué puede deducirse acerca de la mutación en el gen X, a partir de estos datos?

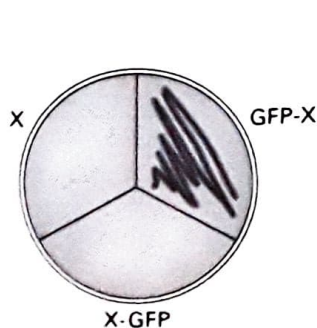


Parental X Y
Southern

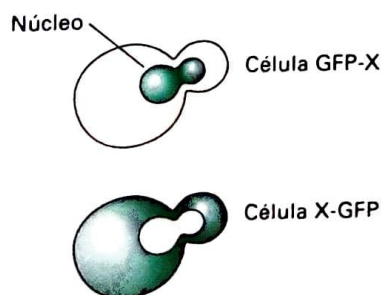


Parental X
PCR

d. Una construcción del gen de tipo silvestre es diseñada de manera tal que codifique una proteína de fusión en la cual está presente la proteína verde fluorescente (GFP) en el extremo N-terminal (GFP-X) o en el extremo C-terminal (X-GFP) de la proteína X. Ambas construcciones, presentes en un plásmido URA3⁺, se utilizan para transformar células X crecidas en ausencia de uracilo. Después, se comprueba el crecimiento de las células X transformadas a 32 °C, mostrado abajo, a la izquierda. A la derecha, están las típicas imágenes fluorescentes de los crecimientos celulares de X-GFP y GFP-X a 23 °C, en los cuales el verde indica la presencia de proteína verde fluorescente. ¿Cuál es una explicación razonable para el crecimiento de las células GFP-X, pero no de X-GFP a 32 °C?



X-GFP
Crecimiento a 32 °C



Localización GFP en las células crecidas a 23 °C

e. Se genera la descendencia haploide de las células diploides de la parte (a). Los dobles mutantes XY constituyen $\frac{1}{4}$ de estas descendencias. Las células X haploides, las células Y, y las células XY en cultivo líquido están sincronizadas en un estadio justo antes de la gemación y luego son cambiadas de 23 °C a 32 °C. El análisis de las células, 24 horas después, revela que las células X detuvieron su crecimiento con brotes pequeños, las células Y están detenidas con brotes grandes y las células XY, con brotes pequeños. ¿Cuál es la relación entre X e Y?

Referencias

Análisis genético de mutaciones para identificar y estudiar genes

Adams, A. E. M., D. Botstein, and D. B. Drubin. 1989. A yeast actin-binding protein is encoded by *sac6*, a gene found by suppression of an actin mutation. *Science* 243:231.

Griffiths, A. G. F., et al. 2000. *An Introduction to Genetic Analysis*, 7th ed. W. H. Freeman and Company.

Guarente, L. 1993. Synthetic enhancement in gene interaction: a genetic tool comes of age. *Trends Genet.* 9:362-366.

Hartwell, L. H. 1967. Macromolecular synthesis of temperature-sensitive mutants of yeast. *J. Bacteriol.* 93:1662.

Hartwell, L. H. 1974. Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science* 183:46.

Nüsslein-Volhard, C, and E. Wieschaus. 1980. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287:795-801.

Simon, M. A., et al. 1991. Ras1 and a putative guanine nucleotide exchange factor perform crucial steps in signaling by the sevenless protein tyrosine kinase. *Cell* 67:701-716.

Tong, A. H., et al. 2001. Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. *Science* 294:2364-2368.

Clonación del DNA y caracterización

Ausubel, F. M., et al. 2002. *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley.

Gubler, U., and B. J. Hoffman. 1983. A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* 25:263-289.

Han, J. H., C. Stratowa, and W. J. Rutter. 1987. Isolation of full-length putative rat lysophospholipase cDNA using improved methods for mRNA isolation and cDNA cloning. *Biochem.* 26:1617-1632.

Itakura, K., J. J. Rossi, and R. B. Wallace. 1984. Synthesis and use of synthetic oligonucleotides. *Ann. Rev. Biochem.* 53:323-356.

Maniatis, T., et al. 1978. The isolation of structural genes from libraries of eucaryotic DNA. *Cell* 15:687-701.

Nasmyth, K. A., and S. I. Reed. 1980. Isolation of genes by complementation in yeast: molecular cloning of a cell-cycle gene. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 77:2119-2123.

Nathans, D., and H. O. Smith. 1975. Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules. *Ann. Rev. Biochem.* 44:273-293.

Roberts, R. J., and D. Macelis. 1997. REBASE—restriction enzymes and methylases. *Nucl. Acids Res.* 25:248-262. Information on accessing a continuously updated database on restriction and modification enzymes at <http://www.neb.com/rebase>.

Uso de los fragmentos de DNA clonados para estudiar la expresión génica

Andrews, A. T. 1986. *Electrophoresis*, 2d ed. Oxford University Press.

Erllich, H., ed. 1992. *PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification*. W. H. Freeman and Company.

Pellicer, A., M. Wigler, R. Axel, and S. Silverstein. 1978. The transfer and stable integration of the HSV thymidine kinase gene into mouse cells. *Cell* 41:133-141.

Saiki, R. K., et al. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.

Sanger, F. 1981. Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science* 214:1205-1210.

Souza, L. M., et al. 1986. Recombinant human granulocyte-colony stimulating factor: effects on normal and leukemic myeloid cells. *Science* 232:61-65.

Wahl, G. M., J. L. Meinkoth, and A. R. Kimmel. 1987. Northern and Southern blots. *Meth. Enzymol.* 152:572-581.

Wallace, R. B., et al. 1981. The use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes. II: Hybridization of oligonucleotides of mixed sequence to rabbit β -globin DNA. *Nucl. Acids Res.* 9:879-887.

Localización e identificación de genes de enfermedades humanas

Botstein, D., et al. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Genet.* 32:314-331.

Donis-Keller, H., et al. 1987. A genetic linkage map of the human genome. *Cell* 51:319-337.

Hartwell, L., et al. 2006. *Genetics: From Genes to Genomes*. McGraw-Hill.

Hastbacka, T., et al. 1994. The diastrophic dysplasia gene encodes a novel

sulfate transporter: positional cloning by fine-structure linkage disequilibrium mapping. *Cell* 78:1073.

Orita, M., et al. 1989. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5:874.

Tabor, H. K., N. J. Risch, and R. M. Myers. 2002. Opinion: candidate-gene approaches for studying complex genetic traits: practical considerations. *Nat. Rev. Genet.* 3:391-397.

Inactivación de la función de genes específicos en los eucariontes

Capecchi, M. R. 1989. Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244:1288-1292.

Deshaies, R. J., et al. 1988. A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature* 332:800-805.

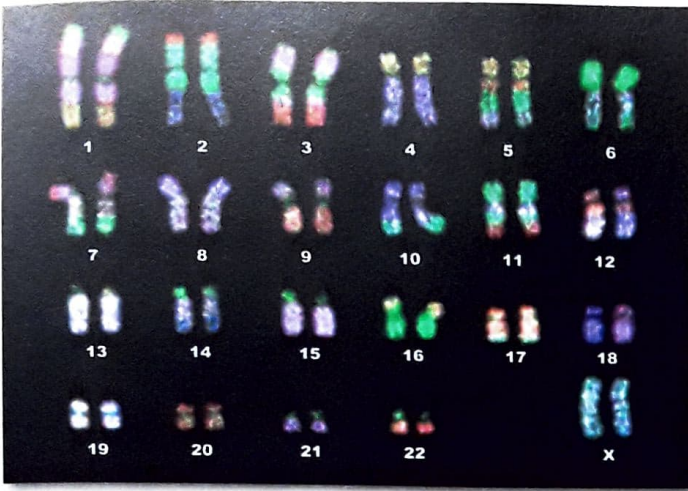
Fire, A., et al. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811.

Gu, H., et al. 1994. Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 265:103-106.

Zamore, P. D., et al. 2000. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101:25-33.

Zimmer, A. 1992. Manipulating the genome by homologous recombination in embryonic stem cells. *Ann. Rev. Neurosci.* 15:115.

Genes, genómica y cromosomas



Estos cromosomas pintados por RxFISH con colores brillantes son tan bellos como útiles para revelar las anomalías cromosómicas y comparar los cariotipos de diferentes especies. (© Departamento de Citogenética Clínica, Addenbrookes Hospital/Photo Researchers, Inc.)

En los capítulos anteriores aprendimos cómo la estructura y la composición de las proteínas les permiten realizar una amplia variedad de funciones celulares. También analizamos otro componente vital de las células, los ácidos nucleicos, y el proceso mediante el cual la información codificada en la secuencia del DNA se traduce en proteína. En este capítulo, nos centraremos nuevamente en el DNA y las proteínas, ya que estudiaremos las características de los genomas nucleares y de los orgánulos en los eucariontes: las características de los genes y de las otras secuencias del DNA que forman parte del genoma, y de qué manera este DNA está estructurado y organizado por las proteínas dentro de la célula.

Para el comienzo del siglo XXI, los biólogos moleculares habían completado la secuenciación de los genomas de cientos de virus, numerosas bacterias y un eucarionte unicelular, la levadura *S. cerevisiae*. Hasta el momento, se conoce la gran mayoría de la secuencia genómica de la levadura de fisión *S. pombe*, la planta simple *A. thaliana*, el arroz y múltiples animales multicelulares (**metazoos**) que incluyen al gusano *C. elegans*, la mosca de la fruta *D. melanogaster*, el ratón, el ser humano y al menos un filo representativo de cada uno de los ≈ 35 de metazoos. El análisis detallado de estas secuenciaciones reveló pistas acerca de la evolución, la organización genómica y la función génica. Esta información ha permitido a los investigadores identificar genes previamente desconocidos y estimar la cantidad total de genes que codifican pro-

teínas en cada genoma. Las comparaciones entre las secuencias génicas suelen proporcionar indicios acerca de las posibles funciones de genes recién identificados. Comparar la secuencia y la organización de genomas de distintas especies también nos ayuda a comprender la evolución de los organismos.

Sorprendentemente, la secuenciación del DNA reveló que una gran porción de los genomas de los eucariontes superiores no codifica mRNA o ningún otro RNA necesario para el organismo. Notablemente, tal DNA no codificante constituye $\approx 98,5\%$ del DNA cromosómico humano. El DNA no codificante de los organismos multicelulares contiene muchas regiones que son similares pero no idénticas. Las variaciones dentro de algunos segmentos de este *DNA repetitivo* son tan grandes entre los individuos que cada persona puede ser identificada por una “huella dactilar” de DNA (huella genética) en base a estas variaciones. Más aún, algunas secuencias de DNA repetitivo no se encuentran en la misma posición en los genomas de diferentes individuos de la misma especie. En una época, todo el DNA no codificante fue denominado “DNA basura” y considerado inservible. En la actualidad se comprende la base evolutiva de este DNA extra y la variación en la localización de ciertas secuencias entre los individuos. Los genomas celulares albergan **elementos transponibles (móviles)** de DNA que pueden copiarse a sí mismos y moverse por todo el genoma. Aunque los elementos transponibles de DNA parecen tener poca función en el

CONTENIDO

6.1	Estructura de genes eucariontes	225	6.5	Genómica: análisis amplio de la estructura del genoma y la expresión génica	252
6.2	Organización cromosómica de los genes y el DNA no codificante	231	6.6	Organización estructural de los cromosomas eucariontes	256
6.3	Elementos transponibles (móviles) de DNA	234	6.7	Morfología y elementos funcionales de los cromosomas eucariontes	266
6.4	DNA de orgánulos	245			

ciclo de vida de un organismo individual, en la escala evolutiva han modelado nuestros genomas y contribuido a la rápida evolución de los organismos multicelulares.

En los eucariontes superiores, las regiones de DNA que codifican proteínas o RNA funcionales (o sea, **genes**) se encuentran en medio de esta extensión de DNA aparentemente no funcional. Además del DNA no funcional *entre* los genes, los **intrones** no codificantes son comunes *dentro* de los genes de las plantas y animales multicelulares. La secuenciación de los mismos genes que codifican proteínas en distintas especies de eucariontes ha demostrado que la presión evolutiva selecciona el mantenimiento de secuencias relativamente similares en las regiones codificantes o **exones**. En contraste, entre los intrones se produce una amplia variación de secuencia, incluso la pérdida total, lo cual sugiere que la mayoría de las secuencias intrónicas tienen poca significancia funcional. Sin embargo, como ya veremos, aunque la mayoría de la secuencia del DNA de los intrones es no funcional, la existencia de intrones ha favorecido la evolución de las proteínas multidominio que son comunes en los eucariontes superiores y también ha permitido la evolución rápida de proteínas con nuevas combinaciones de dominios funcionales. Además, los RNA no codificantes cortos llamados siRNA y miRNA que regulan la traducción y estabilidad del mRNA, y los RNA no codificantes largos, que pueden regular la transcripción a través de su influencia sobre la estructura de cromatina, pueden ser procesados a partir de algunos intrones (Caps. 7 y 8).

Las mitocondrias y los cloroplastos también contienen DNA que codifican proteínas esenciales para la función de estos orgánulos vitales. Veremos que los DNA de mitocondrias y cloroplastos son remanentes evolutivos de los orígenes de estos orgánulos. La comparación

de secuencias de DNA entre genomas de diferentes clases de bacterias, mitocondrias y cloroplastos ha revelado que estos orgánulos evolucionaron a partir de eubacterias intracelulares que desarrollaron relaciones simbióticas con células eucariontes ancestrales.

La enorme longitud del DNA celular es un problema significativo con el cual deben enfrentarse las células. El DNA de una célula humana, que mide alrededor de 2 metros de longitud total, debe contenerse dentro de células con diámetros menores a 10 μm , una proporción de compactación de más de 10^5 a 1. En términos relativos, si una célula fuera de 1 centímetro de diámetro (alrededor del tamaño de un guisante), ¡la longitud del DNA empaquetado dentro de su núcleo debería ser de alrededor de 2 kilómetros! Las proteínas eucariontes especializadas, asociadas con el DNA nuclear, pliegan y organizan de manera refinada el DNA de manera tal que entre dentro del núcleo y que cualquier parte de ese DNA altamente compactado pueda ser aseque rápidamente para la transcripción, la replicación del DNA y la reparación del DNA dañado sin que las moléculas largas de DNA se enreden o se rompan. Por otra parte, se debe mantener la integridad del DNA durante el proceso de división celular cuando se reparte para dar lugar a las células hijas. En los eucariontes, el complejo de DNA y las proteínas que lo organizan, denominado **cromatina**, puede visualizarse como **cromosomas** individuales durante la mitosis. Como se verá en éste y el siguiente capítulo, la organización del DNA en la cromatina permite un mecanismo para la regulación de la expresión génica que no es posible en las bacterias.

En las primeras cinco secciones de este capítulo, se brindará un panorama general de los genes y genomas eucariontes. Primero se describirá la estructura de los genes eucariontes y las complejidades

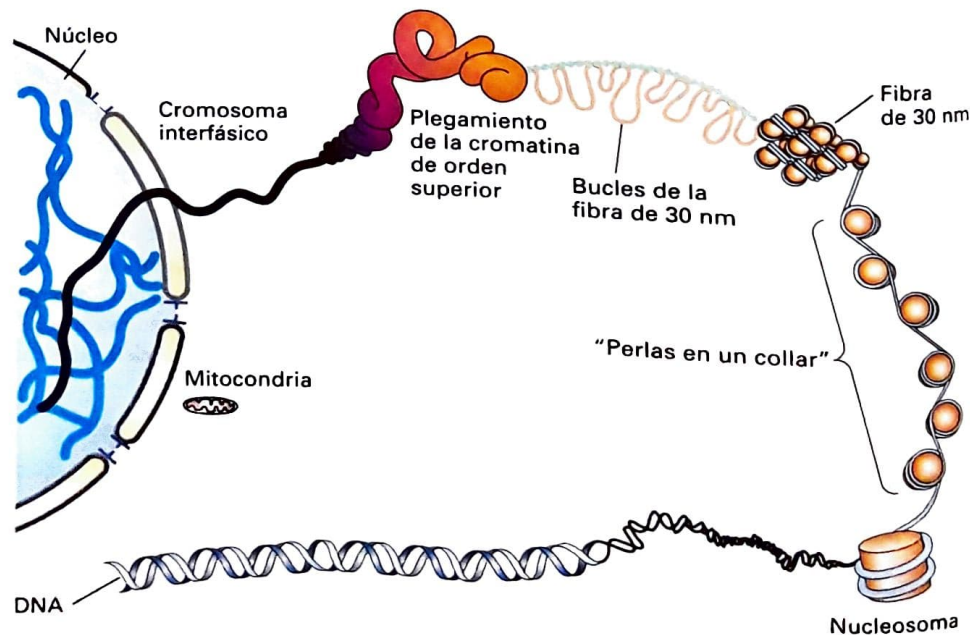


FIGURA 6-1 Panorama general de la estructura de genes y cromosomas. El DNA de los eucariontes superiores consiste en secuencias únicas y repetidas. Solo el $\approx 1.5\%$ del DNA humano codifica proteínas y RNA funcionales y secuencias reguladoras que controlan su expresión; el resto es meramente DNA espaciador entre genes e intrones dentro de los genes. Mucho de este DNA, 45% en los seres humanos, deriva de los elementos móviles de DNA, los simbiontes genéticos que contribuyeron a la evolución del genoma contemporáneo. Cada cromosoma consiste en una molécula larga única de DNA de hasta ≈ 280 Mb en los seres humanos, organizada en niveles crecientes de condensación mediante proteínas histonas y no histonas con las cuales forma complejos intrincados. En los cloroplastos y mitocondrias se localizan moléculas de DNA mucho más pequeñas.

Principales tipos de secuencias de DNA	
Genes de copia única	DNA de secuencia única
Familia de genes	Elementos móviles de DNA
Genes repetidos en tándem	DNA espaciador
Intrones	

que surgen en los organismos superiores a partir del procesamiento de los precursores de mRNA para dar origen a los mRNA cortados y empalmados de forma alternativa. Luego se analizarán las principales clases de DNA eucariontes, incluyendo las propiedades especiales de los elementos móviles y cómo modelaron los genomas contemporáneos. Luego se estudiará el DNA organular y cómo se diferencia del DNA nuclear. Este contexto nos preparará para analizar la **genómica**, métodos basados en informática para el análisis y la interpretación de gran cantidad de información de secuencia. Las últimas dos secciones del capítulo abordan cómo se organiza físicamente el DNA en las células eucariontes. Se describirá el empaquetamiento del DNA y las proteínas **histonas** en complejos compactos llamados **nucleosomas** que son las unidades monoméricas de la cromatina, la estructura a gran escala de los cromosomas y los elementos funcionales necesarios para la duplicación y la segregación. La Figura 6-1 proporciona un panorama general de estos temas interrelacionados. La comprensión de los genes, la genómica y los cromosomas obtenida en este capítulo nos preparará para explorar en los siguientes dos capítulos el conocimiento actual acerca de cómo están reguladas la síntesis y la concentración de cada proteína y RNA funcional en una célula.

6.1 Estructura de genes eucariontes

En términos moleculares, un gen se define como *la secuencia completa de ácido nucleico necesaria para la síntesis de un producto génico funcional (polipéptido o RNA)*. De acuerdo con esta definición un gen incluye más que los nucleótidos que codifican una secuencia de aminoácidos o un RNA funcional, llamada *región codificante*. Un gen también incluye todas las secuencias de DNA necesarias para la síntesis de un transcrito de RNA, sin importar la localización de todas aquellas secuencias localizadas en relación a la región codificante. Por ejemplo, en los genes eucariontes, las regiones de control de la transcripción conocidas como **potenciadores o intensificadores** (*enhancers*) pueden estar a 50 kb o más de la región codificante. Como se aprendió en el Capítulo 4, otras regiones no codificantes cruciales de los genes eucariontes incluyen el promotor, así como también secuencias que especifican la escisión 3' y la poliadenilación, conocidas como *sitios poli(A)*, y la eliminación de intrones de los transcritos primarios de RNA, conocidos como *sitios de corte y empalme o procesamiento (splicing)* (véase la Fig. 4-15). Las mutaciones en estas secuencias, que controlan la iniciación de la transcripción y el procesamiento del RNA, afectan la expresión y el funcionamiento normal de los RNA, produciendo diferentes fenotipos en los organismos mutantes. En los Capítulos 7 y 8 se examinarán en más detalle varios elementos de control de los genes.

Aunque muchos genes se transcriben a mRNA, que codifican proteínas, algunas secuencias de DNA se transcriben a RNA que no codifican proteínas (p. ej., tRNA y rRNA descriptos en el Cap. 4, y miRNA y siRNA que regulan la traducción y la estabilidad de los mRNA, analizada en el Cap. 8). Debido a que el DNA que codifica los tRNA, los rRNA, los miRNA, y los siRNA puede causar fenotipos específicos cuando está mutado, estas regiones de DNA suelen denominarse *genes* de tRNA, rRNA, miRNA, y siRNA, aunque los productos finales de estos genes son moléculas de RNA y no proteínas.

En esta sección, se describirá la estructura de genes en las bacterias y los eucariontes y se analizará cómo sus respectivas estructuras génicas influyen en la expresión y la evolución de los genes.

La mayoría de los eucariontes contienen intrones y producen mRNA que codifican proteínas únicas

Como se vio en el Capítulo 4, muchos mRNA bacterianos (p. ej., el mRNA codificado por el operón *trp*) incluyen la región codificante para varias proteínas que funcionan juntas en un proceso biológico. Se dice que tales mRNA son *policistronicos* (un *cistron* es una unidad genética que codifica un único polipéptido). Por el contrario, la mayoría de los mRNA en los eucariontes son *monocistronicos*; es decir, cada molécula de mRNA codifica una única proteína. Esta diferencia entre mRNA policistronico y monocistronico implica una diferencia fundamental en su traducción.

Dentro de un mRNA policistronico bacteriano se localiza un sitio de unión a ribosoma cerca del sitio de inicio para cada una de las regiones codificantes de proteínas, o cistrones, en el mRNA. El comienzo de la traducción puede comenzar en cualquiera de estos múltiples sitios internos, produciendo múltiples proteínas (véase la Fig. 4-13a). Sin embargo, en la mayoría de los mRNA eucariontes, la estructura de la caperuza 5' dirige la unión a ribosomas, y la traducción comienza en el codón de inicio AUG más cercano (véase la Fig. 4-13b). Como resultado, la traducción solo comienza en ese sitio. En muchos casos, los transcritos primarios de los genes que codifican proteínas eucariontes son procesados a un único tipo de mRNA, que es traducido para dar un único tipo de polipéptido (véase la Fig. 4-15).

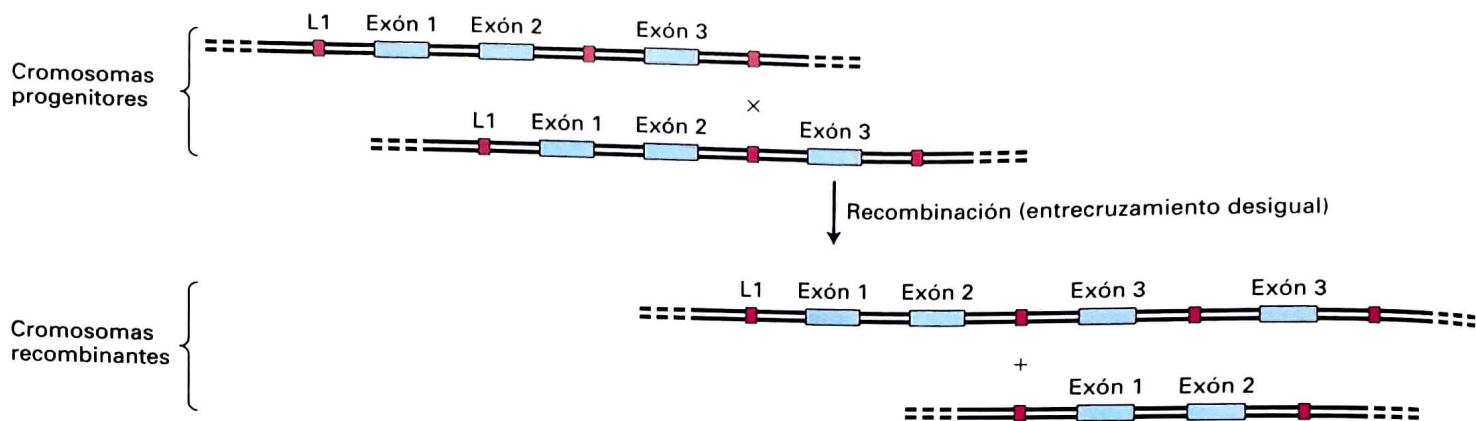
A diferencia de los genes bacterianos y de levadura, que en general carecen de intrones, la mayoría de los genes en los animales multicelulares y las plantas contienen intrones, que se eliminan durante el procesamiento del RNA en el núcleo antes de que el mRNA completamente procesado sea exportado al citosol para su traducción. En muchos casos, los intrones en un gen son considerablemente más largos que los exones. La longitud media de un intrón en los genes humanos es 3,3 kb. Sin embargo, algunos, son mucho más largos: el intrón humano más largo conocido es de 17 106 pb y se encuentra dentro del gen *titin*, que codifica una proteína estructural en las células musculares. En comparación, la mayoría de los exones humanos contienen solo 50-200 pares de bases. El gen humano típico que codifica una proteína de tamaño medio tiene $\approx 50\ 000$ pb de largo, pero más del 95% de la secuencia consiste en intrones y regiones 5' y 3' no codificantes que lo flanquean.

Muchas proteínas grandes en los organismos superiores que tienen dominios repetidos están codificadas por genes que consisten en repeticiones de exones similares separados por intrones de longitud variable. Un ejemplo de esto es la fibronectina, un componente de la matriz extracelular. El gen de la fibronectina contiene múltiples copias de cinco tipos de exones (véase la Fig. 4-16). Tales genes evolucionaron por duplicación en tándem del DNA que codifica el exón repetido, probablemente mediante un entrecruzamiento desigual durante la meiosis como se muestra en la Figura 6-2a.

En los genomas eucariontes se encuentran unidades de transcripción simples y complejas

Las agrupaciones de genes que forma un operón bacteriano comprenden una única **unidad de transcripción** que se transcribe desde un promotor específico en la secuencia de DNA hasta un sitio determinado, produciendo un único transcrito primario. En otras palabras, los genes y las unidades de transcripción suelen identificarse en los procariotes, puesto que una única unidad de transcripción contiene varios genes cuando forman parte de un operón. Por el contrario, la mayoría

(a) Duplicación de exones



(b) Duplicación de genes

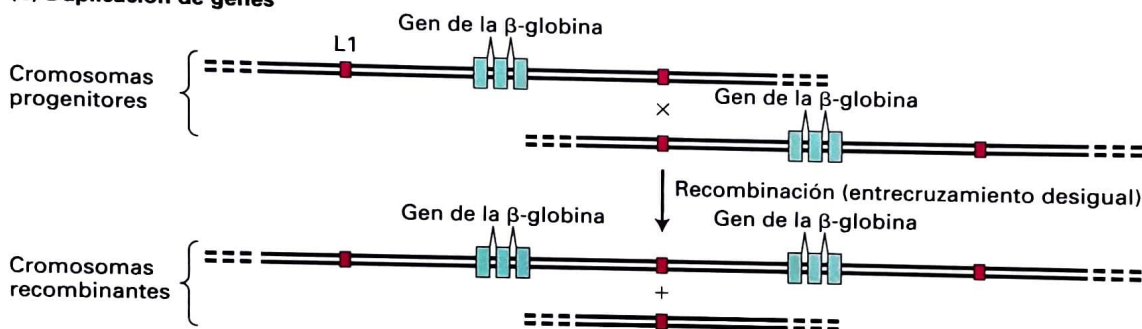


FIGURA 6-2 Duplicación de genes y exones. (a) La duplicación de exones es el resultado del entrecruzamiento desigual durante la meiosis. Cada cromosoma parental (*arriba*) contiene un gen ancestral que contiene tres exones y dos intrones. Las secuencias no codificantes L1 repetidas se extienden 5' y 3' del gen, y también en el intrón entre los exones 2 y 3. Como se verá más adelante en el capítulo, las secuencias L1 han realizado transposiciones en forma repetida a sitios nuevos en el genoma durante el transcurso de la evolución humana, de manera tal que todos los cromosomas están salpicados con ellos. Los cromosomas parentales se muestran desplazados unos de otros, de forma que las secuencias L1 estén alineadas. La recombinação homóloga entre las secuencias L1, como se muestra, podría generar un cromosoma

recombinante donde el gen ahora tenga cuatro exones (dos copias del exón 3) y un cromosoma donde el gen perdió el exón 3. (b) El mismo proceso puede generar duplicaciones de genes completos. Cada cromosoma parental (*arriba*) contiene un gen de β-globina ancestral. Después de la recombinação desigual entre las secuencias L1, las posteriores mutaciones independientes en los genes duplicados resultantes podrían llevar a cambios leves en la secuencia que podrían producir propiedades funcionales levemente diferentes de las proteínas codificadas. El entrecruzamiento desigual también es producto de recombinações raras entre secuencias no relacionadas. (Parte [b] véase D. H. A. Fitch y cols., 1991, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* **88**:7396.)

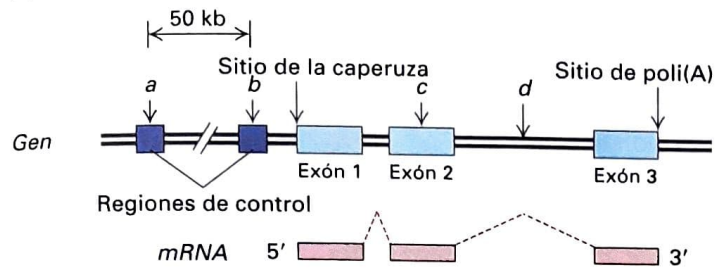
de los genes eucariontes se expresan a partir de unidades de transcripción separadas, y cada mRNA se traduce a una única proteína.

De todas maneras, las unidades de transcripción eucarionte se clasifican en dos tipos, dependiendo del destino del transcrito primario. El transcrito primario producido a partir de una única unidad de transcripción, tal como el que codifica la β-globina (Fig. 4-15), es procesado para dar un único tipo de mRNA, que codifica una única proteína. Las mutaciones en los exones, intrones y las regiones de control de la transcripción pueden afectar la expresión de la proteína codificada por una única unidad de transcripción (Fig. 6-3a). En los seres humanos, las unidades de transcripción simples como las de la globina son raras. Aproximadamente el 90% de las unidades de transcripción humanas son complejas. El transcrito primario de RNA puede procesarse de más de una forma, conduciendo a la formación de mRNA que contienen exones diferentes. Sin embargo, cada mRNA alternativo es monocistónico y se traduce a un único polipéptido, con la traducción iniciada por lo general en el primer AUG en el mRNA. Múltiples mRNA pueden

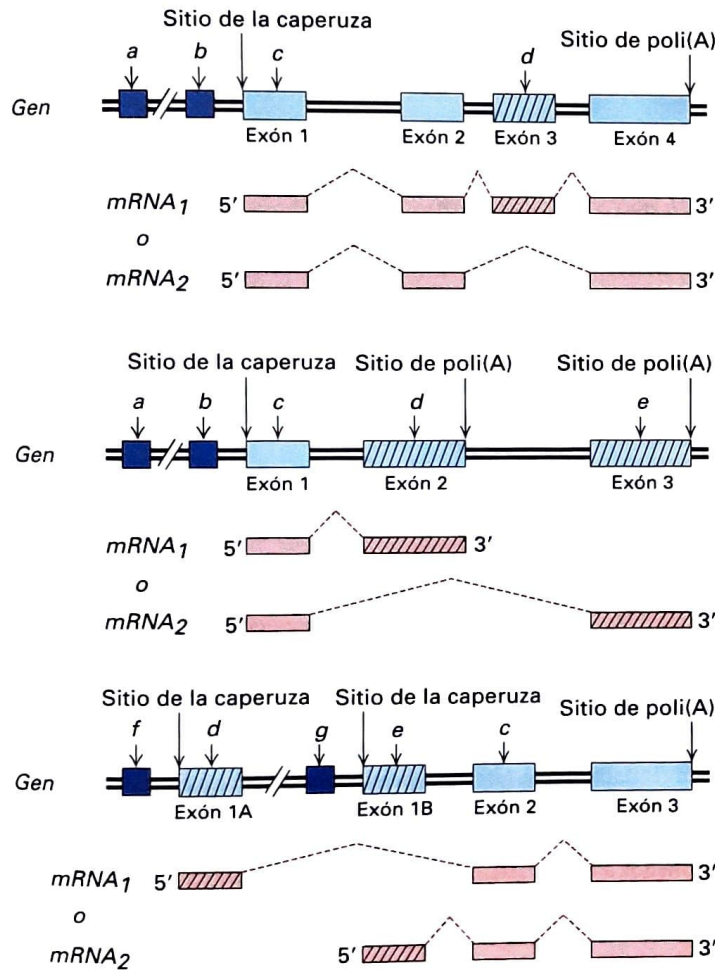
surgir, de tres maneras diferentes, a partir de un transcrito primario, como se muestra en la Figura 6-3b.

Pueden encontrarse ejemplos de los tres tipos de procesamiento alternativo del RNA en los genes que regulan la diferenciación sexual en *Drosophila* (véase la Fig. 8-16). Comúnmente, un mRNA se produce a partir de una unidad de transcripción compleja en algunos tipos de células, y otro diferente en otros tipos celulares. Por ejemplo, el corte y empalme alternativo del transcrito primario de la fibronectina en los fibroblastos y los hepatocitos determina si la proteína incluye o no dominios que la adhieren a la superficie celular (véase la Fig. 4-16). El fenómeno de corte y empalme alternativo expande el número de proteínas codificadas en los genomas de los organismos superiores. Se estima que ≈ 90% de los genes humanos dan origen a mRNA procesados de forma alternativa que codifican proteínas con funciones distintas, como las formas de fibronectina para los fibroblastos y hepatocitos.

(a) Unidad de transcripción simple



(b) Unidades de transcripción compleja



La relación entre una mutación y un gen no siempre es directa cuando se trata de unidades transcripcionales complejas. Una mutación en la región de control o en un exón compartido por mRNA procesados de forma alternativa afectará a todas las proteínas alternativas codificadas por una unidad de transcripción compleja dada. Por el otro lado, las mutaciones en un exón presente en sólo uno de los mRNA alternativos afectará sólo la proteína codificada por ese mRNA. Como se explicó en el Capítulo 5, las **pruebas de complementación genéticas** suelen ser usadas para determinar si dos mutaciones están en el mismo gen o en diferentes (véase la Fig. 5-7). Sin embargo, en la unidad de transcripción compleja mostrada en la Figura 6-3b (medio), las mutaciones *d* y *e* podrían complementarse una con otra en una prueba de complementación genética, incluso si se producen en el mismo gen. Esto es porque un cromosoma con mutación *d* puede ex-

FIGURA 6-3 Unidades de transcripción simples y complejas en eucariontes.

(a) Una unidad de transcripción simple incluye una región que codifica una proteína, que se extiende desde el sitio de la caperuza 5' hasta el sitio de poli(A)3', y las regiones de control asociadas. Los intrones se encuentran entre los exones (rectángulos celestes) y son eliminados durante el procesamiento del transcrito primario (líneas rojas punteadas); por lo tanto, no aparecen en el mRNA monocistrónico funcional. Las mutaciones en la región de control de la transcripción (*a, b*) pueden reducir o evitar la transcripción, disminuyendo o impidiendo la síntesis de la proteína codificada. Una mutación dentro del exón (*c*) puede resultar en una proteína anómala con actividad disminuida. Una mutación dentro de un intrón (*d*) que introduce un nuevo sitio de corte y empalme produce un mRNA procesado de manera anormal que codifica una proteína no funcional. (b) Las unidades de transcripción complejas producen transcritos primarios que pueden ser procesados en formas alternativas. (Arriba). Si un transcrito primario contiene sitios de corte y empalme alternativos, puede ser procesado para dar mRNA con los mismos exones 5' y 3' pero diferentes intrones internos. (Medio) Si un transcrito primario tiene dos sitios de poli(A), puede ser procesado para dar mRNA con exones 3' alternativos. (Abajo) Si se activan promotores alternativos (*f* o *g*) en diferentes tipos celulares, el mRNA₁, producidos en un tipo de célula en la cual *f* está activado, tiene un primer exón (1A) diferente del que tiene el mRNA₂, el cual es producido en un tipo de célula en la cual *g* está activado (y donde se usa el exón 1B). Las mutaciones en las regiones de control (*a* y *b*) y en aquellas designadas *c* dentro de los exones compartidos por los mRNA alternativos afectan a las proteínas codificadas por los mRNA procesados alternativamente. Por el contrario, las mutaciones (designadas *d* y *e*) dentro de los exones únicos de uno de los mRNA procesados alternativamente afectan sólo a la proteína traducida a partir de ese mRNA. Para los genes que se transcriben a partir de diferentes promotores en diferentes tipos de células (arriba), las mutaciones en diferentes regiones de control (*f* y *g*) afectan la expresión sólo en el tipo celular en el cual está activa la región de control.

presar una proteína normal codificada por el mRNA₂ y un cromosoma con la mutación *e* puede expresar una proteína normal codificada por el mRNA₁. Ambos mRNA producidos a partir de este gen podrían estar presentes en una célula diploide que porta dos mutaciones, generando ambos productos proteicos y por lo tanto un fenotipo del tipo salvaje. Sin embargo, un cromosoma con una mutación *c* en un exón común a ambos tipos de mRNA podría no ser complementado por cualquiera de las mutaciones *d* o *e*. En otras palabras, la mutación *c* podría estar en los mismos grupos de complementación que las mutaciones *d* y *e*, ¡incluso a pesar de que *d* y *e* en sí mismos no podrían estar en el mismo grupo de complementación! Dada estas complicaciones con la definición genética de un gen, suele usarse la definición genómica esbozada al comienzo de esta sección. En el caso de los genes que codifican proteínas, un gen es la secuencia de DNA transcrita a partir de un precursor de pre-mRNA, equivalente a una unidad de transcripción, más cualquier otro elemento regulador necesario para la síntesis del transcrito primario. Las diversas proteínas codificadas por los mRNA procesados alternativamente y expresados a partir de un gen se denominan **isoformas**.

Los genes que codifican proteínas pueden estar solos o pertenecer a una familia génica

Las secuencias nucleotídicas dentro del DNA cromosómico se pueden clasificar en base a su estructura y función, como se muestra en el Cuadro 6-1. Examinaremos las propiedades de cada una de las clases, comenzando con los genes que codifican proteínas, los cuales comprenden dos grupos.

En los organismos multicelulares, aproximadamente el 25-50% de los genes que codifican proteínas están representados sólo una vez en el

Clase	Longitud	Número de copias en el genoma humano	Fracción del genoma humano (%)
Genes que codifican proteína	0,5-2 200 kb	≈ 25 000	≈ 5,5* (11,8) [†]
Genes repetidos en tándem			
U2 snRNA	6,1 kb [‡]	≈ 20	< 0,001
rRNA	43 kb [‡]	≈ 300	0,4
DNA repetitivo			
DNA de secuencia única	1-500 bp	Variable	≈ 6
Repeticiones dispersas (elementos móviles de DNA)			
Transposones de DNA	2-3 kb	300 000	3
Retrotransposones con LTR	6-11 kb	440 000	8
Retrotransposones sin LTR			
LINE	6-8 kb	860 000	21
SINE	100-400 bp	1 600 000	13
Seudogenes procesados	Variable	1-≈ 100	≈ 0,4
DNA espaciador no clasificado [§]	Variable	NA	≈ 25

*Las unidades de transcripción completas incluyen intrones

[†]Las unidades de transcripción no incluyen intrones. Total de las regiones codificadoras de proteína (exones) 1,1% del genoma.[‡]Longitud de cada repetición en una secuencia repetida en tándem.[§]Secuencias entre unidades de transcripción que no están repetidas en el genoma; NA = no aplicable.FUENTE: International Human Genome Sequencing Consortium, 2001, *Nature* 409:860 y 2004, *Nature* 431:931.

genoma haploide y por ende se denominan genes *solitarios*. Un ejemplo bien estudiado de un gen codificante de proteína es el gen de la lisozima de pollo. La secuencia de DNA de 15 kb que codifica lisozima de pollo constituye una unidad de transcripción simple que contiene cuatro exones y tres intrones. Las regiones que la flanquean, que se extienden por alrededor de 20 kp en dirección 5' y 3' de la unidad de transcripción, no codifican ningún mRNA detectable. La lisozima, una enzima que escinde los polisacáridos en las paredes celulares bacterianas, es un componente abundante de la proteína de la clara de huevo de gallina y también se encuentra en las lágrimas humanas. Su actividad ayuda a mantener la superficie del ojo y el huevo de la gallina estériles.

Los genes *duplicados* constituyen el segundo grupo de genes que codifican proteínas. Estos son genes con secuencias cercanas pero no idénticas que suelen estar localizadas dentro de los 5-50 kb una de otra. Un conjunto de genes duplicados que codifican proteínas con secuencias aminoácídicas similares pero no idénticas se denomina una **familia de genes**; las proteínas homólogas codificadas, estrechamente emparentadas, constituyen una **familia de proteínas**. Unas pocas familias de proteínas, como las proteincinasas, las inmunoglobulinas de vertebrados y los receptores olfatorios, incluyen cientos de miembros. La mayoría de las familias de proteína, sin embargo, incluyen desde unos pocos miembros hasta 30 o más; los ejemplos más comunes son las proteínas del citoesqueleto, la cadena pesada de miosina, y las α y β -globinas en los vertebrados.

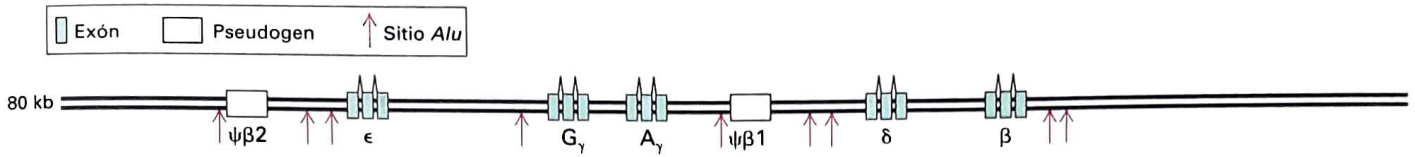
Los genes que codifican las globinas de tipo β son un buen ejemplo de una familia de genes. Como se muestra en la Figura 6-4a, la familia de genes de la globina de tipo β contiene cinco genes funcionales designados β , δ , $A\gamma$, $G\gamma$ y ϵ ; los polipéptidos se designan de manera similar. Dos polipéptidos de globina de tipo β se combinan con dos po-

lipéptidos α -globina idénticos (codificados por otra familia de genes) y cuatro grupos hemo pequeños para formar una molécula de hemoglobina (véase la Fig. 3-13). Todas las hemoglobinas formadas a partir de las diferentes globinas transportan oxígeno en la sangre, pero presentan propiedades algo diferentes, adaptadas a funciones específicas en la fisiología humana. Por ejemplo, las hemoglobinas que contienen cualesquiera de los polipéptidos $A\gamma$ o $G\gamma$ se expresan sólo durante la vida fetal. Debido a que estas hemoglobinas fetales tienen una mayor afinidad por el oxígeno que las hemoglobinas adultas, pueden extraer con eficacia el oxígeno a partir de la circulación materna en la placenta. La menor afinidad por el oxígeno de las hemoglobinas adultas, que se expresan después del nacimiento, permiten una mejor liberación del oxígeno hacia los tejidos, en especial los músculos, que tienen una alta demanda de oxígeno durante el ejercicio.

Los diferentes genes de la β -globina surgieron por duplicación de un gen ancestral, muy probablemente como resultado de un "entrecruzamiento desigual" durante la recombinación meiótica en una célula germinal en desarrollo (óvulo o espermatozoide, véase la Fig. 6-2b). Durante la evolución, las dos copias del gen resultante acumularon mutaciones aleatorias; mutaciones beneficiosas que confirieron algo de refinamiento en la función básica de la hemoglobina de transportar oxígeno se retuvieron por selección natural y provocaron la *deriva de la secuencia*. Se piensa que las duplicaciones génicas repetidas y las posteriores derivas de secuencia generaron los genes tipo globina contemporáneos, observados en los seres humanos y otros mamíferos actuales.

Dos regiones en el agrupamiento de globina tipo β humana contienen secuencias no funcionales, llamadas **pseudogenes**, similares a los de los genes globina de tipo β funcionales (véase la Fig. 6-4a). Los análisis de secuencia demuestran que estos pseudogenes tienen la mis-

(a) Grupo de genes de la β -globina humana (cromosoma 11)



(b) *S. cerevisiae* (cromosoma III)

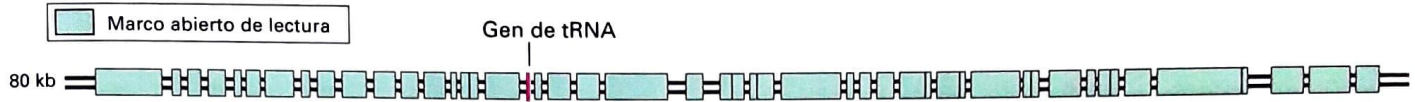


FIGURA 6-4 Comparación de la densidad de genes en los eucariontes superiores e inferiores. (a) En el diagrama del grupo de genes de la β -globina en el cromosoma humano 11, las cajas verdes representan exones de genes de la β -globina relacionados. Los exones procesados juntos para formar un mRNA están conectados por líneas en forma de pico. El *cluster* de genes humano de la β -globina contiene dos pseudogenes (blanco); estas regiones están relacionadas a los genes del tipo globina funcional pero no se transcriben. Cada una de las flechas rojas indica la localización de una secuen-

cia *Alu*, una secuencia repetida no codificante de ≈ 300 pb que es abundante en el genoma humano. (b) En el diagrama del DNA de levadura del cromosoma III, los recuadros verdes indican marcos abiertos de lectura. La mayoría de estas secuencias no codificantes son genes funcionales sin intrones. Nótese la mucha mayor proporción en el DNA humano de secuencias no codificantes sobre secuencias codificantes respecto del DNA de levadura. (Parte [a], véase F. S. Collins y S. M. Weissman, 1984, *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **31**:315. Parte [b], véase S. G. Oliver y col., 1992, *Nature* **357**:28.)

ma estructura aparente intrón-exón que los genes funcionales del tipo β -globina, lo que sugiere que también surgieron por duplicación del mismo gen ancestral. Sin embargo, existió poca presión selectiva para mantener la función de estos genes. En consecuencia, la deriva de secuencias durante la evolución generó secuencias que terminan en la traducción o el bloqueo del procesamiento del mRNA, tornando no funcionales a estas regiones. Debido a que tales pseudogenes son no perjudiciales, permanecen en el genoma y marcan la localización de una duplicación génica que ocurrió en uno de nuestros ancestros.

Las duplicaciones de segmentos de un cromosoma (llamada *duplicación segmentaria*) se produce con bastante frecuencia durante la evolución de plantas y animales multicelulares. Como resultado, una gran fracción de los genes en estos organismos actuales se ha duplicado, permitiendo que el proceso de deriva de secuencias genere familias de genes y pseudogenes. La extensión de la deriva de secuencias entre copias duplicadas del genoma y la caracterización de secuencias homólogas del genoma en organismos relacionados permite una estimación del tiempo en la historia evolutiva de cuándo se produjo la duplicación. Por ejemplo, los genes de la γ -globina fetal humana (G_γ y A_γ) evolucionaron siguiendo la duplicación de una región de 5,5 kb en el locus de la β -globina que incluyó el único gen de la γ -globina en el ancestro común del primate catarrino (monos de Viejo Mundo, monos y seres humanos) y los monos platirrininos (monos del Nuevo Mundo) hace alrededor de 50 millones de años.

Aunque los miembros de las familias génicas de surgimiento relativamente reciente en el tiempo evolutivo, como los genes del locus de la β -globina humana, suelen encontrarse cerca uno de otro sobre el mismo cromosoma, los miembros de las familias génicas también pueden encontrarse en cromosomas diferentes en el mismo organismo. Este es el caso de los genes de la α -globina, que fueron separados de los genes de la β -globina por una translocación cromosómica ancestral. Tanto los genes α - y β -globina y globina evolucionaron a partir de un gen de globina ancestral único que fue duplicado (véase la Fig. 6-2b) para generar los predecesores de los genes globina en los mamíferos. Ambos genes α - y β -globina primordiales luego atravesaron posteriores duplicaciones para generar los genes diferentes de la agrupación de genes que se encuentran en los mamíferos actuales.

Diversas familias de genes distintos codifican las diferentes proteínas que constituyen el citoesqueleto. Estas proteínas están presentes en cantidades que varían en casi todas las células. En los vertebrados, las principales proteínas del citoesqueleto son actina, tubulina y proteínas de los filamentos intermedios como la queratina, que se analizan en los Capítulos 17, 18 y 20. Examinaremos el origen de una de tales familias, la familia de la tubulina, en la Sección 6.5. Aunque la proporción fisiológica para las familias de proteínas del citoesqueleto no es tan evidente como lo es para las globinas, los diferentes miembros de una familia probablemente tienen funciones similares pero sutilmente diferentes según el tipo particular de célula en la cual se expresan.

Los productos génicos más utilizados están codificados por múltiples copias de genes

En los vertebrados e invertebrados, los genes que codifican RNA ribosómico y algunos otros RNA que no codifican proteínas como aquellos involucrados en el corte y empalme del RNA aparecen como *repeticiones en tándem*. Éstas se distinguen de los genes duplicados de las familias de genes en que los múltiples genes repetidos en tándem codifican proteínas idénticas o casi idénticas o RNA funcionales. Con frecuencia, las copias de una secuencia aparecen una después de la otra, en una disposición de cabeza-cola, a lo largo de un segmento de DNA. Dentro de una disposición en tándem de genes de rRNA, cada copia es casi exactamente igual a todas las otras. Aunque las porciones transcritas de genes de rRNA son las mismas en un individuo dado, las regiones espaciadoras no transcritas entre las regiones transcritas pueden variar.

Estos genes de RNA repetidos en tándem son necesarios para satisfacer la demanda celular para sus transcritos. Para comprender por qué, consideremos que durante una generación celular se puede producir un número máximo y fijo de copias de RNA a partir de un único gen cuando el gen está totalmente cargado con moléculas de RNA polimerasas. Si se requiere más RNA de lo que se puede transcribir a partir un gen, son necesarias múltiples copias del gen. Por ejemplo, durante el desarrollo embrionario en los seres

humanos, muchas células embrionarias tienen un tiempo de duplicación de ≈ 24 horas y contienen 5-10 millones de ribosomas. Para producir suficiente rRNA para formar tantos ribosomas, una célula humana embrionaria necesita al menos 100 copias del rRNA de la subunidad mayor y menor, y la mayoría de estas copias debe estar cerca para activarse lo más posible y que la célula se divida cada 24 horas. Es decir, múltiples RNA polimerasas deben transcribir cada gen de rRNA al mismo tiempo (véase la Fig. 8-36). En efecto, todos los eucariontes, incluyendo a las levaduras, contienen 100 o más copias de los genes que codifican rRNA 5S y la subunidad mayor y menor de los rRNA.

También existen copias múltiples de los genes tRNA y los genes que codifican las proteínas histonas. Como se verá más adelante en este capítulo, las histonas se unen y organizan el DNA nuclear. Al igual que la célula requiere múltiples copias de genes de rRNA y tRNA para mantener una traducción eficaz, se necesitan múltiples copias de los genes de histonas para unir la gran cantidad de DNA nuclear producida en cada ronda de replicación. Mientras que los genes de tRNA e histonas suelen presentarse en grupos, en general éstos no se presentan en tándem en el genoma humano.

Los genes que no codifican proteínas codifican RNA funcionales

Además de los genes de rRNA y tRNA, existen cientos de genes adicionales que se transcriben en RNA y que no codifican proteínas, algunos con varias funciones conocidas y muchos cuyas funciones aún se desconocen. Por ejemplo, el **RNA pequeño nuclear (snRNA)** funciona en el proceso de corte y empalme del RNA, y los **RNA nucleolares pequeños (snoRNA)** actúan en el procesamiento del rRNA y la modificación de bases en el nucléolo. La RNasa P funciona en el procesamiento del tRNA, y una gran familia (1 000) de **micro RNA (miRNA)** cortos regula la traducción y la estabilidad de mRNA específicos. Las funciones de estos RNA que no codifican proteínas se analiza en el Capítulo 8. Un RNA que se encuentra en la telomerasa (véase la Fig. 6-47) funciona en el mantenimiento de la secuencia en los extremos de los cromosomas y el RNA 7SL funciona en la importación de las proteínas secretadas y la mayoría de las proteínas de membrana en el retículo endoplasmático (Cap. 13). Estas y otras propiedades de los RNA que no codifican proteínas en el genoma humano y sus funciones, cuando se conocen, se presentan en el Cuadro 6-2.

Cuadro 6-2 RNA conocidos que no codifican proteínas y sus funciones

RNA	Número de genes del genoma humano	Función
rRNAs	≈ 300	Síntesis de proteína
tRNAs	≈ 500	Síntesis de proteína
snRNAs	≈ 80	Corte y empalme de mRNA
U7 snRNAs	1	Procesamiento 3' de mRNA de histona
snoRNAs	≈ 85	Procesamiento de pre-mRNA y modificación de rRNA
miRNAs	$\approx 1\,000$	Regulación de la expresión génica
Xist	1	Inactivación del cromosoma X
7SK	1	Control de la transcripción
RNasa P RNA	1	Procesamiento 5' de tRNA
7SL RNA	3	Secreción de proteína (componente de la partícula de reconocimiento de la señal, SRP)
RNasa MRP RNA	1	Procesamiento de rRNA
Telomerase RNA	1	Molde para la adición de telómeros
Vault RNAs	3	Componentes de las ribonucleoproteínas Vault (RNP), función desconocida
hY1, hY3, hY4, hY 5	≈ 30	Componentes de las ribonucleoproteínas (RNP), función desconocida
H19	1	Desconocida

FUENTE: International Human Genome Sequencing Consortium, 2001, *Nature* **409**:860 y P. D. Zamore y B. Haley, 2005, *Science* **309**:1519.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 6.1

Estructura de genes eucariontes

- En términos moleculares, un gen es la secuencia de DNA completa necesaria para sintetizar una proteína funcional o molécula de RNA. Además de las regiones codificantes (exones), un gen incluye regiones control y, a veces, intrones.
- Una unidad de transcripción simple de eucarionte produce un mRNA monocistónico, que es traducido a una proteína única.
- Una unidad de transcripción compleja de eucarionte es transcrita a un transcrito primario que puede ser procesado en dos o más mRNA monocistónicos diferentes dependiendo de la elección de los sitios de corte o de los sitios de poliadenilación. Una unidad de transcripción compleja con promotores alternativos o sitios de poliadenilación alternativos también genera dos o más mRNA diferentes (véase la Fig. 6-3b).
- Muchas unidades de transcripción compleja (p. ej., el gen de la fibronectina) expresan un mRNA en un tipo de célula y un mRNA alternativo en otro tipo diferente.
- Alrededor de la mitad de los genes que codifican proteínas en el DNA genómico de vertebrados son genes solitarios, que se presentan sólo una vez en el genoma haploide. Los restantes son genes duplicados, que surgen por duplicación de un gen ancestral y subsecuentes mutaciones independientes (véase la Fig. 6-2b). Las proteínas codificadas por una familia génica tienen secuencias aminoácidas homólogas pero no idénticas y exhiben propiedades similares pero levemente diferentes.
- En los vertebrados y los invertebrados, los rRNA están codificados por múltiples copias de genes localizados en agrupamientos en tándem en el DNA genómico. También existen múltiples copias de tRNA y genes de histonas en agrupaciones, pero en general no se presentan en tándem.
- Muchos genes también codifican RNA funcionales que no se traducen a proteína pero no obstante llevan a cabo funciones importantes, como los rRNA, tRNA y snRNA. Entre éstos están los microRNA, posiblemente hasta 1 000 en los seres humanos, cuya importancia biológica en la regulación de la expresión génica se ha apreciado sólo recientemente.

6.2 Organización cromosómica de los genes y el DNA no codificante

Ya revisadas las relaciones entre los genes y las unidades de transcripción, ahora se examinará la organización de los genes en los cromosomas y la relación entre las secuencias de DNA no codificante y las secuencias codificantes.

Los genomas de muchos organismos contienen DNA no funcional

Las comparaciones del DNA cromosómico total por célula en diversas especies sugirieron al principio que mucho del DNA en ciertos organismos no codifica RNA ni tiene una función reguladora evidente. Por

ejemplo, las levaduras, las moscas de la fruta, las gallinas y los seres humanos tienen sucesivamente más DNA en sus conjuntos de cromosomas haploides (12; 180; 1 300; y 3 300 Mb respectivamente), en consonancia con la percepción que tenemos de la complejidad respectiva de estos organismos. Sin embargo, los vertebrados con la mayor cantidad de DNA por célula son los anfibios, que por supuesto son menos complejos que los seres humanos en su estructura y comportamiento. Más sorprendente aún es que las especies de protozoos unicelulares *Amoeba dubia* tienen 200 veces más DNA por célula que los seres humanos. Muchas especies de plantas también tienen considerablemente más DNA por célula que los seres humanos. Por ejemplo, los tulipanes tienen 10 veces más DNA por célula que los seres humanos. El contenido de DNA por célula también varía considerablemente entre especies relativamente cercanas. Todos los insectos o todos los anfibios parecerían ser similarmente complejos, pero la cantidad de DNA haploide en las especies dentro de cada una de estas clases filogenéticas varía por un factor de 100.

Las secuenciación detallada y la identificación de los exones en el DNA cromosómico ha proporcionado evidencia directa de que los genomas de los eucariontes superiores contienen grandes cantidades de DNA no codificante. Por ejemplo, sólo una pequeña porción de la agrupación de genes β -globina de los seres humanos, alrededor de 80 kb de longitud, codifican proteína (véase la Fig. 6-4a). En contraste, un segmento de 80 kb de largo del DNA de la levadura *S. cerevisiae*, un eucarionte unicelular, contiene muchas secuencias codificadoras de proteínas estrechamente espaciadas, sin intrones y con relativamente mucho menos DNA no codificante (véase la Fig. 6-4b). Más aún, en comparación con otras regiones de DNA de vertebrados, la agrupación de genes β -globina es inusualmente rica en secuencias codificadoras de proteínas, y los intrones en los genes globina son considerablemente más cortos que aquellos en la mayoría de los genes humanos. Las proteínas globina abarcan > 50 proteínas del total de proteínas totales que desarrollan los eritrocitos (reticulocitos) y los genes globina se expresan a tasas máximas, p. ej., una RNA polimerasa nueva inicia la transcripción tan pronto como la anterior polimerasa transcribe lo suficientemente lejos del promotor como para permitir que una segunda RNA polimerasa se ligue e inicie. En consecuencia, ha existido una presión evolutiva para que pequeños intrones evolucionen y se conviertan en genes globina que son compatibles con las altas tasas requeridas de transcripción y procesamiento de mRNA globina. Sin embargo, la vasta mayoría de los genes humanos se expresan a niveles mucho más bajos, requiriendo producciones de un mRNA codificado en una escala de tiempo que va de sólo unas decenas de minutos a horas. Por lo tanto, ha existido poca presión selectiva para reducir los tamaños de los intrones en la mayoría de los genes humanos.

La densidad de genes varía mucho en diferentes regiones del DNA cromosómico humano, desde regiones “ricas en genes”, como el grupo de β -globina, hasta grandes “desiertos de genes” pobres en genes. Del 96% del DNA genómico humano que se ha secuenciado, sólo $\approx 1,5\%$ corresponde a secuencias codificadoras de proteínas. En la sección anterior aprendimos que las secuencias intrónicas de la mayoría de los genes humanos son significativamente más largas que las secuencias de exones. Se cree que aproximadamente un tercio del DNA genómico humano es transcrito a precursores de mRNA o a RNA que no codifica proteínas en una célula u otra, pero un 95% de esta secuencia es intrónica. Esto representa un gran fracción del genoma total. Los restantes dos tercios del DNA humano es DNA no codificante entre genes como así también regiones de secuencias de DNA repetidas que constituyen

los centrómeros y los telómeros de los cromosomas humanos. En consecuencia, $\approx 98,5\%$ del DNA humano es no codificante.

Diferentes presiones selectivas durante la evolución pueden explicar, al menos en parte, esta diferencia notable en la cantidad de DNA no funcional en diferentes organismos. Por ejemplo, muchos microorganismos deben competir con otras especies de microorganismos en el mismo ambiente por cantidades limitadas de nutrientes, y una economía metabólica es una característica crucial. Puesto que la síntesis de DNA no funcional (es decir, no codificante) requiere tiempo, nutrientes y energía, presumiblemente existió presión selectiva para perder DNA no funcional durante la evolución de muchos microorganismos de crecimiento rápido como la levadura *S. cerevisiae*. Por otro lado, la selección natural en los vertebrados depende en gran parte de su comportamiento. La energía invertida en la síntesis de DNA es insignificante en comparación con la energía metabólica necesaria para el movimiento de músculos; por consiguiente debe haber existido poca presión selectiva para eliminar el DNA no funcional en los vertebrados. También, el tiempo de replicación de las células en la mayoría de los organismos multicelulares es mucho más largo que en los microorganismos de crecimiento rápido, por lo que hubo poca presión selectiva para la eliminación del DNA no funcional con el fin de permitir la replicación celular rápida.

La mayoría de las secuencias simples de DNA están concentradas en localizaciones cromosómicas específicas

Además de los genes codificadores de proteínas duplicados y de los genes repetidos en tándem, las células eucariontes contienen múltiples copias de otras secuencias de DNA en el genoma, en general denominado como DNA repetitivo (véase el Cuadro 6-1). De los dos tipos principales de DNA repetitivo, el menos prevalente es el **DNA de secuencia simple** o *DNA satélite*, que constituye alrededor del 6% del genoma humano y está compuesto por repeticiones, perfectas o casi perfectas, de secuencias cortas repetitivas. El tipo más común de DNA repetitivo, colectivamente denominado *repeticiones dispersas*, está compuesto de secuencias mucho más largas. Estas secuencias, que consisten en diversos tipos de elementos transponibles, se analizan en la Sección 6.3.

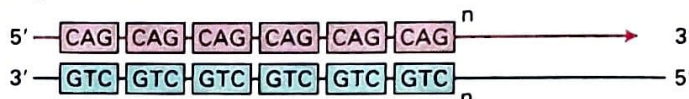
La longitud de cada repetición en el DNA de secuencia simple puede variar de 1 a 500 pares de bases. Los DNA de secuencia simple en los cuales las repeticiones contienen 1-13 pares de bases suelen denominarse *microsatélites*. La mayoría de los DNA microsatélites tiene una longitud de repetición de 1-4 pares de bases y suele presentarse en tándem de 150 repeticiones o menos. Se cree que los microsatélites se han originado por “deslizamientos hacia atrás” de una hebra hija sobre su hebra molde durante la replicación del DNA, de manera tal que la misma secuencia corta es copiada dos veces (Fig. 6-5).

 De manera ocasional, los microsatélites se producen dentro de unidades de transcripción. Algunos individuos nacen con un número mayor de repeticiones en genes específicos respecto de los observados en la población general, presumiblemente debido a un deslizamiento de la hebra hija durante la replicación del DNA en una célula germinal a partir de la cual se desarrolla. Se ha encontrado que tales microsatélites expandidos causan al menos 14 tipos diferentes de enfermedades neuromusculares, según el gen en el cual se producen. En algunos casos los microsatélites expandidos se comportan como una

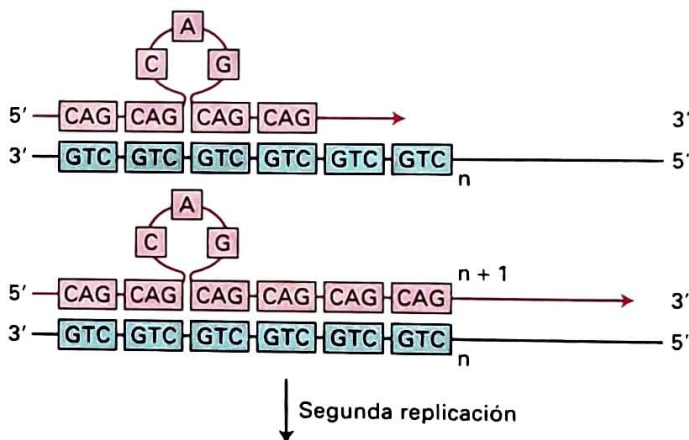
mutación recesiva debido a que interfieren con la expresión o función del gen codificado. Pero en los tipos más comunes de enfermedades asociadas con las repeticiones expandidas de microsatélites, como la *enfermedad de Huntington* y la *distrofia miotónica tipo 1*, las repeticiones expandidas se comportan como mutaciones dominantes. En algunas enfermedades producidas por repeticiones de microsatélites, las repeticiones de tripletes se producen dentro de una región codificante, lo que deviene en la formación de polímeros largos de un solo aminoácido que podrían agregarse con el tiempo en células neuronales de vida larga y eventualmente interferir con la función celular normal. Por ejemplo, la expansión de la repetición CAG en el primer exón del gen de Huntington lleva a la síntesis de largos segmentos de poliglutamina que con el paso de las décadas forma agregados tóxicos que dan como resultado la muerte celular neuronal en la enfermedad de Huntington.

Las repeticiones expandidas patológicas pueden también producirse en las regiones no codificantes de algunos genes, donde se cree

(a) replicación normal

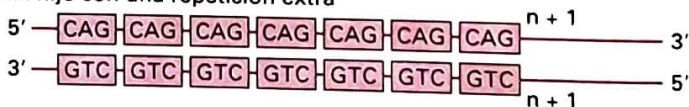


(b) deslizamiento hacia atrás



(c) Segunda replicación

DNA hijo con una repetición extra



DNA hijo normal

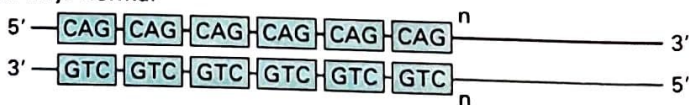


FIGURA 6-5 Generación de repeticiones microsatélites por deslizamiento hacia atrás de la hebra hija naciente durante la replicación del DNA. Si durante la replicación (a), la hebra hija naciente se “desliza” hacia atrás respecto de la hebra molde por una repetición, se añade una copia de una nueva repetición a la hebra hija cuando la replicación del DNA continúa (b). Una copia extra de la repetición forma un bucle de una hélice en la hebra hija de la molécula hija de DNA dúplex. Si este de una hélice hebra no es eliminado por las proteínas de la reparación del DNA antes de la siguiente ronda de replicación de DNA (c), la copia extra de la repetición se añade a una de las moléculas doble hebra de DNA hija.

que funcionan como mutaciones dominantes debido a que interfieren con el procesamiento del RNA de un subgrupo de mRNA en las células musculares y neuronas donde los genes afectados se expresan. Por ejemplo, en los pacientes con distrofia miotónica tipo 1, los transcritos del gen *DMPK* contienen entre 50 a 1 500 repeticiones de la secuencia CUG en la región 3' no traducida, en comparación con las 5 a 34 repeticiones en los individuos normales. Se cree que el segmento extendido de las repeticiones CUG en los individuos afectados forma largas horquillas de RNA (véase la Fig. 4-9) que unen y secuestran proteínas de unión al RNA nuclear que normalmente regulan el corte y empalme alternativo de RNA de un subgrupo de pre-mRNA esenciales para la función de las células nerviosas y musculares. ■

La mayoría de las secuencias simples de DNA satélite están compuestas de repeticiones de 14-500 pares de bases en agrupamientos en tándem de 20-100 kb. Estudios de hibridaciones in situ con cromosomas en metafase localizaron estas secuencias simples de DNA en regiones específicas. Mucho de este DNA se encuentra cerca de los centrómeros, las regiones cromosómicas discretas que se adhieren a los microtúbulos del uso durante la mitosis y la meiosis (Fig. 6-6). Los experimentos en la levadura *Schizosaccharomyces pombe* indican que estas secuencias son necesarias para formar una estructura de cromatina especializada denominada *heterocromatina centromérica*, necesaria

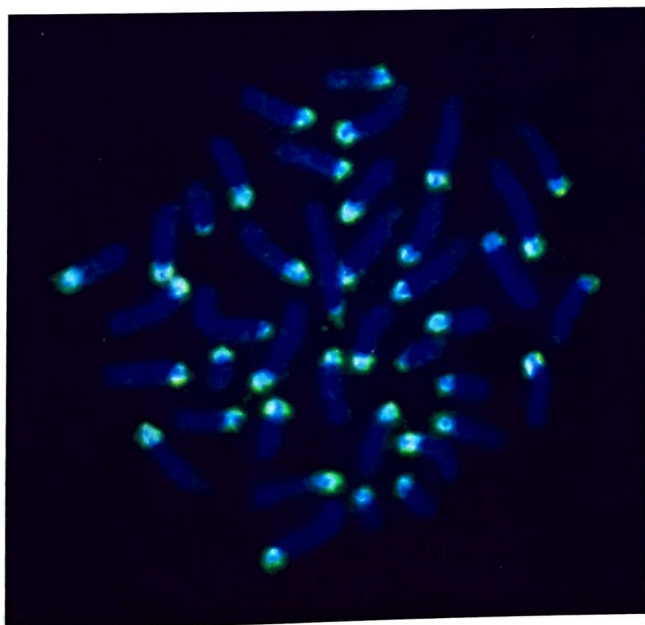


FIGURA EXPERIMENTAL 6-6 El DNA de secuencia simple está localizado en el centrómero en los cromosomas murinos. El DNA de secuencia simple purificado de células se copió in vitro usando DNA polimerasa I de *E. coli* y dNTP marcados con fluorescencia para generar una "sonda" de DNA fuertemente marcada para el DNA murino de secuencia simple. Los cromosomas de células murinas se fijaron y se desnaturalizaron en un portaobjeto para microscopio, y luego el DNA cromosómico se hibridó in situ a la sonda marcada (luz azul). El portaobjetos fue teñido con DAPI, un colorante que se une al DNA, para visualizar la longitud completa de los cromosomas (azul oscuro). La microscopía muestra que la sonda de secuencia simple se hibrida principalmente a un extremo de los cromosomas murinos telocéntricos (p. ej., cromosomas en los cuales los centrómeros se localizan cerca de un extremo). (Cortesía de Sabine Mal, Ph.D., Manitoba Institute of Cell Biology, Canadá.)

para la segregación adecuada de cromosomas a las células hijas durante la mitosis. El DNA de secuencia simple también se encuentra en largas repeticiones en tándem en los extremos de los cromosomas y evita su unión a los extremos de otras moléculas de DNA, como se analizará luego en la última sección de este capítulo.

Las huellas genéticas dependen de las diferencias en la longitud de los DNA de secuencia simple

Dentro de una especie, las secuencias nucleotídicas de las unidades de repetición compuestas por agrupamientos en tándem de DNA de secuencia simple están altamente conservadas entre los individuos. En contraste, el número de repeticiones, y por consiguiente la longitud de los agrupamientos en tándem de secuencia simple que contienen la misma unidad de repetición, es bastante variable entre los individuos. Se cree que estas diferencias en la longitud resultan del entrecruzamiento desigual dentro de regiones de DNA de secuencia simple durante la meiosis. Como consecuencia de este entrecruzamiento desigual, las longitudes de algunos arreglos en tándem son únicas en cada individuo.

En los seres humanos y otros mamíferos, algunas de estas secuencias de DNA existen en regiones relativamente cortas de 1 a 5 kb, compuestas de 20-50 unidades de repetición, cada una conteniendo $\approx$ 14-100 pares de bases. Estas regiones se denominan *minisatélites*, en contraste a los *microsatélites* formados por repeticiones en tándem de 1-13 pares de bases. Incluso se pueden detectar leves diferencias en las longitudes totales de varios *minisatélites* de diferentes individuos mediante *Southern blot* (véase la Fig. 5-26). Esta técnica fue explotada en la primera aplicación de las *huellas genéticas* (*DNA fingerprinting*), que se desarrolló para detectar *polimorfismos* de DNA (p. ej., diferencias en secuencia entre individuos de las mismas especies, Fig. 6-7). En la actualidad, se suele usar la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Fig. 5-20), más sensitiva, en las pruebas genéticas forenses. En la actualidad suelen analizarse las secuencias de DNA *microsatélite* de repeticiones cortas en tándem de cuatro bases en $\approx$ 30-50 copias. El número exacto de repeticiones varía generalmente en los dos cromosomas homólogos del individuo donde se presentan (uno heredado del padre y el otro de la madre) y en el cromosoma Y de los varones. Una mezcla de pares de cebadores de PCR que hibridan con secuencias únicas que flanquean 13 de estas repeticiones cortas en tándem y una repetición corta en tándem del cromosoma Y se utilizan para amplificar DNA en una muestra. La mezcla resultante de longitudes de productos PCR es única en la población humana, excepto para gemelos idénticos. El uso de los métodos de PCR permite el análisis de cantidades diminutas de DNA, y los individuos pueden distinguirse más precisa y eficazmente que por los métodos convencionales de huellas dactilares.

El DNA espaciador no clasificado ocupa una porción significativa del genoma

Como lo muestra el Cuadro 6.1, $\approx$ 25% del DNA humano se encuentra entre unidades de transcripción y no se repite en otro lugar del genoma. Mucho de este DNA probablemente surgió a partir de elementos transponibles ancestrales que acumularon tantas mutaciones en el transcurso del tiempo evolutivo que ya no pueden ser reconocidas como surgidas de esta fuente (véase la Sección 6.3). Las regiones de control de la transcripción del orden de las 50-200 pares de bases de longitud que ayudan a regular la transcripción desde promotores distantes también

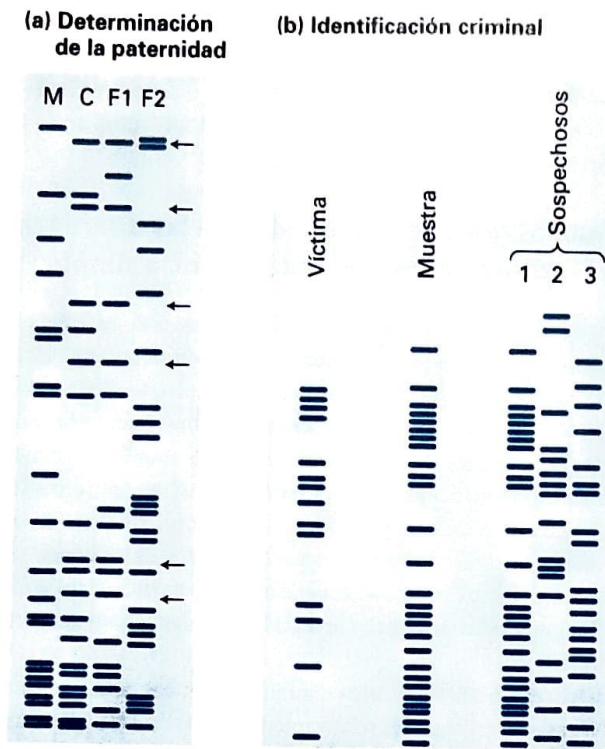


FIGURA 6-7 Distinción de individuos por huella genética. (a) En este análisis de paternidad, se determinaron diversas longitudes de repeticiones minisatélite mediante análisis de Southern blot del DNA genómico digerido con enzimas de restricción e hibridación con una sonda para una secuencia compartida por diversas secuencias de microsátélites. Esto generó patrones multibanda hipervariables para cada individuo llamados "huellas genéticas". La línea M muestra el patrón de las bandas de los fragmentos de restricción usando el DNA de la madre; C, usando el DNA del niño; y F1 y F2 usando DNA de dos padres potenciales. El niño tiene longitudes de repeticiones minisatélites heredadas de la madre o de F1, lo que demuestra que F1 es el padre. Las flechas indican los fragmentos de restricción de F1, pero no de F2, que se encuentran en el DNA del niño. (b) En estas "huellas dactilares de DNA" de un espécimen aislado a partir de una víctima de violación y de tres hombres sospechosos del crimen, está claro que las longitudes de las repeticiones de los microsátélites en el espécimen coinciden con el sospechoso 1. El DNA de la víctima no se incluyó en el análisis para asegurar que el DNA del espécimen no se contaminara con el DNA de la víctima. (De T. Strachan y A. P. Read, *Human Molecular Genetics* 2, 1999, John Wiley & Sons.)

se presenta en estos segmentos largos de DNA espaciador no clasificado. En algunos casos, las secuencias de este DNA aparentemente no funcional se han conservado durante la evolución de todos modos, lo que indica que pueden llevar a cabo una función significativa que aún no se entiende. Por ejemplo, podrían contribuir a las estructuras de los cromosomas analizados en la Sección 6-7.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 6.3

Organización cromosómica de los genes y DNA no codificante

• En los genomas de procariontes y de la mayoría de los eucariontes inferiores, que contienen pocas secuencias no funcionales, las regiones no codificantes están densamente organizadas a lo largo del DNA genómico.

• Por el contrario, los genomas de vertebrados y plantas superiores contienen muchas secuencias que no codifican para RNA ni tienen funciones reguladoras. Mucho de este DNA no funcional está compuesto de secuencias repetidas. En los seres humanos, sólo alrededor del 1,5% del total del DNA (los exones) realmente codifica proteínas o RNA funcional.

• La variación en la cantidad de DNA no funcional en el genoma de varias especies es en gran medida responsable de la falta de una relación consistente entre la cantidad de DNA en los cromosomas haploides de un animal o planta y su complejidad filogenética.

• El DNA genómico eucarionte consiste en tres clases principales de secuencias: genes que codifican proteínas y RNA funcional, DNA repetitivo y DNA espaciador (véase el Cuadro 6-1).

• Los DNA de secuencia simple, secuencias cortas repetidas en agrupamientos en tándem largos, se localizan preferentemente en los centrómeros, telómeros y localizaciones específicas dentro de los brazos de cromosomas particulares.

• La longitud de un agrupamiento en tándem particular de secuencia simple es bastante variable entre los individuos de una especie, probablemente debido al entrecruzamiento desigual durante la meiosis. Las diferencias en las longitudes de algunos agrupamientos en tándem forman la base para la huella genética (véase la Fig. 6-7).

6.3 Elementos transponibles (móviles) de DNA

Las repeticiones dispersas, el segundo tipo de repeticiones de DNA en los genomas eucariontes, están compuestos de una gran cantidad de copias de relativamente pocas familias de secuencias (véase el Cuadro 6-1). También conocidas como *DNA moderadamente repetitivo* o *DNA de repetición intermedia*, estas secuencias están diseminadas a lo largo de todos los genomas de mamíferos y constituyen $\approx 25\text{-}50\%$ del DNA de mamífero ($\approx 45\%$ del DNA humano).

Debido a que las repeticiones dispersas tienen la capacidad única de "moverse" en el genoma, colectivamente se las denomina como *elementos transponibles de DNA* o *elementos móviles de DNA* (se usan estos dos términos indistintamente). Aunque los elementos transponibles de DNA originalmente se descubrieron en los eucariontes, también se encuentran en procariontes. El proceso por el cual estos elementos son copiados e insertados en un sitio nuevo en el genoma es la **transposición**. Los elementos transponibles de DNA son esencialmente simbiontes moleculares que en la mayoría de los casos parecen no tener otra función específica en la biología de sus organismos huéspedes, y que existen sólo para mantenerse a sí mismos. Por esta razón, Francis Crick se refirió a ellos como "DNA egoísta".

Cuando la transposición se produce en las células germinales, las secuencias que se transponen a sus sitios nuevos son pasadas a las generaciones siguientes. De esta forma, los elementos móviles se han multiplicado y acumulado lentamente en los genomas eucariontes durante el transcurso del tiempo evolutivo. Puesto que los elementos móviles se eliminan muy lentamente de los genomas eucariontes, ahora constituyen una porción significativa de los genomas de muchos eucariontes.

Los elementos móviles no sólo son la fuente de mucho DNA presente en nuestros genomas, sino que ellos también proporcionan un segundo mecanismo, además de la recombinación meiótica, para producir reordenamientos de DNA cromosómico durante la evolución (véase la Fig. 6-2). Una razón para esto es que durante la transposición de un elemento móvil particular, a veces también se moviliza el DNA adyacente (véase la Fig. 6-19 más adelante en éste capítulo). La transposición se produce raramente: en los seres humanos, alrededor de una transposición de la línea germinal por cada ocho individuos. Puesto que el 98,5% de nuestro DNA es no codificante, la mayoría de las transposiciones no tienen efectos deletéreos. Pero con el tiempo cumplieron una parte esencial de la evolución de los genes que tienen múltiples exones y de los genes cuya expresión se restringe a tipos celulares específicos o a períodos del desarrollo. En otras palabras, a pesar de que los elementos transponibles probablemente evolucionaron como simbioses celulares, ellos han tenido una función importante en la evolución de organismos multicelulares complejos.

La transposición también se produce dentro de una célula somática; en este caso la secuencia que se transpone sólo se transmite a las células hijas derivadas de esa célula. En casos raros, dicha transposición de célula somática puede llevar a una mutación de la célula somática con efectos fenotípicos perjudiciales, por ejemplo, la inactivación de un gen supresor de tumores (Capítulo 24). En esta sección, describimos primero la estructura y los mecanismos de transposición de los principales tipos de elementos transponibles de DNA y luego consideramos sus probables funciones en la evolución.

El movimiento de los elementos móviles involucra un intermediario de DNA o RNA

Bárbara McClintock descubrió los primeros elementos móviles mientras hacía experimentos genéticos clásicos en maíces (maíz) durante la década de 1940. Ella caracterizó entidades genéticas que podían moverse hacia adentro y hacia afuera de los genes, cambiando el fenotipo de los granos de maíz. Sus teorías fueron muy controvertidas hasta que se descubrieron elementos móviles similares en las bacterias, donde se caracterizaron como secuencias de DNA específicas y se descifraron las bases moleculares de su transposición.

Una investigación sobre los elementos móviles progresó y se encontró que se dividen en dos categorías: (1) aquellos que se transponen directamente como DNA y (2) aquellos que se transponen a través de un intermediario de RNA transcrito a partir de un elemento móvil por una RNA polimerasa y luego convertido nuevamente en DNA doble hebra mediante una **transcriptasa inversa** (Fig. 6-8). Los elementos móviles que transponen directamente como DNA suelen denominarse **transposones de DNA** o simplemente **transposones**. Los transposones de DNA eucarionte se escinden ellos mismos en un lugar del genoma, dejando ese sitio y moviéndose a otro. Los elementos móviles que se transponen a sitios nuevos en el genoma a través de un intermediario de RNA se denominan **retrotransposones**. Los retrotransposones sintetizan una copia de RNA de sí mismos e introducen esta copia nueva en otro sitio del genoma, mientras que también permanece en la localización original. El movimiento de los retrotransposones es análogo al

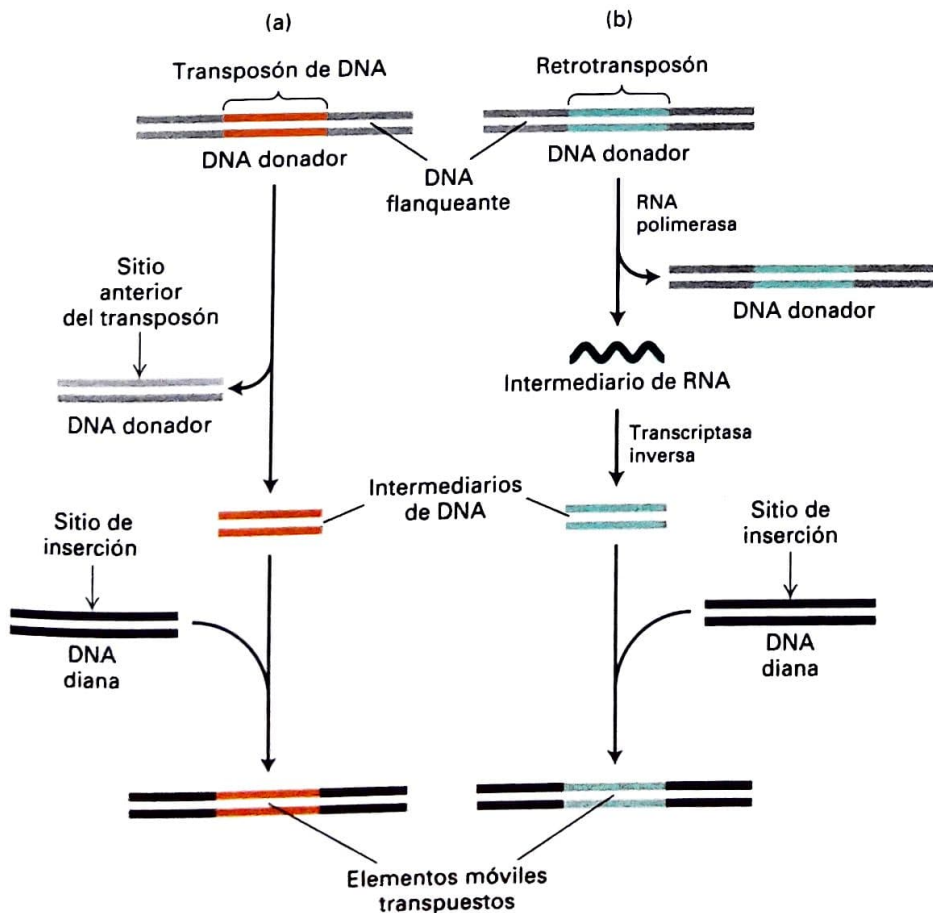


FIGURA 6-8 Dos clases principales de elementos móviles. (a) Los transposones de DNA eucarionte (naranja) se mueven a través de un intermediario de DNA, el cual es cortado a partir del sitio donante. (b) Los retrotransposones (verde) se transcriben primero a una molécula de RNA, que luego mediante transcripción inversa se convierte en DNA doble hebra. En ambos casos, el intermediario de DNA doble hebra se integra al DNA del sitio diana para completar el movimiento. Así los transposones de DNA se mueven por un mecanismo de corte y empalme.

proceso infeccioso de los retrovirus (Fig. 4-49). De hecho, los retrovirus pueden pensarse como retrotransposones que desarrollaron genes que codifican cubiertas virales, permitiendo así que ellos se transpongan entre células. Los retrotransposones fueron posteriormente clasificados en base a sus mecanismos específicos de transposición. Para resumir, los transposones de DNA pueden pensarse como un mecanismo de transposición por "corte y empalme", mientras que los retrotransposones se mueven por un mecanismo de "copia y empalme" en el cual la copia es un intermediario de RNA.

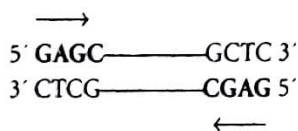
Los transposones de DNA están presentes en los procariontes y los eucariontes

La mayoría de los elementos móviles en las bacterias se transponen directamente como DNA. Por el contrario, la mayoría de los elementos móviles en los eucariontes son retrotransposones, pero también existen los transposones de DNA eucarionte. De hecho, los elementos móviles originales descubiertos por Bárbara McClintock son transposones de DNA.

Secuencias de inserción bacteriana Los primeros conocimientos moleculares de los elementos móviles provienen del estudio de ciertas mutaciones de *E. coli* causadas por la inserción espontánea de una secuencia de DNA, $\approx 1-2$ kb de longitud, dentro de la mitad de un gen. Estos segmentos de DNA insertados se denominan *secuencias de inserción* o *elementos IS*. Hasta ahora, se han encontrado más de 20 diferentes elementos IS en *E. coli* y otras bacterias.

La transposición de un elemento IS es un acontecimiento muy raro, que sólo tiene lugar en una de 10^5-10^7 células por generación, dependiendo del elemento IS. A menudo, las transposiciones inactivan genes esenciales, matando la célula huésped y el elemento IS que transporta. Por lo tanto, las altas tasas de transposición probablemente podrían conducir a una tasa de mutación demasiado grande para que el organismo huésped sobreviva. Sin embargo, como los elementos IS se transponen más o menos en forma aleatoria, algunas secuencias de transposición entran en regiones no esenciales del genoma (p. ej., regiones entre genes), permitiendo que la célula sobreviva. A una tasa muy baja de transposición, la mayoría de las células huéspedes sobreviven y por consiguiente propagan el elemento simbiótico IS. Los elementos IS también se pueden insertar en plásmidos o virus lisogénicos y por ende se transfieren a otras células. De esta forma, los elementos IS pueden transponer a los cromosomas de las células vírgenes.

La estructura general de los elementos IS se esquematiza en Fig. 6-9. En cada extremo de una secuencia de inserción, invariablemente hay una *repetición invertida* de ≈ 50 pares de bases. En una repetición invertida, la secuencia 5' $\rightarrow$ 3' en una hebra se repite en la otra, de la siguiente forma:



Entre las repeticiones invertidas se encuentra una región que codifica la *transposasa*, una enzima necesaria para la transposición del elemento IS a un sitio nuevo. La transposasa se expresa muy raramente, lo que explica la frecuencia muy baja de transposición. Una caracterís-

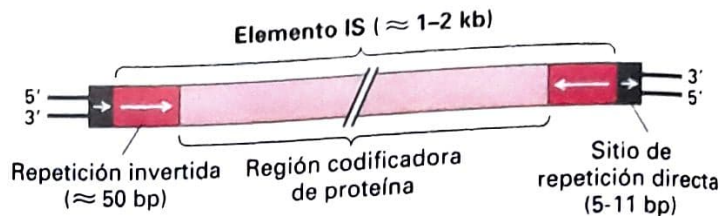


FIGURA 6-9 Estructura general de los elementos IS bacterianos. La región central relativamente larga de un elemento IS, que codifica una o dos enzimas necesarias para la transposición, está flanqueada por una repetición invertida en cada extremo. Las secuencias de las repeticiones invertidas son casi idénticas, pero están orientadas en direcciones opuestas. La secuencia es característica de un elemento IS particular. Las repeticiones *directas* cortas 5' y 3' (opuestas a las *invertidas*) no se transponen con el elemento de inserción; por el contrario, ellas son secuencias de sitio de inserción que se duplican, con una copia en cada extremo, durante la inserción de un elemento móvil. La longitud de las repeticiones directas es constante para un elemento IS dado, pero sus secuencias dependen del sitio de inserción y por lo tanto varían con cada transposición del elemento IS. Las flechas indican la orientación de la secuencia. Las regiones en este diagrama no están en escala; las regiones codificantes constituyen la mayor parte de la longitud de un elemento IS.

tica importante de los elementos IS es la presencia de una *secuencia de repetición directa* corta, que contiene 5-11 pares de bases, dependiendo del elemento IS, inmediatamente adyacente a ambos extremos del elemento insertado. La *longitud* de la repetición directa es característica de cada tipo de elemento IS, pero su *secuencia* depende del sitio diana donde una copia particular del elemento IS se inserta. Cuando se compara la secuencia de un gen mutado que contiene un elemento IS insertado con la secuencia salvaje del gen, sólo se encuentra una copia de la secuencia de repetición directa en el gen salvaje. La duplicación de esta secuencia del sitio diana para crear la segunda repetición directa adyacente en un elemento IS se produce durante el proceso de inserción.

Como se describe en la Figura 6-10, la transposición de un elemento IS se produce por mecanismo de "corte y empalme". La transposasa realiza tres funciones en este proceso: (1) corta en forma precisa el elemento IS en el DNA donante, (2) realiza cortes escalonados en una secuencia corta en el DNA diana y (3) liga el extremo 3' del elemento IS a los extremos 5' del DNA donador cortado. Finalmente, una DNA polimerasa de la célula huésped llena los espacios libres de las hebras simple para generar las repeticiones directas cortas que flanquean a los elementos IS y la DNA ligasa une los extremos libres.

Transposones de DNA eucarionte El descubrimiento original de McClintock de los elementos móviles provino de la observación de mutaciones espontáneas en el maíz que afectan a la producción de enzimas necesarias para sintetizar antocianina, un pigmento púrpura en los granos de maíz. Los granos mutantes son blancos y los granos salvajes son púrpuras. Una clase de estas mutaciones se revierte con alta frecuencia, mientras que la segunda clase de mutaciones no se revierte a menos que se encuentre en presencia de la primera clase de mutaciones. McClintock denominó *elemento activador* (Ac) al agente responsable de la primera clase de mutaciones y *elementos de disociación* (Ds) al responsable de la segunda clase debido a que ellos también tendían a estar asociados con las rupturas cromosómicas.

Muchos años después de los descubrimientos pioneros de McClintock, la clonación y la secuenciación revelaron que los elementos Ac son

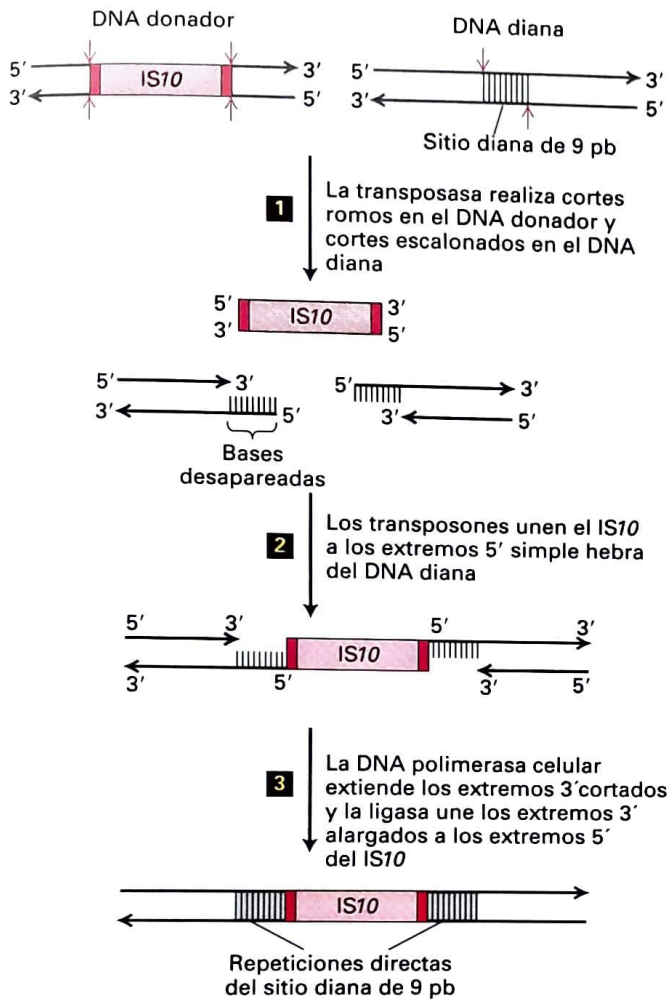


FIGURA 6-10 Modelo de transposición de las secuencias de inserción bacteriana. Paso 1: transposasa, que está codificada por el elemento IS (IS10 en este ejemplo), escinde ambas hebras en el DNA donante al lado de las repeticiones invertidas (rojo oscuro), libera el elemento IS10. En un sitio diana aleatorio, la transposasa realiza cortes escalonados en el DNA diana. En este caso de IS10, los dos cortes están separados por 9 pb. Paso 2: la unión de los extremos 3' del elemento IS escindido a los sitios escalonados en el DNA diana también es catalizada por la transposasa. Paso 3: las brechas de 9 pb del DNA de una hélice en el intermediario resultante son llenadas por la DNA polimerasa celular; finalmente, la DNA ligasa celular forma los enlaces fosfodiéster 3'→5' entre los extremos 3' de las hebras de DNA diana extendidas y los extremos 5' de las hebras del IS10. Este proceso da como resultado la duplicación de la secuencia del sitio diana a cada lado del elemento IS insertado. Nótese que la longitud del sitio diana y el IS10 no están en escala. (Véase H. W. Benjamin y N. Kleckner, 1989, *Cell* 59:373; y 1992, *Prog. Nucl. Acid Res. USA* 89:4648.)

equivalentes a los elementos IS bacterianos. Al igual que los elementos IS, ellos contienen secuencias repetitivas terminales invertidas que flanquean la región codificante para una transposasa, la cual reconoce las repeticiones terminales y cataliza la transposición a un sitio nuevo en el DNA. Los elementos Ds son formas truncadas de los elementos Ac en los cuales se pierde una porción de la secuencia que codifica la transposasa. Debido a que no codifica una transposasa funcional, un elemento Ds no puede moverse por sí mismo. Sin embargo, en las plantas que llevan el elemento Ac y por ende expresan una transposasa funcional,

los elementos Ds se pueden transponer debido a que retienen las repeticiones terminales invertidas reconocidas por la transposasa.

Desde el trabajo inicial de McClintock acerca de los elementos móviles en el maíz, se han identificado transposones en otros eucariontes. Por ejemplo, aproximadamente la mitad de todas las mutaciones espontáneas observadas en *Drosophila* se deben a la inserción de elementos móviles. Aunque la mayoría de los elementos móviles en *Drosophila* funcionan como retrotransposones, al menos uno (el elemento P) funciona como un transpón de DNA, que se mueve mediante un mecanismo similar al utilizado por las secuencias de inserción bacterianas. Los métodos actuales para la construcción transgénica de *Drosophila* dependen del alto nivel de expresión de la transposasa del elemento P, genéticamente modificada, y del uso de las repeticiones terminales invertidas del elemento P para la transposición, como se analizó en el Capítulo 5 (véase la Fig. 5-22).

La transposición de DNA mediante el mecanismo de corte y empalme puede dar como resultado un incremento en el número de copias de un transpón si se produce durante la fase S del ciclo celular, cuando ocurre la síntesis del DNA. Un aumento en el número de copias sucede cuando el DNA donador proviene de una de las dos moléculas de DNA hijas en una región de un cromosoma que se ha replicado y el DNA diana está en la región que aún no se ha replicado. Cuando la replicación del DNA se completa hacia el final de la fase S, también se replica el DNA diana en su nueva localización, dando como resultado un incremento neto en el número total de estos transposones en la célula (Fig. 6-11). Cuando esto ocurre durante la fase S que precede a la meiosis, una de las cuatro células germinales producidas contiene la copia extra del transpón. La repetición de este proceso en el transcurso del tiempo evolutivo produjo la acumulación de grandes cantidades de transposones de DNA en los genomas de algunos organismos. El

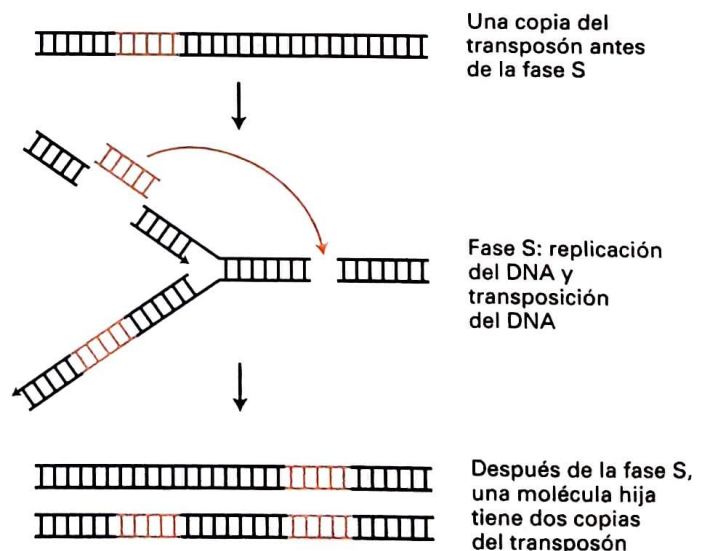


FIGURA 6-11 Mecanismo para aumentar el número de copia de los transposones de DNA. Si un transpón de DNA que se transpone mediante un mecanismo de corte y empalme (véase la Fig. 6-10) se transpone, durante la fase S, a partir de una región del cromosoma que se ha replicado a una región que no se ha replicado, entonces, cuando se complete la replicación cromosómica, uno de los dos cromosomas hijos tendrá un incremento neto de una inserción de transpón.

DNA humano contiene alrededor de 300 000 copias de transposones de DNA delecionados y de longitud completa, que asciende al $\approx 3\%$ del DNA humano. Como se verá brevemente, este mecanismo puede llevar a la transposición del DNA genómico como así también a la del transposón en sí mismo.

Los retrotransposones LTR se comportan como los retrovirus intracelulares

Los genomas de todos los eucariontes estudiados, desde las levaduras hasta los seres humanos, contienen retrotransposones, elementos móviles de DNA que se transponen a través de un intermediario de RNA utilizando una transcriptasa inversa (véase la Fig. 6-8b). Estos elementos móviles se dividen en dos categorías principales, los que contienen **repeticiones terminales largas (LTR)** y los que carecen de ellas. Los retrotransposones LTR, que se analizan aquí, son comunes en las levaduras (p. ej., elementos Ty) y en *Drosophila* (p. ej., elementos copia). Aunque menos abundantes en mamíferos que los retrotransposones no LTR, los retrotransposones LTR no obstante constituyen $\approx 8\%$ del DNA genómico humano. En los mamíferos, los retrotransposones que carecen de los LTR son el tipo de elemento móvil más común; estos se describen en la siguiente sección.

La estructura general de los retrotransposones LTR que se encuentran en los eucariontes se describe en la Figura 6-12. Además de las repeticiones directas cortas 3' y 5' típicas de todos los transposones, estos retrotransposones están marcados por la presencia de los LTR que flanquean la región central que codifica proteína. Estas repeticiones terminales directas largas, que contienen $\approx 250\text{--}600$ pares de bases dependiendo del tipo de retrotransposón LTR, son características del DNA retroviral y son cruciales para el ciclo de vida de los retrovirus. Además de compartir LTR con los retrovirus, los retrotransposones LTR codifican todas las proteínas de los tipos más comunes de retrovirus, excepto para las proteínas de la envoltura. Al carecer de estas proteínas de la envoltura, los retrotransposones LTR no pueden separarse por gemación de la célula huésped e infectar otras células; sin embargo, se pueden transponer a sitios nuevos en el DNA de sus células huésped. Debido a sus relaciones claras con los retrovirus, esta clase de retrotransposones suele llamarse *elementos similares a retrovirus*.

Un paso clave en el ciclo de vida retroviral es la formación del RNA genómico retroviral a partir del DNA retroviral integrado (véase la Fig. 4-49). Este proceso sirve como modelo para la generación del intermediario de RNA durante la transposición de los retrotransposones LTR.

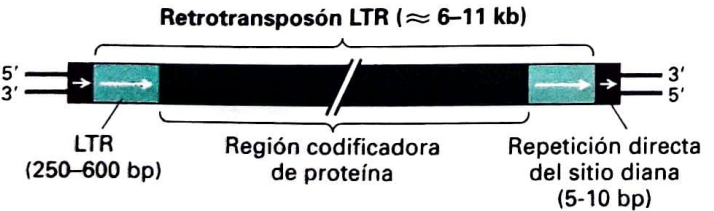


FIGURA 6-12 Estructura general de los retrotransposones LTR eucariontes. La región central que codifica proteína está flanqueada por repeticiones terminales largas (LTR), que son repeticiones directas específicas de elemento. Al igual que otros elementos móviles, los retrotransposones integrados tienen repeticiones directas cortas del sitio diana en cada extremo. Nótese que las diferentes regiones no están dibujadas a escala. La región que codifica proteína constituye el 80% o más de un retrotransposón y codifica la transcriptasa inversa, la integrasa, y otras proteínas retrovirales.

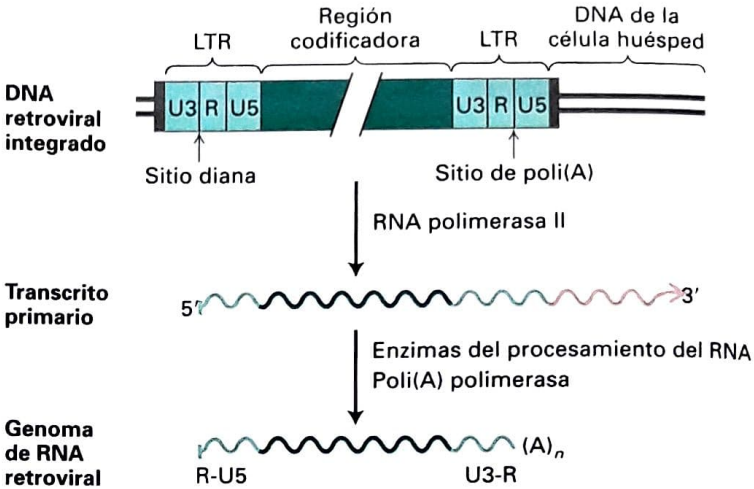
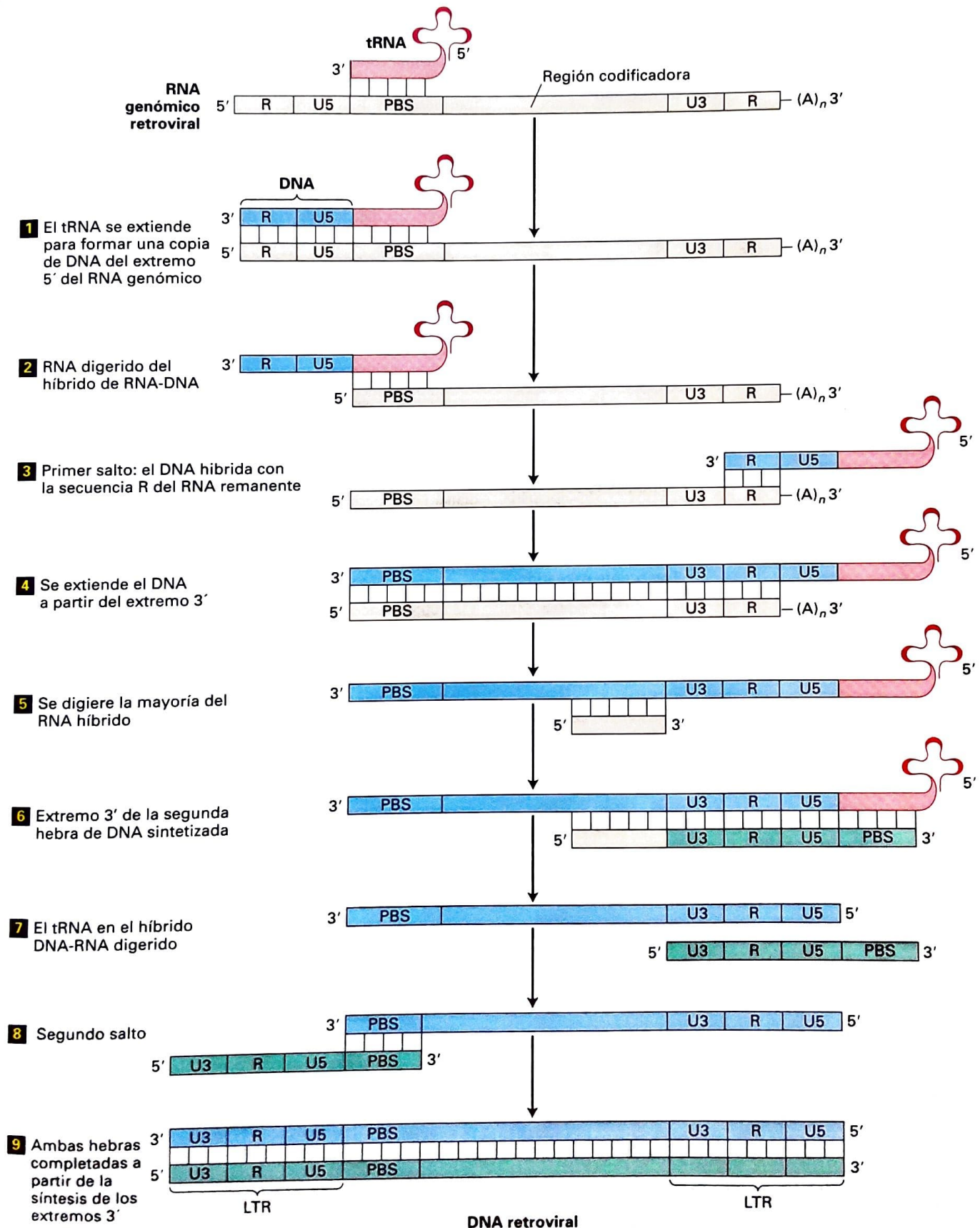


FIGURA 6-13 Generación de RNA genómico retroviral a partir de DNA retroviral integrado. El LTR de la izquierda dirige a la RNA polimerasa celular para iniciar la transcripción en el primer nucleótido de la región R de la izquierda. El Transcrito primario resultante se extiende más allá del LTR de la derecha. El LTR de la derecha, ahora presente en el transcrito primario de RNA, dirige las enzimas celulares para cortar el transcrito primario en el último nucleótido de la región R de la derecha y para añadir una cola de poli(A), dando lugar a un genoma RNA retroviral con la estructura mostrada en la parte superior de la Figura 6-14. Se piensa que un mecanismo similar genera el intermediario de RNA durante la transposición de los retrotransposones. Las secuencias cortas de repetición directa (negro) del DNA del sitio diana se generan durante la integración del DNA retroviral en el genoma de la célula huésped.

Como se describe en la Figura 6-13, el LTR retroviral de la izquierda funciona como un promotor que dirige la RNA polimerasa de la célula huésped para iniciar la transcripción en el nucleótido 5' de la secuencia R. Después de que se ha transcrito el DNA retroviral completo corrientemente abajo, la secuencia de RNA correspondiente al LTR hacia la derecha dirige las enzimas de procesamiento del RNA de la célula huésped para que corte el transcrito primario y añada una cola de poli(A) en el extremo 3' de la secuencia R. El genoma de RNA retroviral resultante, que carece de un LTR completo, sale del núcleo y es empaquetado en un virión que se desprende por gemación desde la célula huésped.

Después de que un retrovirus infecta a una célula, la transcripción inversa de su genoma de RNA, realizada por la transcriptasa inversa co-

FIGURA 6-14 Modelo para la transcripción inversa del RNA genómico retroviral en DNA. En este modelo, una serie complicada de nueve acontecimientos genera una copia de DNA de doble hebra del genoma de RNA simple hebra de un retrovirus. El RNA genómico se empaqueta en el virión con un tRNA celular específico de retrovirus hibridado a una secuencia complementaria cerca de su extremo 5' llamado sitio de unión al cebador (PBS). El RNA retroviral tiene una secuencia terminal corta de repetición directa (R) en cada extremo. La reacción global es llevada a cabo por la transcriptasa inversa, que cataliza la polimerización de desoxirribonucleótidos. La Rnasa H digiere la hebra de RNA en un híbrido de DNA-RNA. El proceso entero produce una molécula de DNA doble hebra que es más larga que el molde de RNA y tiene una repetición terminal larga (LTR) en cada extremo. Las diferentes regiones no se muestran a escala. El PBS y las regiones R son, en realidad, mucho más cortas que las regiones U5 y U3, y la región codificante central es mucho más larga que las otras regiones. (Véase E. Gilboa y cols., 1979, *Cell* 18:93)



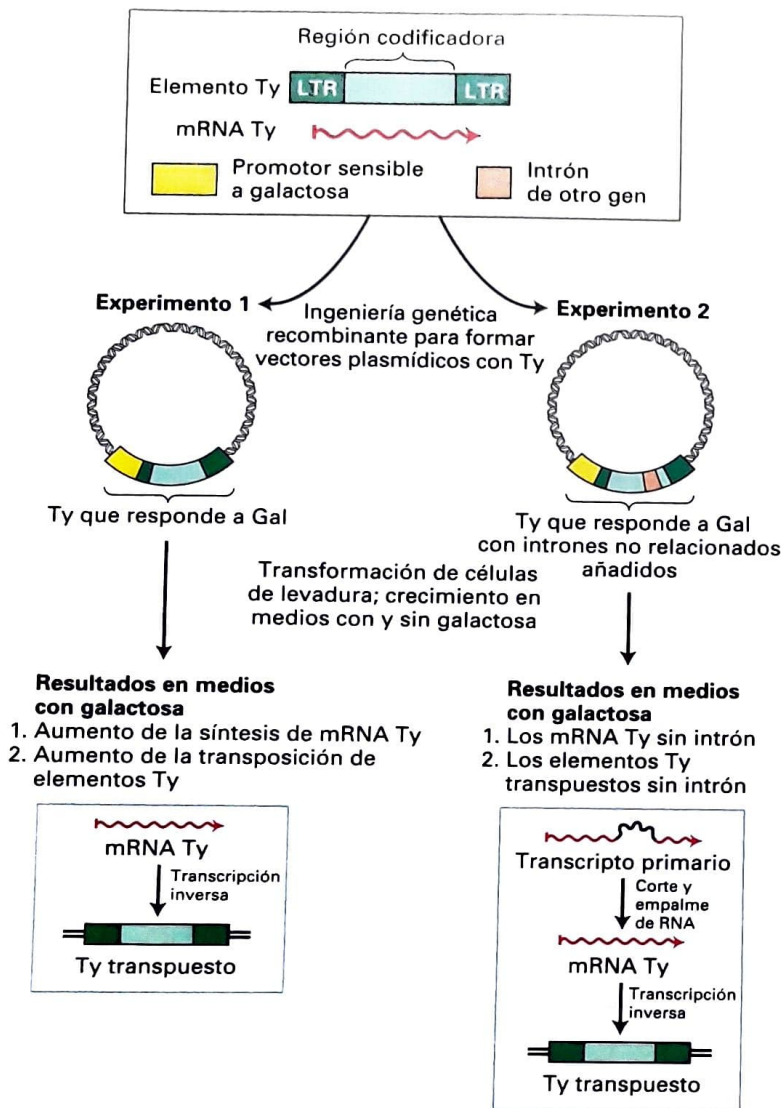


FIGURA EXPERIMENTAL 6-15 El elemento Ty de la levadura se transpone a través de intermediarios de RNA. Cuando las células de levadura son transformadas con un plásmido conteniendo Ty, el elemento Ty se puede transponer a sitios nuevos, aunque normalmente esto se produce a una velocidad baja. Usando los elementos dibujados en la parte superior, los investigadores diseñaron dos vectores de plásmidos recombinantes diferentes conteniendo elementos Ty adyacentes a un promotor sensible a galactosa. Estos plásmidos fueron transformados en células de levadura, que fueron cultivadas en un medio con y sin galactosa. En el experimento 1, el cultivo de células en un medio con galactosa dio como resultado muchas más transposiciones que en el medio sin galactosa, lo cual indica que es necesaria la transcripción a un intermediario de mRNA para la transposición de Ty. En el experimento 2, se insertó un intrón de un gen de levadura no relacionado dentro de la región putativa codificante de proteína del elemento recombinante Ty que responde a galactosa. La ausencia observada del intrón en los elementos Ty transpuestos es evidencia fuerte de que la transposición involucra un intermediario de mRNA a partir del cual se eliminó el intrón por corte y empalme del RNA, como se describe en el recuadro a la derecha. Por el contrario, los transposones de DNA eucarionte, al igual que el elemento Ac del maíz, contienen intrones dentro del gen transponible, lo cual indica que no transponen mediante un intermediario de RNA. (véase J. Roeder y col., 1985, *Cell* 40:491.)

El elemento Ty de la levadura, producido por el retrovirus, produce un DNA doble hebra que contiene los LTR completos (Fig. 6-14). Esta síntesis de DNA ocurre en el citosol. El DNA doble hebra con un LTR en cada extremo es transportado entonces hacia el interior del núcleo en un complejo con una integrasa, otra enzima codificada por los retrovirus. Las integrasas retrovirales están estrechamente relacionadas a las transposasas codificadas por los retrotransposones y usan un mecanismo similar para insertar el DNA retroviral doble hebra en el genoma de la célula huésped. En este proceso, se generan repeticiones directas cortas de la secuencia del sitio diana en cualquiera de los extremos de la secuencia insertada de DNA viral. Aunque el mecanismo de transcripción inversa es complejo, es un aspecto crucial del ciclo de vida de los retrovirus. El proceso genera la 5'LTR completa que funciona como promotor para la iniciación de la transcripción precisa en el nucleótido 5' de la secuencia R, mientras que la 3'LTR completa funciona como un sitio de poli(A) que conduce a la poliadenilación precisa en el nucleótido 3' de la secuencia R. En consecuencia, no se pierden nucleótidos a partir de un retrotransposón LTR puesto que atraviesa sucesivos ciclos de inserción, transcripción, transcripción inversa, y nuevamente inserción en un sitio nuevo.

Como se mencionó antes, los retrotransposones LTR codifican la transcriptasa inversa y la integrasa. Por analogía con los retrovirus, estos elementos móviles se mueven por mecanismo de "corte y empalme", donde la transcriptasa inversa convierte una copia de RNA del elemento donante en DNA, que es insertado por la integrasa en un sitio diana. Los experimentos que se describen en la Figura 6-15 proporcionan fuerte evidencia del papel de un intermediario de RNA en la transposición de los elementos Ty en levaduras.

Los retrotransposones LTR más comunes en los seres humanos se denominan ERV, por retrovirus endógenos. La mayoría de las más de 443 000 secuencias de DNA relacionadas a ERV en el genoma humano consiste sólo en LTR aislados. Estas derivan del DNA proviral de longitud completa mediante recombinación homóloga entre dos LTR, que producen delección de la secuencia retroviral interna. Las LTR aisladas como estas no pueden transponerse a una posición nueva en el genoma, pero la recombinación entre LTR homólogas en diferentes posiciones en el genoma probablemente han contribuido a los reordenamientos de DNA cromosómico llevando a las duplicaciones génicas y exónicas, a la evolución de proteínas con combinaciones nuevas de exones, y, como se verá en el Capítulo 7, a la evolución de complejos control de la expresión génica.

Los retrotransposones sin LTR transponen mediante un mecanismo diferente

Los elementos móviles más abundantes en los mamíferos son los retrotransposones sin LTR, a veces llamados *retrotransposones no virales*. Estas secuencias de DNA moderadamente repetitivas forman dos clases en los genomas de mamíferos: los *elementos dispersos largos* (LINE, por *long interspersed elements*) y los *elementos dispersos cortos* (SINE, por *short interspersed elements*). En los seres humanos, los LINE de longitud completa tienen ≈ 6 kpb de largo y los SINE tienen ≈ 300 pb de largo (véase el Cuadro 6-1). Las secuencias repetidas con las características de los LINE se han observado en protozoos, insectos y plantas, pero debido a razones desconocidas son particularmente abundantes en los genomas de los mamíferos. Los SINE también se encuentran principalmente en el DNA de mamíferos. Durante la evolución se han acumulado grandes cantidades de LINE y SINE en los eucariontes superiores mediante la

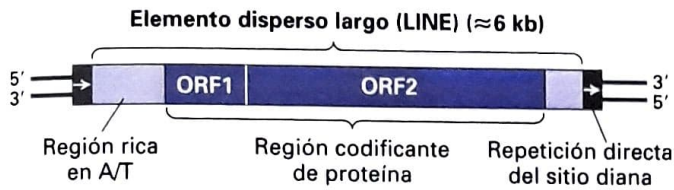


FIGURA 6-16 Estructura general de un LINE, un retrotransposón sin LTR. Los DNA de mamífero contienen dos clases de retrotransposones sin LTR, los LINE y los SINE. Aquí se describe la estructura de los LINE. La longitud de las repeticiones directas del sitio diana varían entre copias del elemento en los diferentes sitios en el genoma. Aunque la longitud completa de la secuencia L1 es de ≈ 6 kb de largo, en más de un 90% de los sitios donde se halla este elemento están ausentes cantidades variables del extremo izquierdo. El marco abierto de lectura más corto (ORF1), de ≈ 1 kb de largo, codifica una proteína de unión al RNA. El ORF2 más largo, de ≈ 4 kb de largo, codifica una proteína bifuncional con transcriptasa inversa y actividad de endonucleasa de DNA. Nótese que los LINE carecen de las repeticiones terminales largas que se encuentran en los retrotransposones con LTR.

copias repetidas de secuencias en unas pocas posiciones en el genoma y la inserción de las copias en posiciones nuevas.

LINE El DNA humano contiene tres familias principales de secuencias LINE que son similares en sus mecanismos de transposición pero que difieren en sus secuencias: L1, L2 y L3. Sólo los miembros de la familia L1 se transponen en el genoma humano contemporáneo. Aparentemente no hay copias funcionales restantes de L2 o L3. Las secuencias LINE están presentes en $\approx 900\,000$ sitios en el genoma humano, representando un asombroso 21% del DNA humano total. En la Figura 6-16 se representa la estructura general de una secuencia LINE completa. Los LINE suelen estar flanqueados por repeticiones directas cortas, la característica de los elementos móviles, y contiene dos marcos abiertos de lecturas (ORF) largos. El ORF1, ≈ 1 kb de largo, codifica una proteína de unión al RNA. El ORF2, ≈ 4 kb de largo, codifica una proteína que tiene una región larga de homología con las transcriptasas inversas de los retrovirus y los retrotransposones LTR, pero también exhibe actividad DNA endonucleasa.

 La evidencia para la movilidad de los elementos L1 provino del análisis de DNA clonado de seres humanos con ciertas enfermedades genéticas como la hemofilia y la distrofia miotónica. Se encontró que el DNA de estos pacientes contenía mutaciones resultantes de la inserción de un elemento L1 en un gen, mientras que dicho elemento no se encontraba dentro del gen en cualquiera de los dos progenitores. Alrededor de 1 en 600 mutaciones que causan enfermedades significativas en los seres humanos se debe a las transposiciones L1 o SINE que son catalizadas por proteínas codificadas por L1. Experimentos posteriores similares a los recién descritos con los elementos Ty de levaduras (véase la Fig. 6-5) confirmaron que los elementos L1 se transponen a través de un intermediario de RNA. En estos experimentos se introdujo un intrón en un elemento L1 murino clonado y el elemento L1 recombinante fue transformado en forma estable a células cultivadas de hámster. Después de varias divisiones celulares, se detectó en las células un fragmento amplificado por PCR correspondiente al elemento

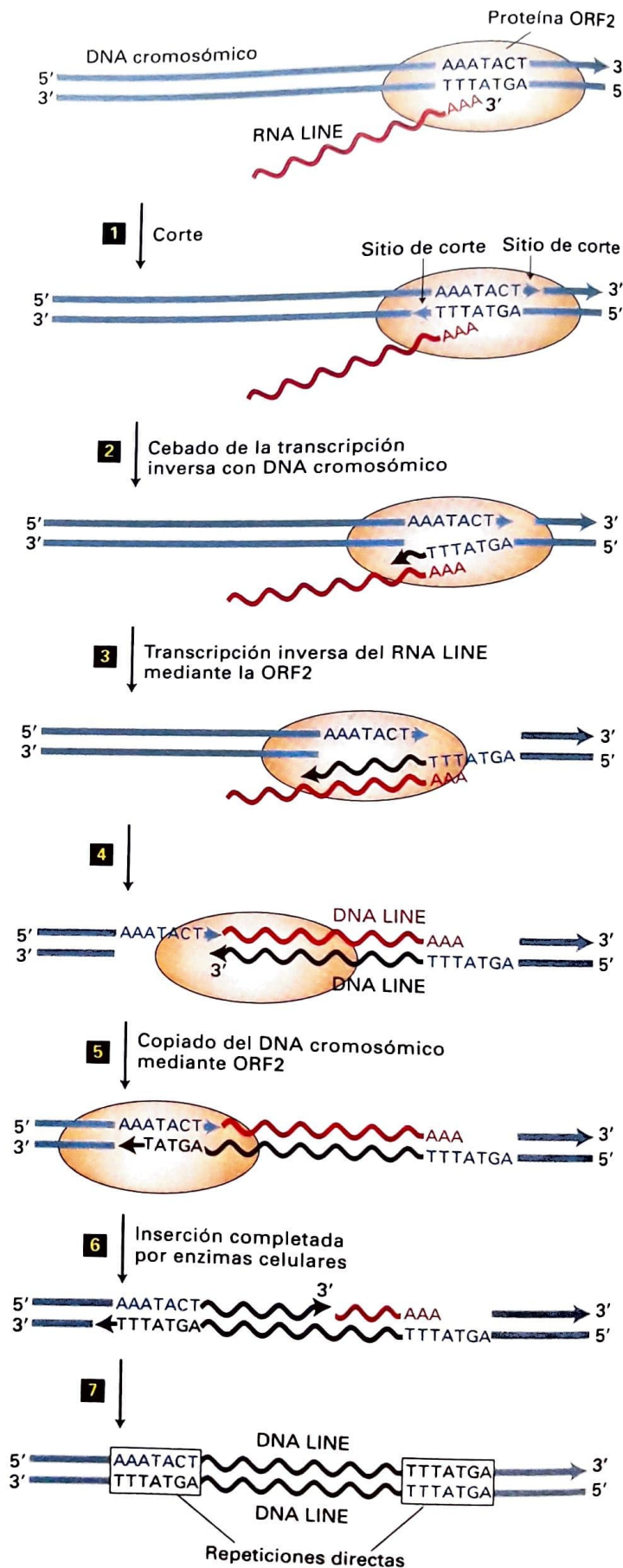
L1 pero que carecía del intrón insertado. Este hallazgo sugiere fuertemente que, con el transcurso del tiempo, el elemento L1 recombinante que contenía el intrón insertado se había transpuesto a sitios nuevos en el genoma del hámster a través de intermediarios de RNA que sufrieron corte y empalme de RNA para eliminar el intrón. ■

Puesto que los LINE no contienen LTR, sus mecanismos de transposición a través de intermediarios de RNA difieren de los retrotransposones LTR. Las proteínas ORF1 y ORF2 se traducen a partir de un RNA LINE. Estudios *in vitro* indican que la transcripción mediante la RNA polimerasa está dirigida por secuencias promotoras en el extremo izquierdo del DNA LINE integrado. El RNA LINE es poliadenilado por el mismo mecanismo que poliadenila otros mRNA. Luego el RNA LINE es exportado al citosol, donde es traducido a las proteínas ORF1 y ORF2. Posteriormente las múltiples copias de las proteínas ORF1 se unen al RNA LINE y la proteína ORF2 se une a la cola de poli(A). Después, el RNA LINE es transportado nuevamente al núcleo como un complejo con las proteínas ORF1 y ORF2, y en el núcleo la ORF2 realiza la transcripción inversa a DNA LINE. El mecanismo involucra la escisión escalonada del DNA celular en el sitio de inserción, seguido por el cebado de la transcripción inversa por el DNA celular escindido resultante como se detalla en la Figura 6-17. El proceso completo da como resultado la inserción de una copia del retrotransposón LINE original en un sitio nuevo en el DNA cromosómico. Se genera una repetición directa corta en el sitio de la inserción debido a la escisión escalonada de las dos hebras de DNA cromosómico.

Como ya se mencionó, la forma DNA de un retrotransposón LTR se sintetiza a partir de su forma RNA en el citosol usando un tRNA celular como un cebador para la transcripción inversa de la primera hebra de DNA (véase la Fig. 6-14). Luego la doble hebra de DNA resultante con las repeticiones terminales largas es transportada al núcleo, donde se integra al DNA cromosómico mediante una integrasa codificada por el retrotransposón. Por el contrario, la forma DNA de un retrotransposón sin LTR se sintetiza en el núcleo. La síntesis de la primera hebra del DNA retroviral sin LTR por la ORF2, una transcriptasa inversa, es cebada por el extremo 3' del DNA cromosómico escindido, que forma apareamiento de bases con la cola de poli(A) del RNA retroviral que carece de LTR (véase la Fig. 6-17, paso 2). Como su síntesis es cebada por el extremo cortado de un cromosoma y la síntesis de la otra hebra del retrotransposón de DNA que carece de LTR es cebada por el extremo 3' del DNA cromosómico al otro lado del corte inicial en el DNA cromosómico (paso 6), el mecanismo de síntesis produce la integración del DNA del retrotransposón carente de LTR. No se necesita una integrasa para insertar el DNA del retrotransposón que carece de LTR.

La gran mayoría de los LINE en el genoma humano están truncados en sus extremos 5', lo cual sugiere que la transcripción inversa termina antes de completarse y resultan fragmentos con extensiones variables desde donde se inserta la cola de poli(A). Debido a este acortamiento, el tamaño promedio de los elementos LINE es de sólo alrededor de 900 pares de bases, aun cuando la secuencia de longitud completa es de ≈ 6 kb de largo. Los elementos LINE truncados, una vez formados, probablemente no se transponen más debido a que carecen de un promotor para formar el intermediario de RNA en la transposición. Además del hecho de que la mayoría de las inserciones L1 están truncadas, casi todos los elementos de longitud completa contienen mutaciones en codones de terminación y de corrimiento de marcos de lectura en las ORF 1 y ORF2; estas mutaciones probablemente se han acumulado en la mayoría de las secuencias LINE a lo largo del tiempo

FIGURA 6-17 Mecanismo propuesto de la transcripción inversa y la integración de los DNA LINE. Sólo se representa la proteína ORF2. El DNA recién sintetizado se muestra en negro. Las proteínas ORF1 y ORF2, producidas por la traducción del RNA LINE en el citoplasma, se unen al RNA LINE y lo transportan al núcleo. Paso **1**: en el núcleo, ORF2 realiza cortes escalonados en el sitio diana rico en AT del DNA, generando los extremos 3'OH del DNA indicados por las flechas azules. Paso **2**: los extremos 3' las hebras de DNA ricas en T se hibridan a las colas de poli(A) del RNA LINE y ceban la síntesis de DNA mediante la ORF2. Paso **3**: la ORF2 extiende la hebra de DNA usando el RNA LINE como molde. Pasos **4** y **5**: cuando la síntesis de la hebra de DNA LINE de abajo alcanza el extremo 5' del molde de RNA LINE, la ORF2 extiende el DNA LINE recién sintetizado usando como molde el DNA celular de la hebra de arriba generado por la escisión escalonada inicial de la ORF2. Paso **6**: una DNA polimerasa celular extiende el extremo 3' de la hebra de arriba generado por el corte escalonado inicial de la ORF2, usando como molde la hebra de abajo del DNA LINE recién sintetizado. El RNA LINE es digerido a medida que la DNA polimerasa extiende el DNA de la hebra superior, al igual que ocurre durante la eliminación del cebador de RNA de la hebra rezagada durante la síntesis del DNA celular (Fig. 4-33). Paso **7**: los extremos 3' de las hebras de DNA recién sintetizadas son unidos a los extremos 5' de las hebras de DNA celular tal como sucede en la síntesis de DNA celular de la hebra rezagada. (Adaptado de D. D. Luan y cols., 1993, *Cell* 72:595.)



evolutivo. En consecuencia, sólo 0,01% de las secuencias LINE en el genoma humano son de longitud completa, con marcos abiertos de lectura para ORF1 y ORF2, lo cual representa ≈ 60 -100 en total.

SINE La segunda clase más abundante de elementos móviles en el genoma humano, los SINE, constituye $\approx 13\%$ del total del DNA humano. Con una longitud que varía de 100 a 400 pares de bases, los retrotransposones no codifican proteínas, pero la mayoría contiene una secuencia 3' rica en A/T similar a la de los LINE. Los SINE se transcriben mediante la misma RNA polimerasa nuclear que transcribe los genes que codifican los tRNA, los rRNA 5S y otros pequeños RNA estables. Muy probablemente, las proteínas ORF1 y ORF2 expresadas a partir de los LINE de longitud completa median entre la transcripción inversa y la integración de los SINE por el mecanismo descrito en la Figura 6-17. En consecuencia, los SINE pueden visualizarse como parásitos de los simbiosis LINE, compitiendo con los RNA LINE por la unión y la transcripción inversa/integración de la ORF1 y ORF2 codificada por los LINE.

Los SINE aparecen en alrededor de 1,6 millones de sitios en el genoma humano. De éstos, $\approx 1,1$ millón son *elementos Alu*, denominados así porque la mayoría de ellos contiene un único sitio de reconocimiento para la enzima de restricción *AluI*. Los elementos *Alu* exhiben considerable homología de secuencia con el RNA 7SL y probablemente evolucionaron a partir de éste, un RNA citosólico en un complejo ribonucleoproteico denominado la partícula de reconocimiento de la señal. Esta abundante partícula ribonucleoproteína citosólica ayuda a dirigir ciertos polipéptidos a las membranas del retículo endoplasmático (Capítulo 13). Los elementos *Alu* están dispersos a través de todo el genoma humano en sitios donde su inserción no interrumpe la expresión génica: entre genes, entre intrones y en las regiones 3' no traducidas de algunos

mRNA. Por ejemplo, nueve elementos *Alu* se localizan dentro del grupo de genes β -globina humana (véase la Fig. 6-4a). Se estima que se produce un evento nuevo de retrotransposición sin LTR en la línea germinal en uno de cada ocho individuos, $\approx 40\%$ involucra elementos L1 y el $\approx 60\%$ involucra SINE, de los cuales el 90% son elementos *Alu*.

Del mismo modo que otros elementos móviles, la mayoría de las SINE han acumulado mutaciones desde el tiempo de su inserción en la línea germinal de un antiguo ancestro de los seres humanos modernos. Al igual que los LINE, muchos SINE también están truncados en sus extremos 5'.

En el DNA genómico se encuentran otros RNA retrotranspuestos

Además de los elementos móviles presentados en el Cuadro 6-1, copias de DNA de una amplia variedad de mRNA parecen haberse integrado al DNA cromosómico. Puesto que estas secuencias carecen de intrones y no están flanqueadas por secuencias similares a las de las copias funcionales de genes, está claro que las mismas no son simplemente duplicaciones de genes que devinieron en no funcionales, convirtiéndose en pseudogenes, como se analizó anteriormente (Fig. 6-4a). Por el contrario, estos segmentos de DNA parecen ser copias de retrotransposones de RNA ya procesado y poliadenilado. En comparación con genes normales que codifican mRNA, estos segmentos integrados en general suelen contener múltiples mutaciones, que se piensa se han acumulado puesto que sus mRNA primero atravesaron una transcripción inversa y de forma aleatoria se integraron al genoma de una célula germinal en un ancestro antiguo. Estas copias genómicas no funcionales de mRNA se denominan *pseudogenes procesados*. La mayoría de los *pseudogenes procesados* están flanqueados por repeticiones directas cortas, lo cual avala la hipótesis de que se generaron por acontecimientos de retrotransposición raros que involucraron mRNA celular.

Otras repeticiones dispersas que representan copias mutantes o parciales de genes que codifican RNA nucleares pequeños (snRNA) y tRNA se encuentran en genomas de mamíferos. Al igual que los pseudogenes procesados derivados de los mRNA, estas copias de genes de RNA pequeños están flanqueadas por repeticiones directas cortas y lo más probable es que se hayan originado a partir de acontecimientos de retrotransposición que se han acumulado durante el curso de la evolución. Se cree que las enzimas expresadas a partir de un LINE han llevado a cabo todos estos acontecimientos de retrotransposición que involucran mRNA, snRNA, y tRNA.

Los elementos móviles de DNA han tenido una influencia significativa en la evolución

Aunque los elementos móviles de DNA parecen no tener otra función directa que la de mantener su propia existencia, su presencia debe haber tenido un profundo impacto sobre la evolución de los organismos actuales. Como ya se mencionó, alrededor de la mitad de las mutaciones espontáneas en *Drosophila* son el resultado de la inserción de un elemento de DNA móvil en una unidad de transcripción o cerca de ella. En los mamíferos, los elementos móviles causan una proporción mucho más pequeña de mutaciones espontáneas: $\approx 10\%$ en ratones y sólo 0,1-0,2% en los seres humanos. Aun así, los elementos móviles se han encontrado en alelos mutantes asociados con diversas enfermedades genéticas humanas. Por ejemplo, las inserciones dentro del gen del factor de coagulación IX causan hemofilia y las inserciones dentro del gen que codifica la proteína muscular distrofina conducen a la distrofia muscular de Duchenne. Los genes que codifican el factor IX y la distrofina se encuentran ambos en el cromosoma X. Debido a que el genoma masculino solo tiene una copia del cromosoma X, las inserciones por transposición dentro de los genes afectan predominantemente a los varones.

En linajes que conducen a los eucariontes superiores, la recombinación homóloga entre elementos móviles de DNA dispersos a lo largo de los genomas ancestrales puede haber generado duplicaciones génicas y otros reordenamientos de DNA durante la evolución (véase la Fig. 6-2b). Por ejemplo, la clonación y la secuenciación del grupo de genes de la β -globina de diversas especies de primates han proporcionado fuerte evidencia de que los genes G_γ y A_γ humanos surgieron a partir de un entrecruzamiento homólogo desigual entre dos secuencias L1 que flanquean un gen de globina ancestral. Subsecuentes divergencias de tales genes duplicados pudieron llevar a la adquisición de distintas funciones beneficiosas asociadas con cada miembro de una familia génica. El entrecruzamiento desigual entre elementos móviles localizados dentro de los intrones de un gen particular pudo llevar a la duplicación de exones dentro de genes (véase la Fig. 6-2a). En este proceso muy probablemente influyó la evolución de genes que contienen múltiples copias de exones similares y que codifican dominios de proteína similares, como el gen de la fibronectina (véase la Fig. 4-16).

Alguna evidencia sugiere que durante la evolución de los eucariontes superiores, también ocurrió la recombinación de los elementos DNA móviles (p. ej., elementos *Alu*) en intrones de *dos genes separados*, generando genes nuevos a partir de combinaciones nuevas de exones preexistentes (Fig. 6-18). Este proceso evolutivo, llamado **combinación**

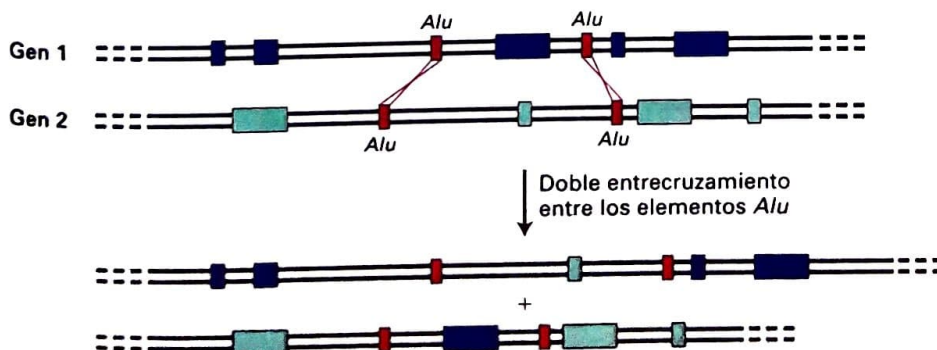
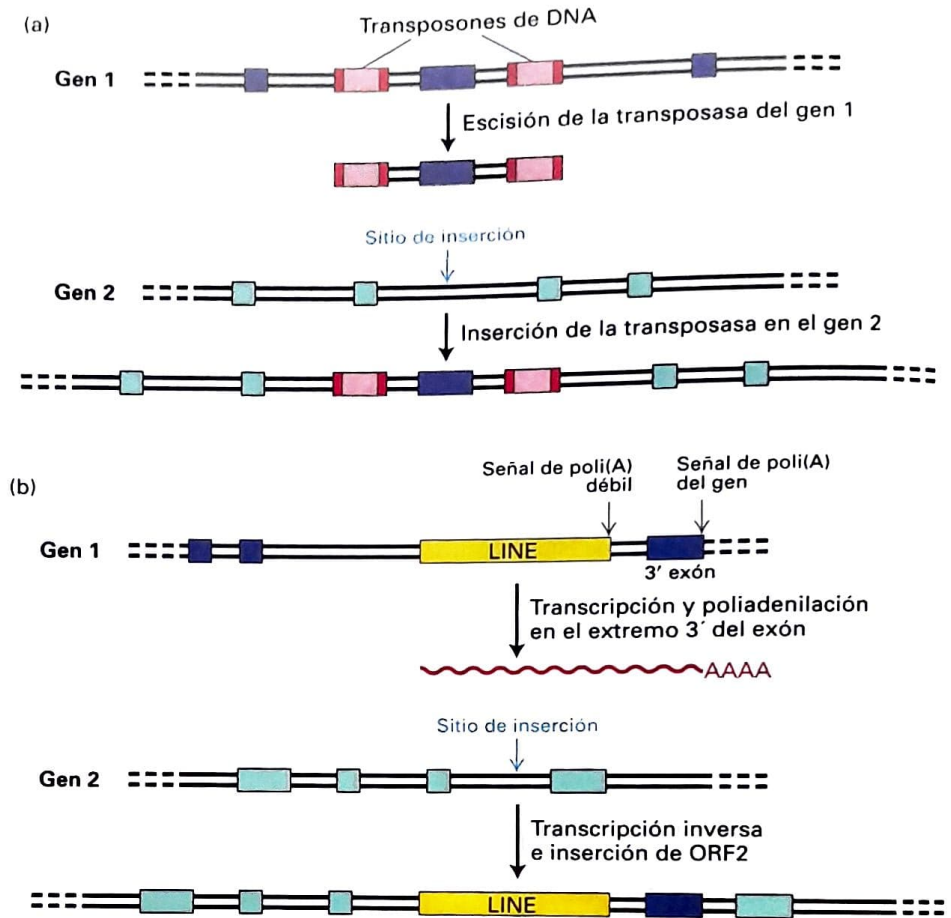


FIGURA 6-18 Proceso de combinación de exones a través de la recombinación entre repeticiones dispersas homólogas. La recombinación entre repeticiones dispersas en los intrones de genes separados produce unidades de transcripción con una combinación nueva de exones. En el ejemplo que aquí se muestra, un entrecruzamiento entre dos grupos de repeticiones *Alu* produce un intercambio de exones entre los dos genes.

FIGURA 6-19 La combinación de exones mediante transposición.

(a) Transposición de un exón flanqueado por transposones de DNA homólogos a un intrón de un segundo gen. Como se vio en la Figura 6-10, paso 1, la transposasa puede reconocer y cortar el DNA en los extremos de las repeticiones invertidas del transposón. En el gen 1, si la transposasa escinde el extremo izquierdo del transposón de la izquierda y el extremo derecho del transposón de la derecha, puede transponer todo el DNA interpuesto, inclusive el exón del gen 1, a un sitio nuevo en un intrón del gen 2. El resultado neto es una inserción del exón del gen 1 en el gen 2. (b) La integración de un exón en otro gen mediante la transposición de LINE. Algunos LINE tienen señales poli(A) débiles. Si uno de tales LINE se encuentra en el intrón del gen 1 más cercano al 3', durante la transposición su transcripción puede continuar más allá de sus propias señales de poli(A) y extenderse hacia el exón 3', transcribiendo las señales de poliadenilación y escisión del gen 1 en sí mismo. Este RNA puede sufrir transcripción inversa e integrarse a un intrón en el gen 2 mediante la proteína ORF2 de LINE, introduciendo un nuevo exón 3' (del gen 1) en el gen 2.



de exones (*exon shuffling*), puede haber ocurrido durante la evolución de los genes que codifican el activador tisular del plasminógeno, el receptor Neu y el factor de crecimiento epidérmico, todos los cuales contienen un dominio EGF (véase la Fig. 3-11). En este caso, la combinación de exones presumiblemente se produjo por la inserción de un exón que codifica el dominio EGF dentro de un intrón de la forma ancestral de cada uno de estos genes.

Ambos transposones de DNA y retrotransposones LINE han demostrado que ocasionalmente llevan secuencias flanqueantes no relacionadas cuando se transponen a sitios nuevos por los mecanismos representados en la Figura 6-19. Estos mecanismos probablemente también contribuyeron a la combinación de exones durante la evolución de los genes contemporáneos.

Además de causar cambios en las secuencias codificantes en el genoma, la recombinación entre los elementos móviles y la transposición del DNA adyacente a los transposones de DNA y los retrotransposones probablemente cumplió un papel importante en la evolución de las **secuencias reguladoras** que controlan la expresión génica. Como se mencionó antes, los genes eucariontes tienen regiones que controlan la transcripción llamadas **potenciadores** que pueden funcionar a distancias de decenas de cientos de pares de bases. La transcripción de muchos genes se controla a través de los efectos combinados de diversos elementos potenciadores. La inserción de elementos móviles cerca de las regiones de control de la transcripción probablemente contribuyó

a la evolución de nuevas combinaciones de secuencias potenciadoras. Este control en el que a su vez se expresan genes específicos en tipos celulares particulares y la cantidad de proteína codificada producida en organismos modernos, se analizará en el siguiente capítulo.

Las consideraciones sugieren que la creencia inicial de que los elementos móviles de DNA eran parásitos moleculares completamente egoístas estaba errada. Por el contrario, éstos deben haber contribuido profundamente a la evolución de los organismos superiores al promover (1) la generación de familias de genes mediante la duplicación génica, (2) la creación de nuevos genes a través de la combinación de exones preexistentes, y (3) la formación de regiones reguladoras más complejas que proporcionan control multifacético de la expresión génica. En la actualidad, los investigadores están tratando de aprovechar los mecanismos de transposición para insertar genes terapéuticos en pacientes como una forma de terapia génica.



Un proceso análogo al que se muestra en la Figura 6-19a es en gran parte responsable de la diseminación rápida de la resistencia a antibióticos entre bacterias patógenas, un problema importante en la medicina moderna. Los genes bacterianos que codifican enzimas que, a su vez, inactivan antibióticos (genes de resistencia a fármacos) han sido flanqueados por secuencias de inserción generando transposones con resistencia a fármacos. El amplio uso de antibióticos en medicina, a menudo innecesario en el tratamiento de infecciones virales donde no

tienen efecto y en la prevención de infecciones de animales sanos de granja, ha llevado a la selección de tales transposones resistentes a fármacos que se han insertado dentro de plásmidos conjugados. Los plásmidos conjugados codifican proteínas que dan lugar a la replicación y la transferencia del plásmido a bacterias relacionadas mediante un tubo macromolecular complejo denominado *pilus*. Estos plásmidos, llamados *factores R* (por su resistencia a fármacos), pueden contener múltiples genes de resistencia a fármacos introducidos por transposición y seleccionados en ambientes donde se utilizan los antibióticos para esterilizar superficies, como los hospitales. Éstos han llevado a una rápida diseminación de la resistencia contra múltiples antibióticos entre bacterias patógenas. Afrontar la diseminación de los factores R es un gran reto para la medicina moderna. ■

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 6.3

Elementos transponibles (móviles) de DNA

- Los elementos transponibles de DNA son secuencias moderadamente repetitivas dispersas en múltiples sitios a través de todos los genomas de los eucariontes superiores. Están presentes con una menor frecuencia en los genomas eucariontes.
- Los transposones de DNA se mueven hacia sitios nuevos directamente como DNA; los retrotransposones se transcriben primero a una copia de RNA del elemento, que luego mediante transcripción inversa se convierte en DNA (véase la Fig. 6-8).
- Una característica común de todos los elementos móviles es la presencia de repeticiones directas cortas que flanquean la secuencia.
- Las enzimas codificadas por los transposones mismos catalizan la inserción de estas secuencias en sitios nuevos en el DNA genómico.
- Aunque los transposones de DNA, similares en estructura a los elementos IS bacterianos, se presentan en eucariontes (p. ej., el elemento P de *Drosophila*), los retrotransposones en general son mucho más abundantes, en especial en vertebrados.
- Los retrotransposones LTR están flanqueados por repeticiones terminales largas (LTR), similares a las de DNA retroviral; al igual que los retrovirus, codifican la transcriptasa inversa y la integrasa. Se mueven en el genoma al transcribirse a RNA, que luego sufren una transcripción inversa en el citosol, la importación nuclear del DNA resultante con LTR e integración a un cromosoma de la célula huésped (véase la Fig. 6-14).
- Los retrotransposones sin LTR, que incluyen los elementos dispersos largos (LINE) y los elementos dispersos cortos (SINE), carecen de LTR y tienen un segmento rico en A/T en cada extremo. Se cree que se mueven mediante un mecanismo de retrotransposición no viral, mediado por proteínas codificadas por las LINE, que involucra el cebado de la transcripción inversa por parte del DNA cromosómico (véase la Fig. 6-17).
- Las secuencias SINE exhiben gran homología con los RNA celulares pequeños y se transcriben por la misma RNA polimerasa. Los elementos *Alu*, los SINE más comunes en los seres humanos, son secuencias de ≈ 300 pb que se encuentran diseminadas a través de todo el genoma humano.
- Algunas repeticiones dispersas derivan de RNA celulares que atravesaron una transcripción inversa y se insertaron en el DNA genómico en

algún momento de la historia evolutiva. Los pseudogenes procesados derivados de mRNA carecen de intrones, una característica que los distingue de los pseudogenes, que surgieron por deriva en la secuencia de genes duplicados.

- Los elementos móviles de DNA muy probablemente influenciaron la evolución de manera significativa al servir como sitios de recombinación y al movilizar las secuencias de DNA adyacentes.

6.4 DNA de orgánulos

A pesar de que la gran mayoría del DNA que se encuentra en la mayoría de los eucariontes aparece en el núcleo, parte del DNA está presente dentro de la mitocondria de animales, plantas y hongos, y dentro de los cloroplastos de plantas. Estos orgánulos son los principales sitios para la formación de ATP, durante la fosforilación oxidativa en las mitocondrias y la fotosíntesis en los cloroplastos (Cap. 12). Muchas líneas de evidencia indican que las mitocondrias y los cloroplastos evolucionaron a partir de las eubacterias que fueron engullidas dentro de células ancestrales que contenían un núcleo eucarionte, formando **endosimbiontes** (Fig. 6-20). A lo largo del tiempo evolutivo, la mayoría de los genes bacterianos se perdieron a partir del DNA organular. Algunos, como los genes que codifican proteínas involucradas en la biosíntesis de nucleótidos, lípidos y aminoácidos se perdieron debido a que sus funciones eran provistas por genes en el núcleo de la célula huésped. Otros genes que codifican componentes de los orgánulos actuales se transfirieron al núcleo. Sin embargo, las mitocondrias y los cloroplastos en los eucariontes actuales retienen el DNA que codifica algunas proteínas esenciales para la función organular, como así también los RNA ribosómico y de transferencia necesarios para la síntesis de estas proteínas. Por lo tanto, las células eucariontes tienen múltiples sistemas genéticos: un sistema nuclear predominante y sistemas secundarios con sus propio DNA, ribosomas y tRNA en mitocondrias y cloroplastos.

Las mitocondrias contienen múltiples moléculas de mtDNA

Las mitocondrias son lo suficientemente grandes como para visualizarse con el microscopio óptico e incluso el DNA mitocondrial (mtDNA) se puede detectar mediante microscopia de fluorescencia. El mtDNA se localiza en el interior de la mitocondria, la región conocida como la matriz (véase la Fig. 12-6). A juzgar por la cantidad de “puntos” fluorescentes amarillos de mtDNA, una célula *Euglena gracilis* contiene al menos 30 moléculas mtDNA (Fig. 6-21).

La replicación de mtDNA y la división de la red mitocondrial puede seguirse en las células vivas usando microscopia de secuencia temporal. Tales estudios demuestran que, en la mayoría de los organismos, el mtDNA se replica durante la interfase. En la mitosis, cada célula hija recibe aproximadamente el mismo número de mitocondrias, pero puesto que no hay mecanismo para la distribución de exactamente el mismo número de mitocondrias a las células hijas, algunas células contienen más mtDNA que otras. Al aislar las mitocondrias de las células y analizar el DNA extraído de ellas, se puede ver que cada mitocondria contiene múltiples moléculas de mtDNA.

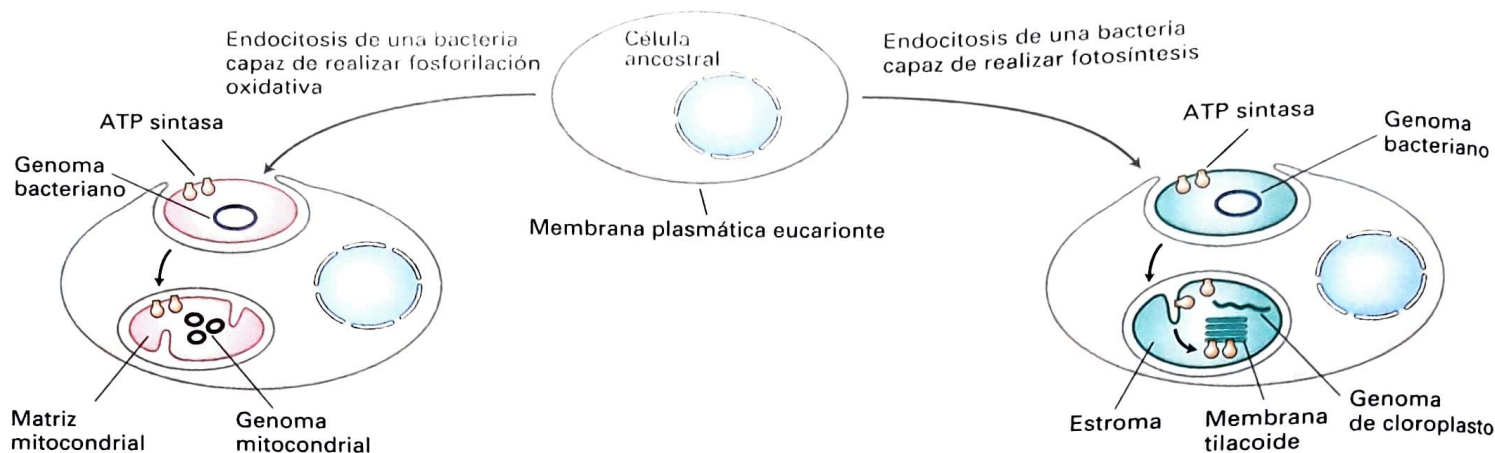


FIGURA 6-20 Modelo de hipótesis endosimbiótica de la evolución de mitocondrias y cloroplastos. La endocitosis de una bacteria por una célula eucarionte ancestral pudo generar un orgánulo con dos membranas, la membrana externa derivada de la membrana plasmática eucarionte y la membrana interna derivada de la membrana bacteriana. Las proteínas localizadas en la membrana bacteriana ancestral retienen esta orientación, de tal manera que la

porción de la proteína que enfrentaba el espacio extracelular ahora enfrenta el espacio intermembrana. La gemación de vesículas desde la membrana interna del cloroplasto, tal como sucede durante el desarrollo de los cloroplastos en las plantas contemporáneas, generaría las membranas tilacoides de los cloroplastos. Se indican los DNA de orgánulos.

Por lo tanto, la cantidad total de mtDNA en una célula depende del número de mitocondrias, el tamaño del mtDNA y el número de moléculas mtDNA por mitocondria. Cada uno de estos parámetros varía enormemente entre diferentes tipos de células.

El mtDNA tiene herencia citoplasmática

Estudios de mutantes en levaduras y otros organismos unicelulares indicaron primero que las mitocondrias exhiben *herencia citoplasmática* y por lo tanto contienen su propio sistema genético (Fig. 6-22). Por ejemplo, los mutantes de levadura *petite* exhiben mitocondrias estructuralmente anormales y son incapaces de realizar fosforilación oxidativa. En consecuencia, las células *petite* crecen más lentamente que las levaduras del tipo silvestre y forman colonias más pequeñas. Los cruzamientos genéticos entre diferentes cepas de levaduras (haploides) muestran que la mutación *petite* no se segrega con ningún gen o cromosoma nuclear conocido. En estudios posteriores, se encontró que la mayoría de los mutantes *petite* contenían deleciones del mtDNA.

En el apareamiento por fusión de las células de levadura haploides, ambos padres contribuyen equitativamente al citoplasma del diploide resultante; por lo tanto la herencia de las mitocondrias es biparental (véase la Fig. 6-22a). En los mamíferos y la mayoría de otros organismos multicelulares, sin embargo, los espermatozoides contribuyen con poco citoplasma (si es que lo hacen) al cigoto, y virtualmente todas las mitocondrias en el embrión derivan de las de los óvulos, no de los espermatozoides. Los estudios en ratones demostraron que el 99,99% del mtDNA se hereda de la madre, pero una pequeña parte (0,01%) se hereda del progenitor masculino. En las plantas superiores, el mtDNA se hereda exclusivamente de manera uniparental a través del progenitor femenino (óvulo), no del masculino (polen).

El tamaño, la estructura y la capacidad codificante del mtDNA varían considerablemente entre organismos

Sorprendentemente, el tamaño del mtDNA, el número y la naturaleza de las proteínas que codifica, e incluso el código genético mitocondrial en sí mismo varían enormemente entre diferentes organismos. Los mtD-



FIGURA EXPERIMENTAL 6-21 La tinción dual de múltiples moléculas de DNA mitocondrial en una célula de *Euglena gracilis*. Las células se trataron con una mezcla de dos colorantes: bromuro de etidio, que se une al DNA y emite una fluorescencia roja, y DiOC6, que se incorpora específicamente a las mitocondrias y emite una fluorescencia verde. Así el núcleo emite una fluorescencia roja y las zonas ricas en DNA mitocondrial fluorescen de color amarillo, una combinación de fluorescencia roja del DNA y verde de las mitocondrias. (De Y. Hayashita y K. Ueda, 1989. / Cell Sci. 93:565.)

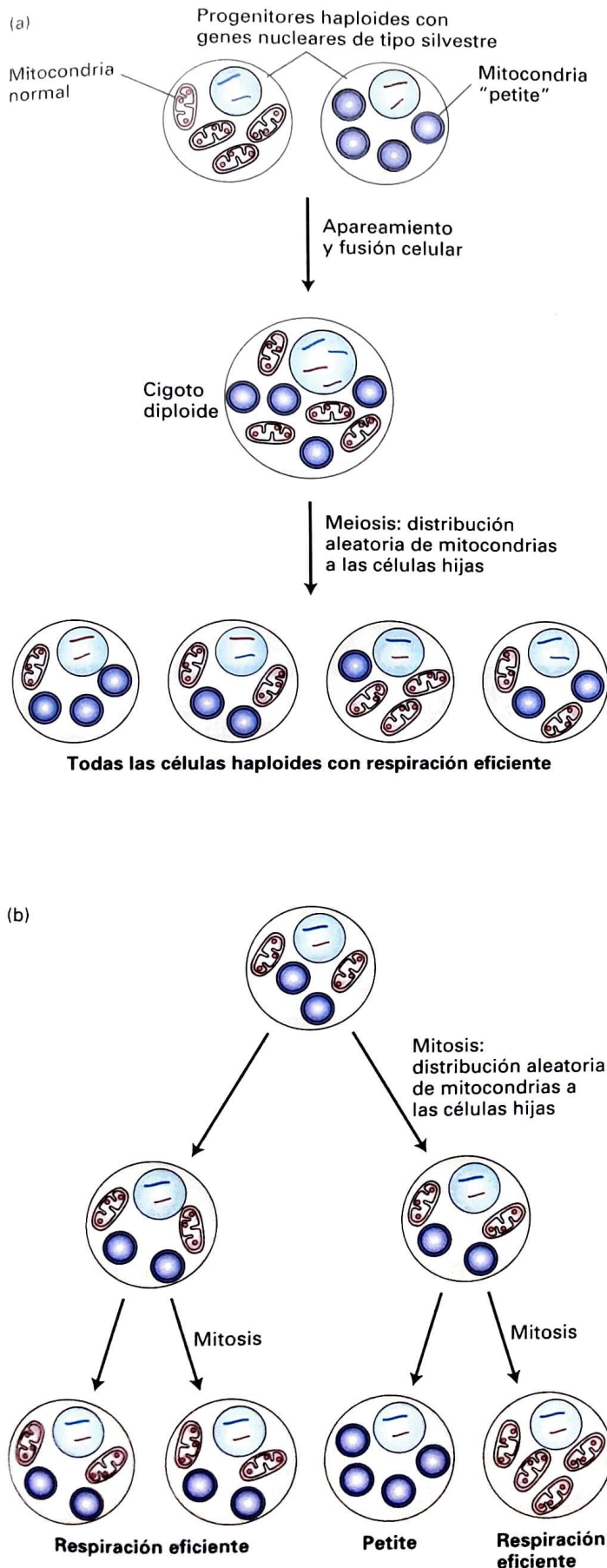


FIGURA 6-22 Herencia citoplasmática de una mutación *petite* de mtDNA en levadura. Las mitocondrias de la cepa *petite* son defectuosas en la fosforilación oxidativa debido a una delección en el mtDNA. (a) Las células haploides se fusionan para producir una célula diploide que sufre meiosis, durante la cual se produce la segregación aleatoria de los cromosomas y las mitocondrias que contienen el mtDNA, de los progenitores. Nótese que los alelos para los genes en el DNA nuclear (representados por los cromosomas nucleares grandes y pequeños coloreados de rojo y azul) se segregan 2:2 durante la meiosis (véase la Figura 5-5). Por el contrario, como las levaduras normales contienen ≈ 50 moléculas de mtDNA por célula, todos los productos de la meiosis suelen contener mtDNA normales y *petite*, y son capaces de realizar respiración. (b) A medida que estas células haploides crecen y se dividen mitóticamente, el citoplasma (incluyendo las mitocondrias) se distribuye aleatoriamente en las células hijas. Ocasionalmente, se genera una célula que contiene sólo el mtDNA *petite* y produce una colonia *petite*. Por lo tanto, la formación de tales células *petite* es independiente de cualquier marcador nuclear.

NA de la mayoría de los animales multicelulares son moléculas circulares de ≈ 16 kb que codifican genes sin intrones dispuestos en forma compacta en ambas hebras de DNA. Los mtDNA de vertebrados codifican los dos rRNA que se encuentran en los ribosomas mitocondriales, los 22 tRNA que se usan para traducir los mRNA mitocondriales, y las 13 proteínas involucradas en el transporte de electrones y la síntesis de ATP (Cap. 12). Los genomas mitocondriales más pequeños que se conocen están en *Plasmodium*, un parásito unicelular intracelular necesario que causa paludismo en los seres humanos. Los mtDNA de *Plasmodium* sólo son de ≈ 6 kb, codifican cinco proteínas y los rRNA mitocondriales.

Los genomas mitocondriales de un gran número de organismos metazoos (p. ej., animales multicelulares) se han clonado y secuenciado en la actualidad, y los mtDNA de todas estas fuentes codifican proteínas mitocondriales esenciales (Fig. 6-23). Todas las proteínas codificadas por los mtDNA se sintetizan sobre ribosomas mitocondriales. La mayoría de los polipéptidos sintetizados mitocondrialmente identificados hasta el momento son las subunidades de complejos multiméricos usados en el transporte de electrones, la síntesis de ATP o la inserción de proteínas en la membrana mitocondrial interna o en el espacio intermembrana. Sin embargo, la mayoría de las proteínas localizadas en la mitocondria, como aquellas involucradas en los procesos mencionados en la parte superior de la Figura 6-23, están codificadas por genes nucleares, sintetizados sobre ribosomas citosólicos e importados dentro de los orgánulos por procesos analizados en el Capítulo 13.

En contraste a los mtDNA de metazoos, los mtDNA de plantas son mucho más largos y la mayoría de los DNA no codifican proteínas. Por ejemplo, el mtDNA en el importante modelo de plantas *Arabidopsis thaliana* tiene 366 924 pares de bases y el mtDNA más largo conocido tiene ≈ 2 Mb, encontrado en las cucurbitáceas (p. ej., melón y pepino). La mayoría de los mtDNA de plantas consisten en largos intrones, pseudogenes, elementos de DNA móviles restringidos a los compartimientos mitocondriales y piezas de DNA foráneo (cloroplastos, nuclear, y viral) que probablemente fueron insertados dentro de los genomas mitocondriales de plantas durante su evolución. Las secuencias duplicadas también contribuyen a la mayor longitud de los mtDNA de plantas.

Las diferencias en el número de genes codificados por el mtDNA de diversos organismos muy probablemente reflejen el movimiento de DNA entre la mitocondria y el núcleo durante la evolución. La eviden-

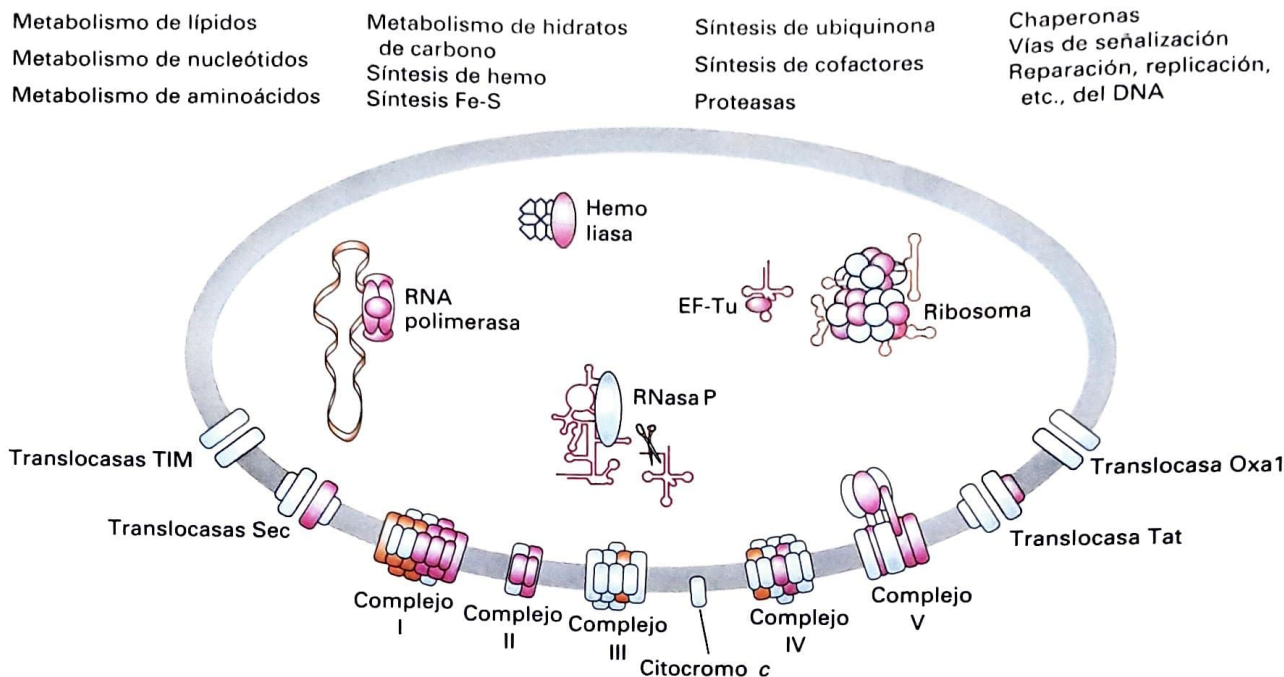


FIGURA 6-23 Las proteínas codificadas en el DNA mitocondrial y sus participaciones en los procesos mitocondriales. Solo se describe la matriz mitocondrial y la membrana interna. La mayoría de los componentes están codificados en el núcleo (azul); aquellos resaltados de color rosa están codificados por el mtDNA en algunos eucariontes pero por el genoma nuclear en otros eucariontes, mientras que una pequeña porción están invariablemente especificados por el mtDNA (naranja). Los procesos mitocondriales que tienen componentes exclusivamente codificados por el núcleo se mencionan en la parte superior. Los complejos I-V están involucrados en el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa. Las translocasas TIM, Sec, Tat, y Oxa1 están

implicadas en la importación y exportación de proteínas, y en la inserción de proteínas en la membrana interna (véase el Cap. 13). La RNasa P es una ribozima que procesa el extremo 5' de los tRNA (analizado en el Cap. 8). Se debe notar que la mayoría de los eucariontes tiene un Complejo I multisubunidad como se describe, con tres subunidades invariablemente codificadas por el mtDNA. Sin embargo, en unos pocos organismos (*Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces* y *Plasmodium*), este complejo es reemplazado por una enzima, un único polipéptido, codificada por el núcleo. Para más detalles del metabolismo y el transporte mitocondrial, véanse los Capítulos 12 y 13. (Adaptado de G. Burger y cols., 2003, *Trends Genet.* 19:709)

cía directa para este movimiento proviene de la observación de que diversas proteínas codificadas por el mtDNA en algunas especies están codificadas por el DNA nuclear en otras especies estrechamente relacionadas. El ejemplo más notable de este fenómeno involucra el gen *cox II*, que codifica la subunidad 2 de la citocromo *c* oxidasa, que constituye el complejo IV en la cadena de transporte de electrones mitocondrial (véase la Fig. 12-16). Este gen se encuentra en el mtDNA en todas las plantas multicelulares estudiadas excepto para ciertas especies relacionadas de leguminosas, que incluyen las judías verdes y la soja, en las cuales el gen *cox II* es nuclear. El gen *cox II* se encuentra ausente en el mtDNA de las judías verdes, pero un pseudogén *cox II* defectuoso que ha acumulado muchas mutaciones aún puede reconocerse en el mtDNA de la soja.

Muchos transcritos de RNA de genes mitocondriales de plantas son editados, principalmente por la conversión catalizada por enzimas de residuos C seleccionados a residuos U y ocasionalmente de U a C (la edición de RNA se analiza en el Cap. 8). El gen *cox II* nuclear de las judías verdes corresponde más a los transcritos de RNA *cox II* editado que a los genes *cox II* mitocondriales encontrados en otras legumbres. Estas observaciones son evidencia fuerte de que el gen *cox II* se movió desde la mitocondria hasta el núcleo durante la evolución de la judía verde mediante un proceso que involucró un intermediario de RNA. Presumiblemente

este movimiento involucró un mecanismo de transcripción inversa similar a aquel por el cual los pseudogenes procesados son generados en el genoma del núcleo a partir de los mRNA codificados por el núcleo.

Además de las grandes diferencias en los tamaños de los mtDNA en los diferentes eucariontes, la estructura de los mtDNA también varía enormemente. Como se mencionó anteriormente, el mtDNA, en la mayoría de los animales es una molécula circular ≈ 16 kb. Sin embargo, el mtDNA de muchos organismos como el protista *Tetrahymena* existe como concatémeros lineales cabeza con cola de secuencia repetitiva. En la mayoría de los ejemplos extremos, el mtDNA del protista *Amoebidium parasiticum* está compuesto de varios cientos de cortas secuencias lineales distintas. Y el mtDNA de *Trypanosoma* está compuesto de múltiples maxicírculos concatenados (entrelazados) en miles de minicírculos que codifican RNA guías involucrados en la edición de la secuencia de mRNA mitocondriales codificados en los maxicírculos.

Los productos de genes mitocondriales no son exportados

Hasta donde se conoce, todos los transcritos de mtDNA y sus productos de traducción permanecen en la mitocondria en donde son produ-

cidos y todas las proteínas codificadas por el mtDNA se sintetizan en los ribosomas mitocondriales. El DNA mitocondrial codifica los rRNA que forman los ribosomas mitocondriales, aunque la mayoría de las proteínas ribosómicas se importan desde el citosol. En los animales y los hongos, todos los tRNA usados para la síntesis de proteínas en las mitocondrias también están codificados en el mtDNA. Sin embargo, en las plantas y en la mayoría de los protozoos, la mayoría de los tRNA mitocondriales son codificados por el DNA nuclear e importados hacia la mitocondria.

 Como reflejo de los ancestros bacterianos de las mitocondrias, los ribosomas mitocondriales se asemejan a los ribosomas bacterianos y difieren de los ribosomas citosólicos eucariontes en sus composiciones de RNA y proteína, sus tamaños y su sensibilidad a ciertos antibióticos (véase la Fig. 4-22). Por ejemplo, el cloranfenicol bloquea la síntesis proteica de los ribosomas mitocondriales y bacterianos de la mayoría de los organismos, pero la cicloheximida, que inhibe la síntesis proteica en los ribosomas citosólicos eucariontes, no afecta a los ribosomas mitocondriales. Esta sensibilidad de los ribosomas mitocondriales a la importante clase de aminoglucósidos de antibióticos que incluyen al cloranfenicol es la principal causa de toxicidad que estos antibióticos causan. ■

Las mitocondrias evolucionaron a partir de un acontecimiento endosimbiótico que involucra una bacteria del tipo *Rickettsia*

El análisis de las secuencias mtDNA de varios eucariontes, incluso de protistas unicelulares que se separaron de otros eucariontes temprano en la evolución, proporciona evidencia fuerte de que la mitocondria tuvo un origen único. Es probable que las mitocondrias hayan surgido de un simbiote bacteriano cuyos parientes contemporáneos más cercanos se encuentran en el grupo *Rickettsiaceae*. Las bacterias en este grupo son parásitos intracelulares obligados. Por lo tanto, el ancestro de la mitocondria probablemente también tuvo un estilo de vida intracelular, colocándolo en una buena ubicación para evolucionar dentro

de un simbiote intracelular. El mtDNA con el número más grande de genes codificados encontrados hasta el momento está en la especie de protistas *Reclinomonas americana*. Todos los otros mtDNA tienen un subgrupo de los genes de *R. americana*, lo cual fuertemente implica que evolucionaron a partir de un ancestro con *R. americana*, perdiendo diferentes grupos de genes mitocondriales por delección y/o transferencia al núcleo con el transcurso del tiempo.

En los organismos cuyos mtDNA incluye sólo un número limitado de genes, se retiene el mismo conjunto de genes mitocondriales, independientemente del filo que incluya a estos organismos (véase la Fig. 6-23, proteínas naranjas). Una hipótesis de por qué estos genes nunca fueron transferidos de manera exitosa al genoma nuclear es que sus polipéptidos codificados son demasiado hidrófobos para cruzar la membrana mitocondrial externa y por lo tanto no podrían ser importados de regreso a la mitocondria si fueran sintetizados en el citosol. De modo similar, el gran tamaño de los rRNA puede interferir con su transporte a partir del núcleo a través del citosol dentro de la mitocondria. Alternativamente, estos genes pueden que no hayan sido transferidos al núcleo durante la evolución debido a que la regulación de su expresión en respuesta a las condiciones dentro de las mitocondrias individuales puede ser ventajosa. Si estos genes estuvieran localizados en el núcleo, las condiciones dentro de cada mitocondria no influenciarían la expresión de las proteínas halladas en esa mitocondria.

El código genético mitocondrial difiere del código nuclear estándar

El código usado en las mitocondrias animales y de hongos es diferente del código estándar usado en todos los procariontes y los genes nucleares eucariontes; notablemente, el código incluso difiere en las mitocondrias de diferentes especies (Cuadro 6-3). Es un misterio por qué y cómo se originaron estas diferencias durante la evolución. Por ejemplo, UGA normalmente es un codón de terminación, pero es leído como triptófano por los sistemas de traducción mitocondriales de los seres humanos y los hongos; sin embargo, en las mitocondrias de plantas, UGA aún es reconocido como un codón de terminación. AGA y AGG,

Cuadro 6-3 Alteraciones en el código genético estándar en las mitocondrias

Codón	Código estándar*	Mitocondria				
		Mamíferos	<i>Drosophila</i>	<i>Neurospora</i>	Levaduras	Plantas
UGA	Stop	Trp	Trp	Trp	Trp	Stop
AGA, AGG	Arg	Stop	Ser	Arg	Arg	Arg
AUA	Ile	Met	Met	Ile	Met	Ile
AUU	Ile	Met	Met	Met	Met	Ile
CUU, CUC, CUA, CUG	Leu	Leu	Leu	Leu	Thr	Leu

*Para proteínas codificadas en el núcleo.
FUENTE: S. Anderson y cols., 1981, *Nature* 290:457; P. Borst en *International Cell Biology 1980-1981*, H. G. Schwiger, ed., Springer-Verlag, p. 239; C. Breitenberger y U. L. Tj Bhandary, 1985, *Trends Biochem. Sci.* 10:478-483; V. K. Eckenrode y C. S. Levings, 1986, *In Vitro Cell Dev. Biol.* 22:169-176; J. M. Gualber y cols., 1989, *Nature* 341:660-662; y P. S. Covello y M. W. Gray, 1989, *Nature* 341:662-666.

los codones nucleares estándares para la arginina, también codifican arginina en el mtDNA de plantas y hongos, pero son codones de terminación en el mtDNA de mamíferos y codones de serina en el mtDNA de *Drosophila*.

Como se muestra en el Cuadro 6-3, las mitocondrias de plantas parecen utilizar el código genético estándar. Sin embargo, las comparaciones de las secuencias de aminoácidos de proteínas mitocondriales de plantas con las secuencias nucleotídicas de los mtDNA de plantas sugieren que CGC codificaría arginina (el aminoácido “estándar”) o triptófano. Esta no especificidad aparente del código mitocondrial de las plantas se explica mediante la edición de los transcritos de RNA mitocondriales, que pueden convertir los residuos de citosina a residuos de uracilo. Si una secuencia CGG es editada a UGG, el codón específica triptófano, el aminoácido estándar para UGG, mientras que los codones CGG no editados codifican la arginina estándar. Por lo tanto el sistema de traducción en las mitocondrias vegetales no utiliza el código genético estándar. ■

Las mutaciones en el DNA mitocondrial causan diversas enfermedades genéticas en los seres humanos

La gravedad de la enfermedad causada por una mutación en el mtDNA depende de la naturaleza de la mutación y de la proporción de mtDNA mutante y de tipo salvaje presente en un tipo celular particular. En general, cuando se encuentran mutaciones en el mtDNA, las células contienen mezclas de mtDNA mutante y del tipo salvaje, una condición conocida como *heteroplasmia*. Cada vez que una célula somática o de la línea germinal de mamíferos se divide, los mtDNA de tipo mutantes y de tipo salvaje se segregan al azar en las células hijas, como ocurre en las células de levadura (véase la Fig. 6-22b). Por lo tanto, el genotipo del mtDNA, que fluctúa de una generación a otra y de una división celular a la siguiente, puede derivar hacia un mtDNA predominantemente del tipo salvaje o del tipo mutante. Puesto que todas las enzimas necesarias para la replicación y el crecimiento de las mitocondrias de mamíferos, como las RNA y DNA polimerasas mitocondriales, están codificadas en el núcleo y se importan desde el citosol, un mtDNA mutante no debería ser una “desventaja de replicación”; los mutantes que involucran delecciones grandes del mtDNA incluso podrían disfrutar de una ventaja selectiva en la replicación, debido a que pueden replicarse de forma más rápida.

Investigaciones recientes sugieren que la acumulación de mutaciones en el mtDNA es un componente importante del envejecimiento en mamíferos. Se ha observado que las mutaciones en el mtDNA se acumulan con el envejecimiento, probablemente debido a que el mtDNA de mamífero no se repara en respuesta al daño del DNA. Para estudiar esta hipótesis, los investigadores utilizaron técnicas de sustitución de secuencia génica o genes *knock in* para reemplazar el gen nuclear que codifica la DNA polimerasa mitocondrial con actividad correctora de prueba normal (véase la Fig. 4-34) por un gen mutante que codifica una polimerasa defectuosa en la corrección de prueba. Las mutaciones en el mtDNA se acumularon mucho más rápido en los ratones mutantes homocigotos que en los ratones de tipo salvaje y los ratones mutantes envejecieron a una tasa muy acelerada (Fig. 6-24).

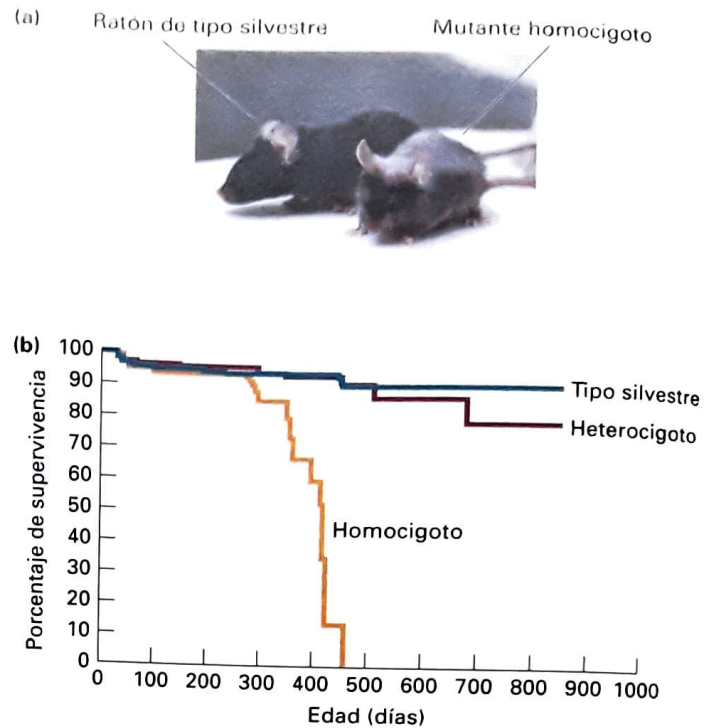


FIGURA EXPERIMENTAL 6-24 Los ratones con una DNA polimerasa mitocondrial defectuosa para la función de corrección de prueba presentan envejecimiento prematuro. Se preparó una línea de ratón *knock-in* (con sustitución de secuencia génica) mediante métodos analizados en el Capítulo 5, con una mutación de ácido aspártico por alanina en el gen que codifica la DNA polimerasa mitocondrial (D257A), inactivando la función correctora de prueba de la polimerasa. (a) Ratones de tipo salvaje y mutantes homocigotos de 390 días de edad (13 meses). El ratón mutante exhibe muchas de las características de un ratón viejo (> 720 días, o 24 meses de edad). (b) Gráfico de la supervivencia versus el tiempo de los ratones de tipo salvaje (+/+), heterocigotos (D257A/+), y homocigotos (D257A/D257A). (Adaptado de G. C. Kujoth y cols., 2005, *Science* 309:481. Parte [a] cortesía de Jeff Miller/University of Wisconsin-Madison and Gregory Kujoth, Ph.D.)

Con pocas excepciones, todas las células humanas tienen mitocondrias, aunque las mutaciones en el mtDNA afectan sólo algunos tejidos. Los tejidos más afectados son los tejidos que tienen altos requerimientos del ATP producido por la fosforilación oxidativa y los tejidos que necesitan la mayoría o todo el mtDNA de la célula para sintetizar suficientes cantidades de proteínas mitocondriales funcionales. Por ejemplo, la *neuropatía óptica hereditaria de Leber* (degeneración del nervio óptico) es causada por una mutación sin sentido del gen de mtDNA que codifica la subunidad 4 de la NADH-CoQ reductasa (complejo I), una proteína necesaria para la producción de ATP por parte de la mitocondria (véase la Fig. 12-16). Cualquiera de las diversas delecciones grandes en el mtDNA causa otro grupo de enfermedades, que incluyen la *oftalmoplejia externa progresiva crónica*, caracterizada por defectos oculares, arritmias cardíacas y degeneración del sistema nervioso central. Un tercer trastorno, que causa fibras musculares “desgarradas” (con mitocondrias ensambladas en forma inadecuada) y movimientos espasmódicos descontrolados asociados, se debe a una sola mutación en el asa T Ψ CG del tRNA de la lisina mitocondrial. Como

resultado de esta mutación, aparentemente se inhibe la traducción de varias proteínas mitocondriales. ■

Los cloroplastos contienen DNA grandes que suelen codificar más de un centenar de proteínas

 Se cree que al igual que las mitocondrias, los cloroplastos han evolucionado a partir de una bacteria fotosintética endosimbiótica ancestral (véase la Fig. 6-20). Sin embargo, el acontecimiento endosimbiótico que dio origen a los cloroplastos ocurrió más recientemente (hace 1 200-1 500 millones de años) que el acontecimiento que llevó a la evolución de las mitocondrias (hace 1 500-2 200 millones de años). En consecuencia, los DNA de los cloroplastos contemporáneos muestran menos diversidad estructural que los mtDNA. También de manera similar a las mitocondrias, los cloroplastos contienen múltiples copias del DNA y los ribosomas organulares, que sintetizan algunas de las proteínas codificadas por los cloroplastos usando el código genético estándar. Al igual que el mtDNA de las plantas, el DNA de cloroplastos se hereda exclusivamente uniparentalmente a través del progenitor femenino (huevo). Otras proteínas de cloroplastos son codificadas por los genes nucleares, se sintetizan sobre los ribosomas citosólicos y luego se incorporan en el orgánulo (Cap. 13). ■

En las plantas superiores, los DNA de cloroplastos son de 120-160 kb de largo, dependiendo de las especies. Inicialmente se pensaba que eran moléculas de DNA circular debido a que en los organismos genéticamente manejables como el protozoo *Chlamydomonas reinhardtii*, el mapa genético es circular. Sin embargo, estudios recientes revelaron que los DNA de cloroplastos de plantas son en realidad concatémicos lineales largos cabeza-con-cola más la recombinación de intermediarios entre moléculas lineales largas. En estos estudios, los investigadores utilizaron técnicas que minimizan la ruptura mecánica de moléculas de DNA largas durante el aislamiento y la electroforesis en gel, permitiendo el análisis de DNA del tamaño de megabases.

Se han determinado las secuencias completas de diversos DNA de cloroplastos de plantas superiores. Estos contienen 120-135 genes, 130 en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. El DNA de cloroplasto de *A. thaliana* contiene 76 genes que codifican proteínas y 54 genes con productos de RNA como rRNA y tRNA. Los DNA de cloroplastos codifican las subunidades de una RNA polimerasa similar a la bacteriana y expresan muchos de sus genes a partir de operones policistrónicos como en las bacterias (véase la Fig. 4-13a). Algunos genes de cloroplastos contienen intrones, pero éstos son similares a los intrones especializados que se encuentran en algunos genes bacterianos y en genes mitocondriales de hongos y protozoos, en lugar de los intrones de genes nucleares. Al igual que en la evolución de los genomas mitocondriales, muchos genes en el endosimbionte cloroplasto ancestral, que era redundante con los genes nucleares, se perdieron a partir del DNA de cloroplastos. Además, muchos genes esenciales para la función de los cloroplastos se han transferido al genoma nuclear de las plantas durante el tiempo evolutivo. Estimaciones recientes a partir del análisis de secuencia de la *A. thaliana* y los genomas de cianobacterias indican que se han transferido ≈ 4 500 genes del endosimbionte original al genoma nuclear.

 Se han desarrollado métodos similares a los utilizados para la transformación de células de levadura (Cap. 5) para introducir en forma estable DNA foráneo dentro de los cloroplastos de plantas superiores. El gran número de moléculas de DNA de cloroplasto por célula

permite la introducción de miles de copias de un gen genéticamente modificado dentro de cada célula, produciendo concentraciones extraordinariamente elevadas de producción de proteína foránea. Recientemente, la transformación de cloroplastos ha llevado a la modificación genética de plantas que son resistentes a las infecciones bacterianas y micóticas, a las sequías y a los herbicidas. El nivel de producción de proteínas foráneas es comparable con el logrado con las bacterias genéticamente modificadas, tornando probable que la transformación de cloroplastos sea usada para la producción de medicamentos para uso humano y posiblemente para la modificación genética de cultivos alimentarios que contengan altos niveles de todos los aminoácidos esenciales para los seres humanos. ■

CONCEPTOS CLAVE de la sección 6.4

DNA de los orgánulos

- Las mitocondrias y los cloroplastos probablemente evolucionaron a partir de las bacterias que formaban una relación simbiótica con células ancestrales que contenían un núcleo eucarionte (véase la Fig. 6-20).
- La mayoría de los genes que se encontraban originalmente dentro de las mitocondrias y cloroplastos o bien se perdieron debido a que sus funciones eran redundantes con los genes nucleares o se trasladaron al genoma nuclear en el transcurso del tiempo evolutivo, dejando un conjunto de genes diferentes en el DNA de orgánulos de diferentes organismos (véase la Fig. 6-23).
- Los mtDNA de animales son moléculas circulares que reflejan sus probables orígenes bacterianos. Los mtDNA de plantas y los DNA de cloroplastos en general son más largos que los mtDNA de otros eucariontes, en gran parte debido a que contienen más regiones no codificantes y secuencias repetitivas.
- Todos los mtDNA y los DNA de cloroplastos codifican rRNA y algunas de las proteínas involucradas en el transporte electrónico fotosintético o mitocondrial y en la síntesis de ATP. La mayoría de los mtDNA de animales y los DNA de cloroplastos también codifican el tRNA necesario para traducir los mRNA organulares.
- Debido a que la mayoría de los mtDNA se heredan a partir de los óvulos en lugar de los espermatozoides, las mutaciones en el mtDNA exhiben un patrón de herencia citoplasmático materno. De manera similar, el DNA de cloroplastos se hereda exclusivamente del progenitor materno.
- Los ribosomas mitocondriales se asemejan a los ribosomas bacterianos en sus estructuras, sensibilidad al cloranfenicol y resistencia a la cicloheximida.
- El código genético de los mtDNA de los animales y hongos difieren levemente del bacteriano y del genoma nuclear, y varía entre diferentes animales y hongos (véase el Cuadro 6-3). Por el contrario, los mtDNA de plantas y los DNA de cloroplastos parecen compartir el código genético estándar.
- Varios trastornos neuromusculares en los seres humanos son el resultado de mutaciones en el mtDNA. Los pacientes en general tienen una mezcla de tipo silvestre y mtDNA mutante en sus células (heteroplasmia): cuanto más alta sea la fracción de mtDNA mutante, más grave es el fenotipo mutante.

6.5 Genómica: análisis amplio del genoma de la estructura y la expresión génica

Mediante el uso de las técnicas automatizadas de secuenciación de DNA y de los algoritmos informáticos para armar los datos de secuencia, los investigadores han determinado vastas cantidades de secuencias de DNA que incluyen casi la totalidad de la secuencia genómica humana y muchos organismos experimentales clave. Este volumen enorme de datos, que crece a un ritmo rápido, se almacena y organiza en dos bancos de datos principales: el GenBank en el National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, y el EMBL Sequence Data Base en el laboratorio de biología molecular europeo en Heidelberg, Alemania. Estas bases de datos intercambian continuamente nuevas secuencias identificadas y las ponen a disposición de los científicos de todo el mundo en Internet. Hasta el momento, se han determinado por completo, o casi por completo, las secuencias genómicas de cientos de virus y bacterias, decenas de archaeas, levaduras (eucariontes), plantas que incluyen el arroz y el maíz, importantes modelos multicelulares eucariontes como el nematodo *C. elegans*, la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, ratones, seres humanos y representantes de ≈ 35 filos de metazoos. El costo y la velocidad de secuenciación de una magabase de DNA ha bajado tanto que se ha secuenciado el genoma completo en células cancerosas y se lo ha comparado con el genoma en células normales del mismo paciente con el fin de determinar todas las mutaciones que se han acumulado en sus células tumorales. Esta técnica puede revelar genes que comúnmente están mutados en todos los cánceres, como así también genes que suelen estar mutados en células tumorales de diferentes pacientes con el mismo tipo de cáncer (p. ej., cáncer de mama versus de colon). Este enfoque puede eventualmente llevar a tratamientos contra el cáncer altamente individualizados, adaptados a las mutaciones específicas de las células tumorales de un paciente particular. Las últimas técnicas de secuenciación de DNA automatizadas son tan poderosas que actualmente se puso en marcha un proyecto conocido como el "Proyecto de los 1 000 genomas" con el objetivo de secuenciar la mayoría de los genomas de 1 000-2 000 individuos elegidos al azar de todo el mundo con el fin de determinar la extensión de las variaciones genéticas humanas como una base para la investigación de las relaciones entre genotipo y fenotipo en los seres humanos. Más aún, se han fundado empresas privadas que van a secuenciar gran parte del genoma de un individuo por ≈ 100 US\$ para realizar una búsqueda de variaciones de secuencia que puedan afectar la probabilidad de desarrollar enfermedades específicas.

En esta sección, se examinarán algunas de las formas en que los investigadores aprovechan la riqueza en los datos para proporcionar información acerca de la función génica y las relaciones evolutivas, para identificar genes nuevos cuyas proteínas codificadas nunca han sido aisladas y para determinar cuándo y dónde se expresan los genes. Este uso de las computadoras para analizar los datos de las secuencias ha dado lugar al surgimiento de un nuevo campo en la biología: la *bioinformática*.

Las secuencias almacenadas sugieren funciones recién identificadas de proteínas y genes

Como se analizó en el Capítulo 3, las proteínas con funciones similares suelen contener secuencias de aminoácidos que corresponden a

dominios funcionales importantes en la estructura tridimensional de las proteínas. Al comparar la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada por un gen recientemente clonado con las secuencias de proteínas de función conocida, un investigador puede buscar similitudes de secuencia que proporcionen pistas para la función de la proteína identificada. Debido a la degeneración en el código genético, las proteínas relacionadas invariablemente exhibirán más similitudes de secuencia que los genes que las codifican. Por esta razón, se suelen comparar las secuencias de proteínas en lugar de las secuencias de DNA correspondientes.

El programa de computación más ampliamente usado para este propósito se conoce como BLAST (*basic local alignment search tool*). El algoritmo BLAST divide la secuencia de la "nueva" proteína (conocida como la secuencia consultada, *query*) en segmentos más cortos y luego busca en la base de datos coincidencias significativas con cualquiera de las secuencias almacenadas. Este programa de coincidencias asigna una puntuación elevada a los aminoácidos con idénticas coincidencias y una puntuación baja a las coincidencias entre aminoácidos que están relacionados (p. ej., hidrófobos, polares, cargados positivamente, cargados negativamente) pero no idénticos. Cuando se encuentra una coincidencia importante para un segmento, el algoritmo BLAST buscará localmente para expandir la región de similitud. Después de que se haya completado la búsqueda, el programa clasifica las coincidencias entre la proteína problema y las diversas proteínas conocidas en base a sus *valores p*. Este parámetro es una medida de la probabilidad de hallar tal grado de similitud entre dos secuencias de proteínas por casualidad. Mientras más bajo es el *valor p*, mayor es la similitud de secuencia entre dos secuencias. Un *valor p* menor a alrededor de 10^{-3} suele ser considerado como una evidencia significativa de que dos proteínas comparten un ancestro común. Se han desarrollado muchos programas de computación alternativos al BLAST que detectan relaciones entre proteínas que están más distantemente relacionadas entre sí de lo que BLAST puede detectar. El desarrollo de tales métodos es actualmente un área activa de la investigación en bioinformática.



Para ilustrar el poder de esta técnica, consideraremos el gen humano *NF1*. Las mutaciones en *NF1* se asocian con la enfermedad hereditaria neurofibromatosis 1, en la cual se desarrollan múltiples tumores en el sistema nervioso periférico, causando grandes protuberancias en la piel. Después de que se aisló y secuenció un clon de cDNA de *NF1*, se dedujo la secuencia de la proteína NF1 y se contrastó contra otras secuencias proteicas en el GenBank. Se descubrió que una región de la proteína NF1 tenía considerable homología con una porción de la proteína de levadura llamada Ira (Fig. 6-25). Estudios previos demostraron que Ira es una proteína con actividad GTPasa (GAP) que modula la actividad GTPasa de la proteína monomérica G llamada Ras (véase la Fig. 3-32). Como se analizará en detalle en el Capítulo 16, las proteínas GAP y Ras funcionan normalmente en el control de la replicación y la diferenciación celular en respuesta a señales de células vecinas. Los estudios funcionales sobre la proteína NF1 normal, obtenidos por expresión del gen de tipo salvaje clonado, demostraron que efectivamente regulaban la actividad de Ras, como lo sugería su homología con Ira. Estos hallazgos sugieren que los pacientes con neurofibromatosis expresan una proteína mutante NF1 en las células del sistema nervioso periférico, lo que conduce a la inapropiada división celular y formación de los tumores característicos de la enfermedad. ■

NF1 841 T R A T F M E V L T K I L Q Q G T E F D T L A E T V L A D R F E R L V E L V T M M G D Q G E L P I A 890
Ira 1500 I R I A F L R V F I D I V . . . T N Y P V N P E K H E M D K M L A I D D F L K Y I I K N P I L A F F 1546
891 M A L A N V V P C S Q W D E L A R V L V T L F D S R H L L Y Q L L W N M F S K E V E L A D S M Q T L 940
1547 G S L A . . C S P A D V D L Y A G G F L N A F D T R N A S H I L V T E L L K Q E I K R A A R S D D I 1594
941 F R G N S L A S K I M T F C F K V Y G A T Y L Q K L D P L L R I V I T S S D W Q H V S F E V D P T 990
1595 L R R N S C A T R A L S L Y T R S R G N K Y L I K T L R P V L O G I V D N K E . . . S F E I D . . 1638
991 R L E P S E S L E E N Q R N L L Q M T E K F . . . F H A I I S S S E F P P Q L R S V C H C L Y Q 1036
1639 K M K P G . . . S E N S E K M L D L F E K Y M T R L I D A I T S S I D D E P I E L V D I C K T I Y N 1685
1037 V V S Q R F P Q N S I G A V G S A M F L R F I N P A I V S P Y E A G I L D K K P P P R I E R G L K L 1086
1686 A A S V N F P E Y A Y I A V G S F V E L R F I G P A L V S P D S E N I I . I V T H A H D R K P F I T 1734
1087 M S K I L Q S I A N H V L F T K E E H M R P F N D . . . F V K S N F D A A R R F F 1124
1735 L A K V I Q S L A N G R E N I F K K D I L V S K E E F L K T C S D K I F N F L S E L C K I P T N N F 1784
1125 L D I A S D C P T S D A V N H S L S F I S D G N V L A L H R L L W N N . 1159
1785 T V N V R E D P T P I S F D Y S F L H K F F Y L N E F T I R K E I I N E S K L P G E F S F L K N T V 1834
1160 . . Q E K I G Q Y L S S N R D H K A V G R R P F . . . D K M A T L L A Y L G P P E H K P V A 1200
1835 M L N D K I L G V L G Q P S M E I K N E I P P F V V E N R E K Y P S L Y E F M S R Y A F K K V D 1882

FIGURA 6-25 Comparación de las regiones de la proteína humana NF1 y de la proteína Ira de *S. cerevisiae* que muestran gran similitud de secuencia. Las secuencias de NF1 e Ira se muestran en la parte superior e inferior de cada fila, respectivamente, en el código de aminoácidos de una letra (véase la Fig. 2-14). Los aminoácidos que son idénticos en las dos proteínas se resaltan en amarillo. Los aminoácidos con cadenas laterales químicamente similares

pero no idénticas están conectados con un punto azul. Los números de aminoácidos en las secuencias proteicas se muestran en los extremos izquierdos y derechos de cada fila. Los puntos negros indican "brechas" en la secuencia proteica insertados con el fin de maximizar el alineamiento de los aminoácidos homólogos. El valor p BLAST para estas dos secuencias es de 10^{-28} , lo cual indica un alto grado de similitud. (De G. Xu y cols., 1990, *Cell* 62:599)

Incluso cuando una proteína no muestra similitud significativa a otras proteínas con el algoritmo BLAST, puede no obstante compartir una secuencia corta que es funcionalmente importante. Tales segmentos cortos recurrentes en muchas proteínas diferentes, llamados como **motivos estructurales**, suelen tener funciones similares. Varios de tales motivos se describen en el Capítulo 3 y se ilustran en la Figura 3-9. Para investigar estos y otros motivos en una proteína nueva, los investigadores comparan la secuencia de proteínas con una base de datos de secuencias de motivos conocidos.

La comparación de secuencias relativas de diferentes especies puede brindar indicios acerca del parentesco evolutivo entre proteínas

Las búsquedas con BLAST de secuencias de proteínas relacionadas pueden revelar que las proteínas pertenecen a una familia de proteínas. Al comienzo, consideramos las familias de genes dentro de un organismo simple, usando los genes de la β -globina en los seres humanos como un ejemplo (véase la Fig. 6-4a). Pero en una base de datos que incluye las secuencias genómicas de múltiples organismos, las familias de proteínas también pueden reconocerse al ser compartidas entre organismos relacionados. Considérese, por ejemplo, las proteínas **tubulinas**; éstas son las subunidades básicas de los microtúbulos, que son componentes importantes del citoesqueleto (Cap. 18). De acuerdo al esquema simplificado en la Figura 6-26a, se cree que las células eucariontes más primitivas contenían un único gen de tubulina que se duplicó temprano en la evolución; subsiguientes divergencias de las diferentes copias del gen de la tubulina original formaron las versiones ancestrales de los genes de la α -y β -tubulina. Como a partir de estas células eucariontes tempranas surgieron diferentes especies, cada una de estas secuencias génicas divergieron aún más, dando origen a las formas levemente diferentes de las α -y β -tubulina que se encuentran actualmente en cada especie.

Todos los miembros diferentes de la familia de genes (o proteínas) de la tubulina son suficientemente similares en secuencia como para sugerir una secuencia ancestral común. Por lo tanto, todas estas secuencias se consideran **homólogas**. Más específicamente, las secuencias que presumiblemente surgieron como resultado de la duplicación génica (p. ej., las secuencias α -y β -tubulina) se describen como **parálogas**. Las secuencias que surgieron debido a la especiación (p. ej., los genes α -tubulina en diferentes especies) se describen como **ortólogas**. A partir del grado de relación de las secuencias de tubulinas presentes en diferentes organismos de la época actual, se pueden deducir las relaciones evolutivas, como se ilustra en la Figura 6-26b. De los tres tipos de parentesco de secuencias, las secuencias ortólogas son las que más probablemente comparten la misma función.

Los genes pueden identificarse dentro de secuencias del DNA genómico

La secuencia genómica completa de un organismo contiene la información necesaria para deducir la secuencia de cada proteína sintetizada en las células de ese organismo. Para muchos organismos tales como las levaduras y las bacterias, cuyos genomas tienen pocos intrones y cortas regiones intergénicas, la mayoría de las secuencias se pueden encontrar rastreando la secuencia genómica en búsqueda de **marcos abiertos de lectura (ORF)** de longitudes considerables. Un ORF suele definirse como un segmento que contiene al menos 100 codones que comienzan con un codón de inicio y terminan con un codón de terminación. Debido a que la probabilidad de que una secuencia aleatoria de DNA no contenga ningún codón de terminación cada 100 codones seguidos es muy baja, la mayoría de los ORF codifican proteína.

El análisis de los ORF identifica correctamente más del 90% de los genes en levaduras y bacterias. Sin embargo, algunos de los genes más

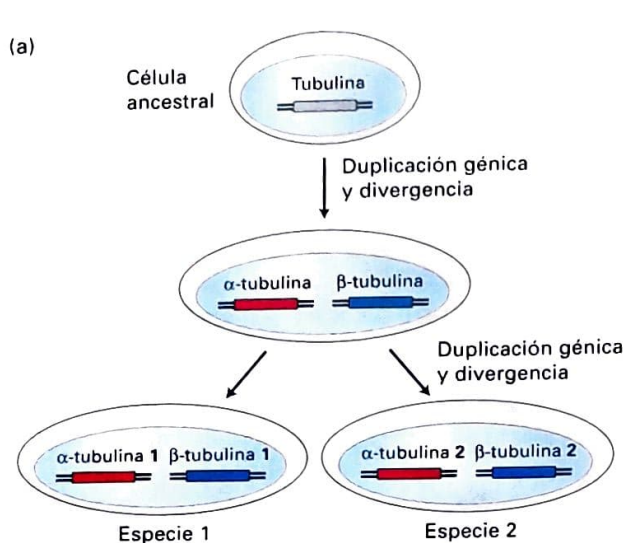
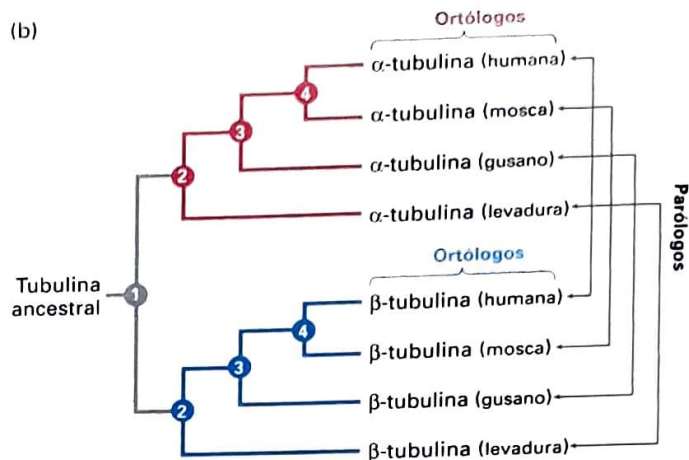


FIGURA 6-26 Generación de diversas secuencias de tubulina durante la evolución de los eucariontes. (a) Mecanismo probable que da origen a los genes de tubulina encontrados en las especies existentes. Es posible deducir que ocurrió un acontecimiento de duplicación génica antes de la especiación debido a que las secuencias de α -tubulina de diferente especies (p. ej., seres humanos y levadura) son más parecidas que las secuencias de α -tubulina y β -tubulina dentro de una especie. (b) Un árbol filogenético representando las relaciones entre las secuencias de tubulina. Los puntos de ramificación (nodos), indicados por número pequeños, representan genes ancestrales comunes al



momento que divergieron dos secuencias. Por ejemplo, el nodo 1 representa el acontecimiento de duplicación que da origen a las familias de α -tubulina y β -tubulina, y el nodo 2 representa la divergencia de las levaduras respecto de las especies multicelulares. Los corchetes y las flechas indican, respectivamente, los genes de tubulina ortólogos, que difieren como resultado de la especiación, y los genes parálogos, que difieren como resultado de la duplicación génica. Este diagrama está simplificado de alguna manera debido a que las moscas, gusanos y seres humanos en realidad contienen múltiples genes de α -tubulina y β -tubulina que surgieron a partir de acontecimientos de duplicación génica.

cortos no se detectan por este método y ocasionalmente surgen por casualidad marcos abiertos de lectura muy largos que no son realmente genes. Ambos tipos de tareas fallidas pueden corregirse por un análisis más sofisticado de la secuencia y por los análisis genéticos para la función génica. De los genes de *Saccharomyces* identificados de esta forma, alrededor de la mitad ya se conocían por algún criterio funcional como el fenotipo mutante. Estas funciones de algunas proteínas codificadas por los genes putativos restantes (sospechados) identificados por el análisis ORF se asignaron sobre la base de sus similitudes de secuencia a proteínas conocidas en otros organismos.

La identificación de genes en organismos con una estructura genómica más compleja requiere algoritmos más sofisticados que la búsqueda de marcos abiertos de lectura. Debido a que la mayoría de los genes en los eucariontes superiores están compuestos de múltiples exones relativamente cortos, separados en general por intrones no codificantes bastante largos, el rastreo de los ORF es un método deficiente para encontrar genes. Los mejores algoritmos para encontrar genes combinan todos los datos disponibles que podrían sugerir la presencia de un gen en un sitio genómico particular. La información relevante incluye el alineamiento o hibridación de una secuencia problema a un cDNA de longitud completa; el alineamiento a una secuencia de cDNA parcial, en general 200-400 pb en longitud, conocida como *etiquetas de secuencias expresadas* (EST, del inglés *expressed sequence tag*); la adaptación a modelos para exones, intrones y secuencias de sitio de corte y empalme; y la similitud de secuencia con otros organismos. Usando estos métodos bioinformáticos, los biólogos computacionales han identificado aproximadamente $\approx 19\,800$ genes que codifican proteína en el genoma humano.

Un método particularmente poderoso para la identificación de genes humanos es la de comparar la secuencia genómica humana con

la del ratón. Los seres humanos y los ratones están lo suficientemente emparentados como para tener la mayoría de los genes en común, aunque las secuencias mayormente no funcionales, como las secuencias intergénicas y los intrones, tenderán a ser muy diferentes debido a que estas secuencias no se encuentran bajo presión selectiva fuerte. Por eso es probable que los segmentos correspondientes al genoma humano y murino que exhiben alta similitud de secuencia sean funcionalmente importantes: los exones, las regiones de control de la transcripción, o las secuencias con otras funciones que aún no se comprenden bien.

El número de genes que codifican proteínas en el genoma de un organismo no está directamente relacionado a su complejidad biológica

La combinación de secuenciación genómica y algoritmos computacionales que encuentran genes ha producido el inventario completo de los genes que codifican proteínas para una variedad de organismos. La Figura 6-27 muestra que el número total de genes que codifican una proteína en diversos genomas eucariontes que han sido completamente secuenciados. Las funciones de cerca de la mitad de proteínas codificadas en estos genomas se conocen o se han predicho en base a comparaciones de secuencia. Una de las características sorprendentes dentro de diferentes organismos no parece ser proporcional a nuestra sensación intuitiva de su complejidad biológica. Por ejemplo, el nematodo *C. elegans* aparentemente tiene más genes que la mosca de la fruta *Drosophila*, que tiene un plan corporal y un comportamiento más complejo. Y los seres humanos tienen menos de una vez y media del

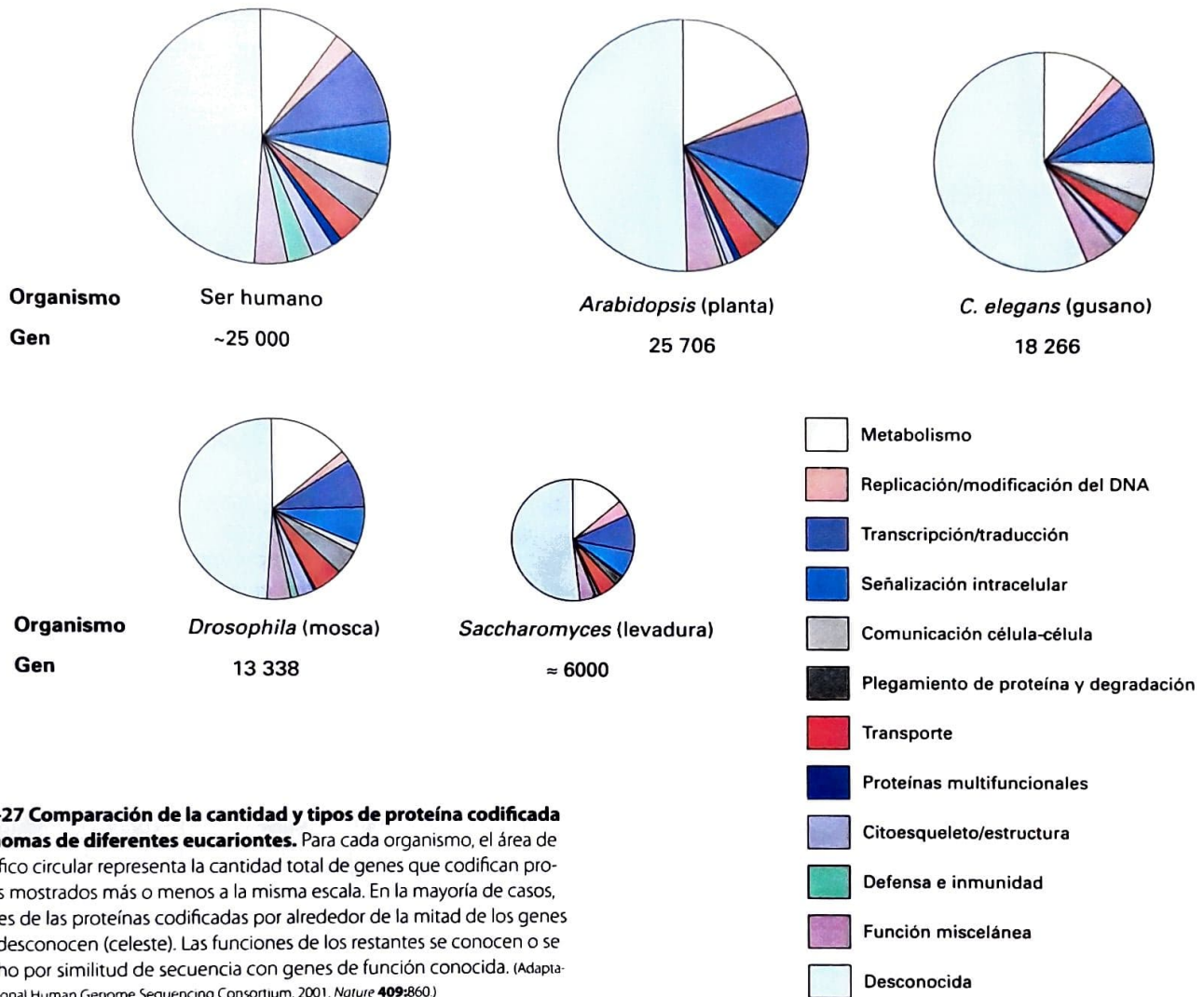


FIGURA 6-27 Comparación de la cantidad y tipos de proteína codificada en los genomas de diferentes eucariontes. Para cada organismo, el área de todo el gráfico circular representa la cantidad total de genes que codifican proteína, todos mostrados más o menos a la misma escala. En la mayoría de casos, las funciones de las proteínas codificadas por alrededor de la mitad de los genes todavía se desconocen (celeste). Las funciones de los restantes se conocen o se han predicho por similitud de secuencia con genes de función conocida. (Adaptado de International Human Genome Sequencing Consortium, 2001, *Nature* 409:860.)

número de genes de *C. elegans*. Cuando se tornó aparente por primera vez que los seres humanos tenían menos del doble de la cantidad de genes que codifican proteínas que el gusano simple, fue difícil entender como un pequeño incremento en el número de proteínas podía generar tal diferencia en la complejidad.

Claramente, las simples diferencias cuantitativas en el número de genes en los genomas de diferentes organismos eran inadecuadas para explicar las diferencias en la complejidad biológica. Sin embargo, diversos fenómenos pueden generar más complejidad en las proteínas expresadas de los eucariontes superiores de lo que se predice a partir de sus genomas. Primero, el corte y empalme alternativo de un premRNA puede dar múltiples mRNA funcionales correspondientes a un gen particular (Capítulo 8). Segundo, las variaciones en las modificaciones post traduccionales de algunas proteínas pueden producir diferencias funcionales. Finalmente, la creciente complejidad biológica es el resultado del número incrementado de células formadas por las mismas clases de proteínas. Mayores cantidades de células pueden interactuar en combinaciones más complejas, como sucede al comparar la corteza cerebral del ratón con la del hombre. En ambas cortezas cerebrales, murina y humana, se encuentran presentes células similares, pero en los seres humanos son más las que hacen conexiones más complejas. La evolución de la complejidad biológica creciente de los organismos

multicelulares probablemente requirió regulaciones de la replicación y la expresión génica de la célula cada vez más complejas, llevando a una complejidad creciente del desarrollo embrionario.

Las funciones específicas de muchos genes y proteínas identificadas por análisis de las secuencias genómicas aún no han sido determinadas. A medida que los investigadores desenredan las funciones de las proteínas individuales en diferentes organismos y el posterior detalle de sus interacciones con otras proteínas, los avances resultantes se podrán aplicar de inmediato a todas las proteínas homólogas en otros organismos. Cuando se conozca la función de cada proteína, sin dudas, emergerá una comprensión más sofisticada de las bases moleculares de los sistemas biológicos complejos.

CONCEPTOS CLAVES de la Sección 6.5

Genómica: análisis amplio del genoma de la estructura y la expresión génica

- La función de una proteína que no ha sido aislada (una proteína problema) suele predecirse en base a la similitud de su secuencia de aminoácidos con las secuencias de proteínas de función conocida.

- Un algoritmo computacional conocido como BLAST busca rápidamente en la base de datos las secuencias proteicas conocidas para encontrar aquellas con similitud significativa a una proteína problema.

- Las proteínas con motivos funcionales comunes, que suelen ser bastante cortos, pueden no identificarse en una búsqueda BLAST típica. Estas secuencias cortas pueden ser localizadas en búsquedas en bases de datos de motivos.

- Una familia de proteínas abarca múltiples proteínas que derivan de la misma proteína ancestral. Los genes codificados por estas proteínas, que constituyen la familia de genes correspondiente, surgen por un acontecimiento de duplicación génica inicial y posterior divergencia durante la especiación (véase la Fig. 6-26).

- Los genes emparentados y sus proteínas codificadas que derivan de un acontecimiento de duplicación génica son parálogos, como las α - y β -globinas que se combinan en la hemoglobina ($\alpha_2\beta_2$); aquellos que derivan de mutaciones que se acumularon durante la especiación son ortólogos. Las proteínas que son ortólogas suelen tener una función similar en diferentes organismos, como las β -globinas en los seres humanos adultos y los ratones.

- Los marcos abiertos de lectura (ORF) son regiones del DNA genómico que contienen al menos 100 codones localizados entre un codón de inicio y un codón de terminación.

- La búsqueda por computadora de las secuencias genómicas enteras bacteriana y de levadura a través de marcos abiertos de lectura (ORF) identifican correctamente la mayoría de los genes que codifican proteínas. Se deben usar diversos tipos de información adicional para identificar los genes probables (putativo) en las secuencias genómicas de los seres humanos y otros eucariontes superiores debido a su estructura génica más compleja, en la cual los exones codificantes relativamente cortos están separados por intrones no codificantes, relativamente largos.

- El análisis de las secuencias genómicas completas para diferentes organismos indica que la complejidad biológica no está directamente relacionada al número de genes que codifican proteína (véase la Fig. 6-27).

6.6 Organización estructural de los cromosomas eucariontes

Ahora que hemos analizado los diversos tipos de secuencias de DNA que se encuentran en los genomas eucariontes y cómo se organizan dentro de él, abordamos la pregunta de cómo se organizan las moléculas de DNA dentro de las células eucariontes. Debido a que la longitud total de DNA celular es hasta cien mil veces el diámetro de una célula, el empaquetamiento del DNA es crítico para la arquitectura celular. También es esencial evitar que las largas moléculas de DNA se anuden o se enreden unas con otras durante la división celular, cuando deben ser precisamente segregadas hacia las células hijas. La tarea de compactación y organización de DNA cromosómico es realizada por proteínas nucleares llamadas histonas. El complejo de histonas y DNA se denomina **cromatina**.

La cromatina, que es aproximadamente mitad DNA y mitad proteína, en masa, está dispersada por casi todo el núcleo en las células en interfase (aquellas que no están atravesando mitosis). El posterior plegamiento y compactación de la cromatina durante la mitosis produce los *cromosomas metafásicos* visibles, cuyas características morfológicas y de tinción fueron detalladas por los primeros citogenetistas. Aunque cada cromosoma eucarionte incluye millones de moléculas de proteína individual, cada cromosoma contiene sólo una molécula de DNA lineal, extremadamente larga. Las moléculas de DNA más largas en los cromosomas humanos, por ejemplo, son de $2,8 \times 10^8$ pares de bases, ¡o casi 10 cm de longitud! La organización estructural de la cromatina permite que esta vasta longitud de DNA sea compactada dentro de las restricciones microscópicas de un núcleo celular (véase la Fig. 6-1). De todos modos, la cromatina está organizada de tal forma que las secuencias de DNA específicas dentro de ella están disponibles rápidamente para los procesos celulares como la transcripción, replicación, reparación y recombinación de las moléculas de DNA. En esta sección, describiremos las propiedades de la cromatina y su organización dentro de los cromosomas. Las características importantes de los cromosomas en su totalidad se tratan en la siguiente sección.

La cromatina existe en las formas extendida y condensada

Cuando se aísla el DNA del núcleo eucarionte usando un método que preserva las interacciones DNA-proteína, se asocia con una masa igual de proteínas en el complejo nucleoproteína conocido como cromatina. Las histonas, las proteínas más abundantes en la cromatina, constituyen una familia de pequeñas proteínas básicas. Los cinco principales tipos de proteínas histonas, llamadas H1, H2A, H2B, H3 y H4 son ricos en aminoácidos básicos cargados positivamente, que interactúan con los grupos fosfatos cargados negativamente en el DNA.

Cuando la cromatina se extrae del núcleo y se la examina en el microscopio electrónico, su apariencia depende de la concentración salina a la cual se la expone. A concentraciones salinas bajas en ausencia de cationes divalentes como Mg^{+2} , la cromatina aislada se asemeja a “perlas en un collar” (Fig. 6-28a). En esta forma extendida, el collar está compuesto de DNA libre llamado DNA “conector” que une estructuras similares a las perlas llamadas *nucleosomas*. Los nucleosomas compuestos por DNA e histonas tienen alrededor de 10 nm de diámetro y son las unidades estructurales primarias de la cromatina. Si la cromatina se aísla a concentración salina fisiológica, asume una forma tipo fibra más condensada que tiene un diámetro de 30 nm (Fig. 6-28b).

Estructura de los nucleosomas El componente de DNA de los nucleosomas es mucho menos susceptible a la digestión por nucleasa que el DNA conector entre ellos. Si el tratamiento con nucleasa se controla cuidadosamente, se pueden digerir todos los DNA conectores, liberando los nucleosomas individuales con su componente de DNA. Un nucleosoma consiste de un núcleo o centro proteico con DNA enrollado alrededor de su superficie como un hilo alrededor de un carrete. El centro es un octámero que contiene dos copias de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4. La cristalografía de rayos X ha demostrado que el centro octamérico de histonas es una estructura más o menos en forma de disco hecha de subunidades de histonas entrelazada (Fig. 6-29). Los nucleosomas de todos los eucariontes contienen ≈ 147 pares de bases de DNA enroscados, algo menos de dos vueltas alrededor del centro de la

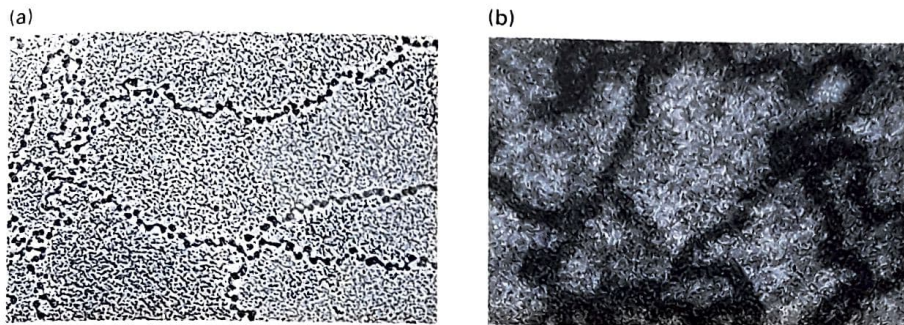


FIGURA EXPERIMENTAL 6-28 Las formas extendidas o condensadas de la cromatina extraída tienen apariencias muy diferentes en las microfotografías electrónicas. (a) La cromatina aislada en un tampón de baja fuerza iónica tiene una apariencia de "perlas en un collar". Las "perlas" son nucleosomas (10-nm de diámetro) y el collar es el DNA que conecta (conector). (b) La cromatina aislada en tampón con fuerza iónica fisiológica (0,15 M de KCl) aparece como una fibra condensada de 30 nm de diámetro. (Parte [a] cortesía de S. McKnight y O. Miller, Jr. Parte [b] cortesía de B. Hamkalo y J. B. Rattner)

proteína. La longitud del DNA conector es más variable entre especies, e incluso entre diferentes células de un organismo, variando entre 10 a 90 pares de bases. Durante la replicación celular, el DNA se ensambla dentro de los nucleosomas corto tiempo después de que pasa la horquilla de replicación (véase la Fig. 4-33). Este proceso depende de histonas específicas chaperonas que se unen a las histonas y las ensamblan juntas con DNA recientemente replicado dentro de los nucleosomas.

Estructura de la fibra de 30 nm Cuando se extrae la cromatina, las células de las células en tampones isotónicos (p. ej., tampones con la misma concentración salina que se encuentra en las células, $\approx 0,15$ M KCl, 0,004 M $MgCl_2$), la mayoría de los cromosomas aparecen como fibras de ≈ 30 nm en diámetro (véase la Fig. 6-28b). La investigación actual, incluyendo la cristalografía de rayos X de los nucleosomas ensambla-

dos a partir de las histonas recombinantes, indica que la fibra de 30 nm tiene una estructura de "cinta en zigzag" que se enrolla en una hélice con "dos inicios" compuesta por dos "hebras" de nucleosomas apilados uno encima de otro como monedas. Las dos hebras de los nucleosomas apilados se enrolla luego en una doble hélice similar a las dos hebras en la doble hélice de DNA, excepto que la hélice gira hacia la izquierda, en lugar de hacia la derecha como en el DNA (Fig. 6-30). Las fibras de 30 nm también incluyen H1, la quinta de las principales histonas. H1 se une al DNA a medida que entra y sale el centro del nucleosoma, pero su estructura en la fibra de 30 nm no se conoce bajo resolución atómica.

La cromatina en las regiones cromosómicas que no se están transcribiendo o replicando existe predominantemente en la forma de fibra de 30 nm, condensada y en estructuras con plegamientos de orden superior, cuyas conformaciones detalladas no se comprenden aún. Se cree

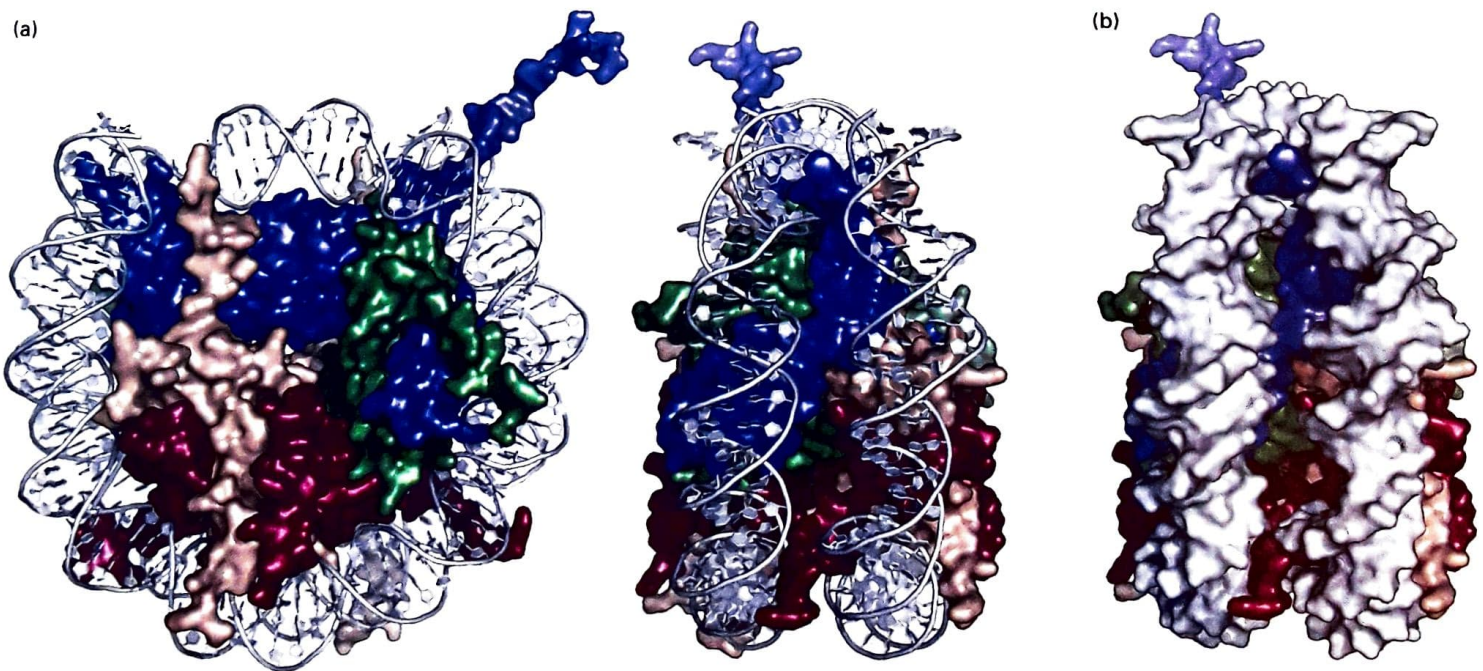


FIGURA 6-29 Estructura del nucleosoma en base a cristalografía de rayos X. (a) Nucleosoma con modelo espacial de las histonas. El esqueleto de azúcar fosfato de las hebras de DNA se representan como tubos blancos para permitir una mejor visualización de las histonas. Los nucleosomas se muestran desde arriba (izquierda) y de costado (derecha, rotado 90° en sentido de las agujas de reloj). Las subunidades H2A son amarillas; las H2B son rojas; H3s son

azules; H4s son verdes. Las colas N-terminales de las ocho histonas y las colas C-terminales de H2A y H2B, involucradas en la condensación de la cromatina, no son visibles debido a que están desordenadas en el cristal. (b) Modelo espacial de las histonas y el DNA (blanco) visto desde el costado de los nucleosomas.

(Partes [a] y [b] de K. Luger y cols. 1997, *Nature* **389**:251)

que las regiones de la cromatina que se están transcribiendo de manera activa adoptan la forma extendida de perlas en collar.

Conservación de la estructura de la cromatina La estructura general de la cromatina es notablemente similar en las células de todos los eucariontes, incluyendo hongos, plantas y animales, lo que indica que la estructura de la cromatina fue optimizada temprano en la evolución de las células eucariontes. Las secuencias de aminoácidos para las cuatro histonas (H2A, H2B, H3 y H4) están altamente conservadas entre especies relacionadas. Por ejemplo, las secuencias de la histona H3 del tejido de erizo de mar y de timo de ternera difieren en sólo un aminoácido, y H3 de guisante de jardín y timo de ternera difieren en sólo cuatro aminoácidos. Aparentemente, las desviaciones significativas de las secuencias aminoácídicas de las histonas fueron fuertemente seleccionadas en contra durante la evolución. La secuencia de aminoácidos de H1, sin embargo, varía más de organismo en organismo respecto de las secuencias de las otras histonas. La similitud en la secuencia entre las histonas de todos los eucariontes sugiere que fueron plegadas en conformaciones tridimensionales muy similares, que fueron optimizadas para la función de histonas temprano en la evolución, en un ancestro común de todos los eucariontes modernos.

También existen variantes minoritarias de las histonas codificadas por genes que difieren de los principales tipos altamente conservados, en particular de los vertebrados. Por ejemplo, una forma especial de H2A, designada H2AX, es incorporada a los nucleosomas en lugar de la H2A en una pequeña fracción de nucleosomas en todas las regiones de la cromatina. En sitios de rupturas de la doble hebra de DNA en los cromosomas, la H2AX se fosforila y participa en el proceso de reparación del cromosoma, probablemente funcionando como un sitio de unión para proteínas de reparación. En los nucleosomas en el centrómero, H3 es reemplazada por otra variante de histona llamada CENP-A, que participa en la unión de los microtúbulos del huso durante la mitosis. La mayoría de las variantes de histonas difieren sólo levemente en la secuencia respecto de las principales histonas. Estos leves cambios en la secuencia de la histona puede influenciar la estabilidad del nucleosoma como así también su tendencia a plegarse en la fibra de 30 nm y otras estructuras de orden superior.

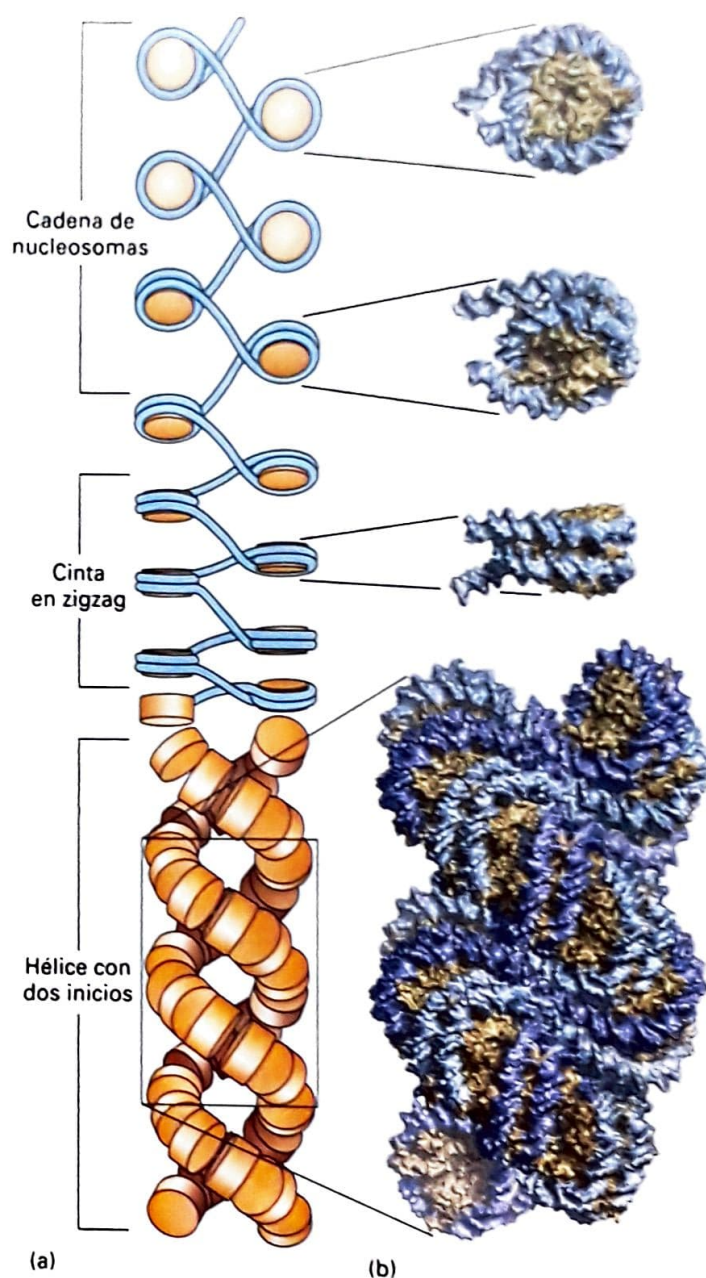


FIGURA 6-30 Estructura de la fibra de cromatina de 30 nm. (a) Modelo para el plegamiento de una cadena de nucleosomas en la parte superior en una "cinta en zigzag" de nucleosomas que luego se pliegan en una hélice con dos comienzos. (b) Modelo de la fibra de 30 nm en base a la cristalografía de rayos X de un tetranucleosoma (un segmento corto de cuatro nucleosomas). [Parte (a) adaptada de C. L. F. Woodcock y cols., 1984, *J. Cell Biol.* **99**:42. Parte (b) de T. Schachl y cols., 2005, *Nature* **436**:138.]

Las modificaciones de las colas de histonas controlan la condensación y la función de la cromatina

Cada una de las proteínas de histona que conforman el núcleo del nucleosoma contiene un extremo N-terminal flexible de 19-39 residuos que se extienden a partir de la estructura globular del nucleosoma; las proteínas H2A y H2B también contienen un extremo C-terminal flexible que se extiende a partir del núcleo octamérico de la histona globular. Estos extremos, llamados *colas de histonas*, se representan en el modelo que se muestra en la Figura 6-31a. Las colas de histonas son necesarias para que la cromatina se condense desde la conformación de perlas en un collar a la de fibra de 30 nm. Estas lisinas cargadas positivamente interactúan con una pieza negativa en la interfase H2A-H2B del siguiente nucleosoma en los nucleosomas apilados de la fibra de 30 nm (véase la Fig. 6-30).

Las colas de las histonas también sufren modificaciones post traduccionales como la acetilación, la metilación, la fosforilación y la ubiquitinación. La Figura 6-31b resume los tipos de modificaciones post traduccionales que se observan en las histonas humanas. Una

proteína histona particular nunca tiene todas estas modificaciones en forma simultánea, pero las histonas en un solo nucleosoma suelen contener varias de estas modificaciones simultáneamente. Se ha sugerido que las combinaciones particulares de modificaciones post traduccionales que se encuentran en diferentes regiones de la cromatina constituyen un *código de histona* que influye en la función de la cromatina al crear o eliminar los sitios de unión de las proteínas asociadas a la cromatina, las cuales dependen de las combinaciones específicas de estas modificaciones presentes. Aquí se describen las clases más abundantes de modificaciones encontradas en las colas de

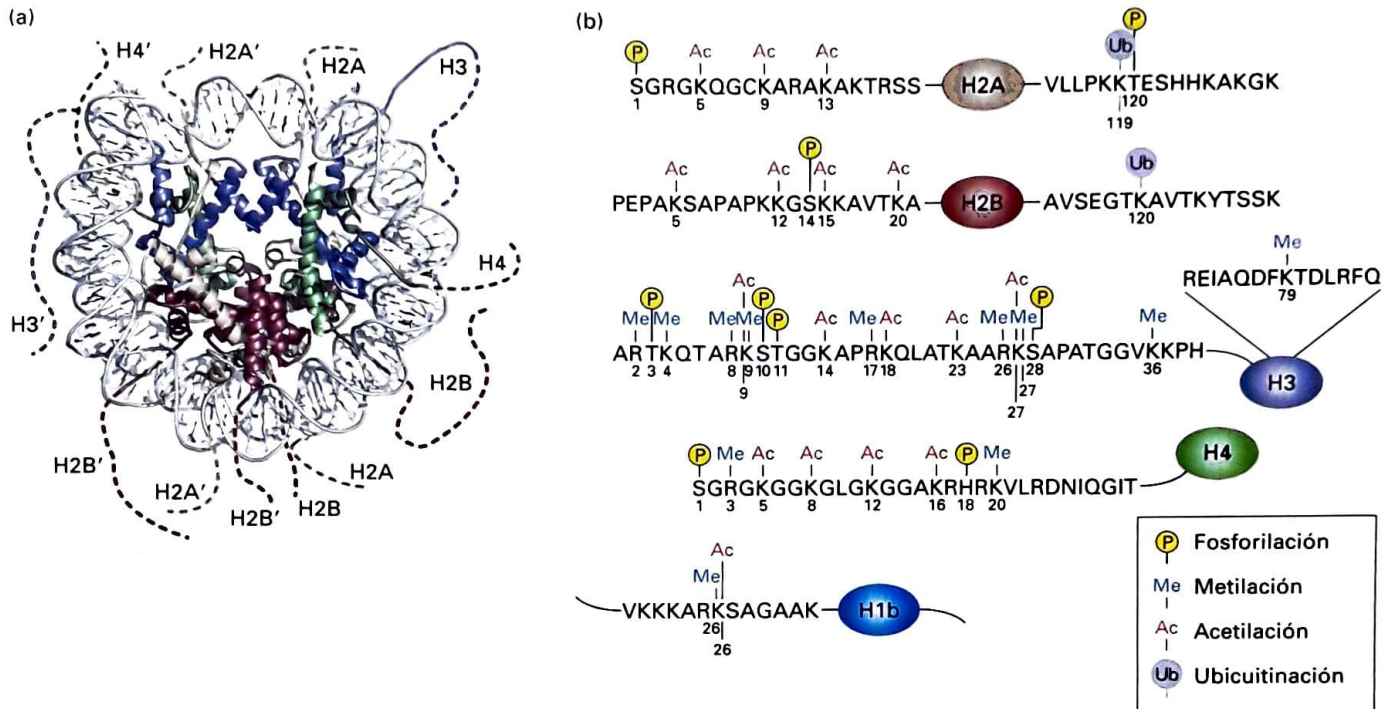


FIGURA 6-31 Modificaciones post traduccionales observadas en las histonas humanas. (a) Modelo de un nucleosoma visto desde arriba con las histonas mostradas como diagrama de cintas. Este modelo describe las longitudes de las colas de histonas (líneas de puntos), que no son visibles en la estructura cristalina (véase la Fig. 6-29). Las colas N-terminales de H2A están en la parte inferior y las colas C-terminales de H2A están en la parte superior. Las colas N-terminales de H2B están a la derecha y a la izquierda, y las colas C-terminales están abajo al centro. Las histonas H3 y H4 tienen colas C-terminales cortas que

no están modificadas. (b) Resumen de las modificaciones post traduccionales observadas en las histonas humanas. Las secuencias de colas de histonas se muestran en código de aminoácidos de una letra (véase la Fig. 2-14). La principal porción de cada histona se describe como un óvalo. Estas modificaciones no ocurren todas simultáneamente en una única molécula de histona. Sino que son combinaciones específicas de una pocas de estas modificaciones que se observan en cualquiera histona. (Parte [a] de K. Luger y T. J. Richmond, 1988, *Curr Opin Genet Devel* 8:140. Parte [b] adaptado de R. Margueron y cols., 2005, *Curr Opin Genet Devel* 15:163.)

histonas y cómo estas modificaciones controlan la condensación y la función de la cromatina. Finalizamos con una descripción de un caso especial de condensación de la cromatina, la inactivación de los cromosomas en los mamíferos hembra.

Acetilación de histonas Las lisinas de las colas de histona sufren acetilación y desacetilación reversible mediante enzimas que actúan en lisinas específicas en el extremo N-terminal. En la forma acetilada, la carga positiva del grupo ε-amino de la lisina está neutralizada. Como se mencionó anteriormente, la lisina 16 en la histona H4 es particularmente importante para el plegamiento de la fibra de 30 nm debido a que interactúa con el parche cargado negativamente en la superficie del nucleosoma vecino en la fibra. En consecuencia, cuando la lisina 16 de la H4 está acetilada, la cromatina tiende a formar la conformación menos condensada de "perlas en un collar" conducente para la replicación y la transcripción.

La acetilación de histonas en otros sitios en la H4 y en otras histonas (véase la Fig. 6-31a) se correlaciona con la aumentada sensibilidad del DNA de la cromatina a la digestión por parte de las nucleasas. Este fenómeno se puede demostrar al digerir núcleos aislados con DNasa I. Después de la digestión, el DNA se separa por completo de las proteínas de la cromatina, mediante digestión con una enzima de restricción, hasta terminar y se analizan mediante transferencia

Southern. Un gen intacto tratado con enzima de restricción produce fragmentos de tamaños característicos. Si los núcleos aislados se exponen primero a DNasa, el gen se puede cortar en sitios aleatorios dentro de los límites de los sitios de corte de la enzima de restricción. En consecuencia, se perderán las bandas de Southern blot que normalmente se visualizan con ese gen. Este método se usó por primera vez para demostrar que el gen de la β-globina transcripcionalmente inactivo en las células no eritroides, donde está asociado con histonas relativamente desacetiladas, es mucho más resistente a la DNasa I que el gen de la β-globina transcripcionalmente activo, en las células precursoras eritroides, donde está asociada con histonas acetiladas (Fig. 6-32). Estos resultados indican que la estructura de la cromatina del DNA que no está siendo transcrito en la cromatina *hipoacetilada* torna al DNA menos accesible para la pequeña enzima DNasa I (≈ 10 kD) que al DNA transcrito, el de la cromatina *hiperacetilada*. Se cree que es así debido a que la cromatina que contiene al gen reprimido está plegada en estructuras condensadas que inhiben estéricamente el acceso al DNA asociado a la nucleasa. Por el contrario, el gen que se transcribe está asociado a una forma de la cromatina menos plegada, que permite un mejor acceso de la nucleasa al DNA asociado. Presumiblemente, la estructura condensada de la cromatina en células no eritroides también impide estéricamente el acceso al promotor y otras secuencias de control de la transcripción en el DNA a las protei-

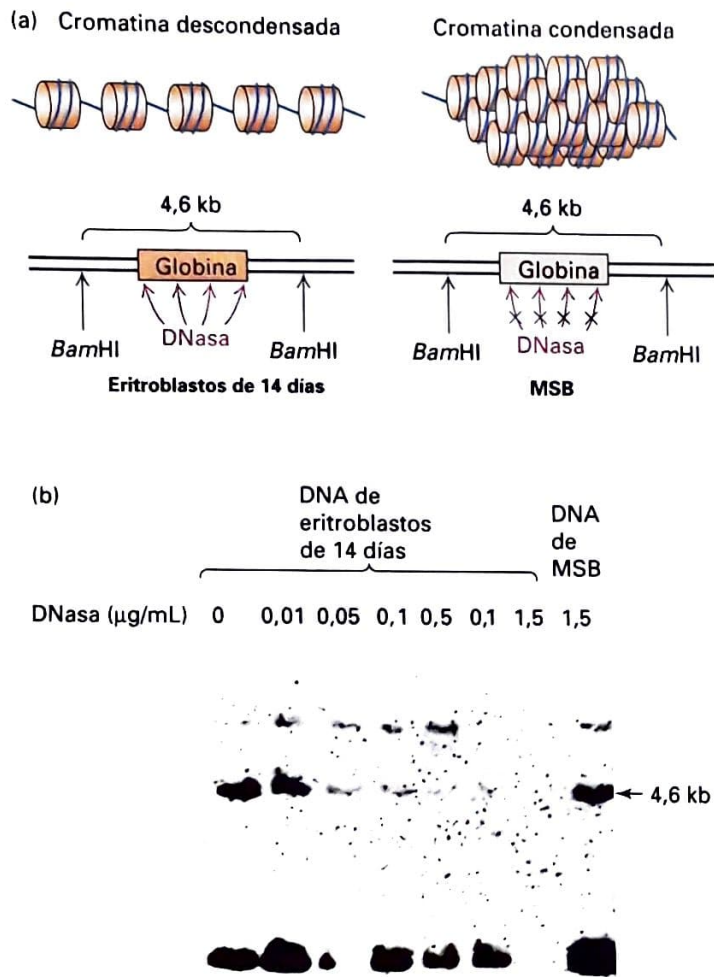


FIGURA EXPERIMENTAL 6-32 Los genes que no se transcriben son menos susceptibles a la digestión por DNasa I que los genes activos. Los eritroblastos de embrión de pollo de 14 días sintetizan activamente globina, mientras que las células de leucemia linfoblástica de pollo (MSB) indiferenciadas no lo hacen. (a) Los núcleos de cada tipo de célula se aislaron y se expusieron a concentraciones crecientes de DNasa I. El DNA nuclear se extrajo luego y se trató con la enzima de restricción *Bam*HI, que escinde el DNA alrededor de la secuencia de globina y normalmente libera un fragmento de globina de 4,6 kb. (b) El DNA digerido con DNasa I y la *Bam*HI se somete a análisis de Southern blot con una sonda de DNA de globina adulta clonada marcada, que se hibrida al fragmento de *Bam*HI de 4,6 kb. Si el gen de globina es susceptible a la digestión inicial por DNasa, podría ser escindido repetidamente y no se esperaría que muestre este fragmento. Como se ve en el Southern blot, el DNA transcripcionalmente activo de las células de 14 días que sintetizan globina fue sensible a la digestión con DNasa I, indicado por la ausencia de la banda de 4,6 kb a concentraciones elevadas de nucleasa. Por el contrario, el DNA inactivo de las células MSB fue resistente a la digestión. Estos resultados sugieren que el DNA inactivo está en una forma de cromatina más condensada en la cual el gen de globina está protegido de la digestión por DNasa I. (Véase J. Stalder y cols., 1980, *Cell* 19:473; fotografía cortesía de H. Weintraub.)

nas involucradas en la transcripción, contribuyendo a la represión de la transcripción (Capítulo 7).

Estudios genéticos en levaduras indican que la *histona acetil transferasa (HAT)*, que acetila residuos de lisina específicos en las histonas, es necesaria para la activación completa de la transcripción de numerosos genes. Se sabe ahora que estas enzimas se sabe tienen

otros sustratos que influyen en la expresión génica además de las histonas. En consecuencia, se las conoce de manera más general como lisina acetil transferasa nuclear o KAT debido a que K representa a la lisina en el código de una letra para los aminoácidos (Fig. 2-14). Por otro lado, estudios genéticos anteriores en levadura indicaron que la represión completa de muchos genes de levadura requieren la acción de *histonas desacetilasas (HDA)* que eliminan grupos acetilos de las lisinas acetiladas de las colas de histonas, como se analizará en el Capítulo 7.

Otras modificaciones de histonas Como se muestra en la Figura 6-31b, las colas de histonas en la cromatina pueden sufrir una variedad de otras modificaciones covalentes en aminoácidos específicos. Los grupos ϵ -amino de la lisina se pueden etilar, un proceso que previene la acetilación, por lo tanto mantienen sus cargas positivas. Más aún, el N de los grupos ϵ -amino de la lisina se pueden metilar una, dos o tres veces. Las cadenas laterales de la arginina también se pueden metilar. El O en los grupos hidroxilos (OH) de las cadenas laterales de la serina y la treonina se pueden fosforilar de forma reversible, introduciendo dos carga negativas. Cada una de estas modificaciones postraduccionales contribuyen a la unión de las proteínas asociadas a la cromatina que participan en el control del plegamiento de la cromatina y en la capacidad de las DNA y RNA polimerasas de replicar o transcribir el DNA asociado. Finalmente, una molécula de 76 aminoácidos ubiquitina se puede añadir reversiblemente a una lisina en las colas C-terminales de las H2A y H2B. Recuérdese que la adición de múltiples moléculas de ubiquitina unidas a una proteína pueden marcarla para la degradación por parte de las proteasas (véase la Fig. 3-29b). En este caso, no obstante, la adición de una única molécula de ubiquitina no afecta la estabilidad de la histona, pero sí afecta la estructura de la cromatina.

Como se mencionó anteriormente, lo que ayuda a controlar la condensación, o compactación, de la cromatina y su capacidad para la transcripción, la replicación y la reparación es la precisa combinación de los aminoácidos modificados en las colas de las histonas. Esto se puede observar mediante microscopía electrónica y óptica usando colorantes que se unen al DNA. Las regiones condensadas de la cromatina conocidas como **hetercromatina** se tiñen de forma mucho más oscura en comparación con la cromatina menos condensada, conocida como **eucromatina** (Fig. 6-33a). La heterocromatina no se descondensa por completo a continuación de la mitosis, sino que permanece en un estado de compactación durante la interfase y en general se asocia con la envoltura nuclear, el nucléolo y distintos focos adicionales. La hetercromatina incluye los centrómeros y télómeros de los cromosomas, como así también los genes inactivos desde el punto de vista de la transcripción. Por el contrario, las regiones de la eucromatina, que se encuentran en un estado de menor compactación durante la interfase, se tiñen ligeramente con colorantes para DNA. La mayoría de las regiones que se transcriben se encuentran en la eucromatina. La heterocromatina suele contener histonas H3 modificadas por metilación de la lisina 9 o 27, mientras que la eucromatina suele contener histonas H3 acetiladas en gran parte en las lisinas 9 o 14, y en menor extensión las otras lisinas de la H3, la metilación de la lisina 4 y la fosforilación de la serina 10 (Fig. 6-33b). Otras colas de histonas también se modifican específicamente en la eucromatina versus la heterocromatina. Por ejemplo, la lisina 16 de la H4 no suele estar acetilada en la heterocromatina, permitiendo que interactúe con los nucleosomas vecinos y estabilice el plegamiento de la cromatina en la forma de fibra de 30 nm (Fig. 6-30).

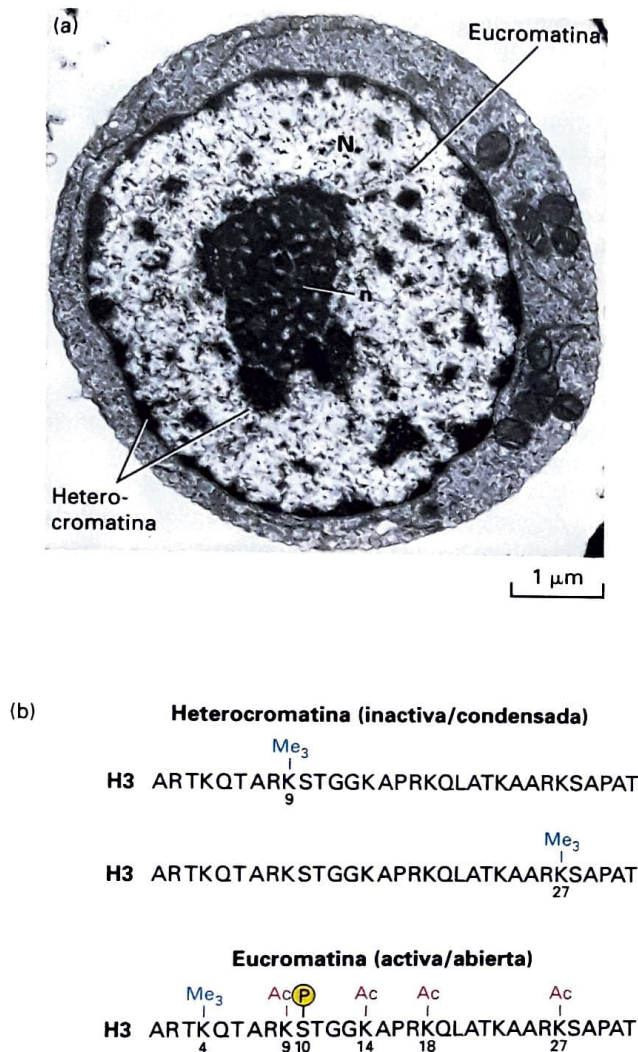


FIGURA 6-33 La heterocromatina versus la eucromatina. (a) En esta micrografía electrónica de una célula madre de médula ósea, las zonas teñidas de oscuro en el núcleo (N) fuera del nucléolo (n) son heterocromatina. Las zonas de tinción clara, blancuzca son eucromatina. (b) Las modificaciones de las colas N-terminales de las histonas difieren en la heterocromatina y la eucromatina, como se ilustra aquí para la histona H3. Nótese en particular que las colas de histonas suelen estar mucho más acetiladas en la eucromatina en comparación con la heterocromatina. La heterocromatina está mucho más condensada (por lo tanto menos accesible a las proteínas) y es mucho menos activa desde el punto de vista de la transcripción respecto de la eucromatina. (Parte [a] P. C. Cross y K. L. Mercer, 1993, *Cell and Tissue Ultrastructure*, W. H. Freeman and Company, p. 165. Parte [b] adaptado de T. Jenuwein and C. D. Allis, 2001, *Science* **293**:1074.)

Lectura del código de histona El código de histonas de los aminoácidos modificados en las colas de histonas es “leído” por proteínas que se unen a las colas modificadas y a su vez estimulan la condensación o la descondensación de la cromatina, formando estructuras “cerradas” o “abiertas”, a juzgar por su sensibilidad a la digestión con DNasa I en los núcleos aislados (véase la Fig. 6-32). Los eucariontes superiores expresan una cantidad de proteínas que contienen un *cromodominio* que se une a las colas de histonas cuan-

do están metiladas en lisinas específicas. Un ejemplo es la *proteína 1 heterocromatina* (HP1). Además de las histonas, la HP1 es una de las principales proteínas asociadas a la heterocromatina. El cromodominio de HP1 se une a la cola N-terminal de la H3 sólo cuando está trimetilada en la lisina 9 (véase la Fig. 6-33b). La HP1 también contiene un segundo dominio llamado *dominio cromoshadow* debido a que con frecuencia se encuentra en las proteínas que contienen un cromodominio. El dominio *cromoshadow* se une a otros dominios *cromoshadow*. En consecuencia, la cromatina que contiene H3 trimetilada en la lisina 9 (H3K9Me₃) se ensambla en una estructura de cromatina condensada mediante HP1, aunque la estructura de esta cromatina no se comprende bien (Fig. 6-34a).

Además de unirse a sí mismo, el dominio *cromoshadow* también se une a la enzima que metila la lisina 9 de la H3, una H3K9 *histona metil transferasa* (HMT). Por consiguiente, los nucleosomas adyacentes a una región de heterocromatina conteniendo HP1 también se torna metilada en la lisina 9 (Fig. 6-34b). Esto crea un sitio de unión para otra HP1 que puede unir la histona metil transferasa H3K9, dando como resultado una “propagación” de la estructura de heterocromatina a lo largo del cromosoma hasta que se encuentra un *elemento límite* que bloquea que la propagación se extienda más. Los elementos límites, caracterizados hasta ahora, suelen ser regiones en la cromatina donde diversas proteínas no histonas se unen al DNA, posiblemente bloqueando la metilación de histonas del otro lado del límite.

Significativamente, el modelo de la formación de la heterocromatina en la Figura 6-34b proporciona una explicación de cómo las regiones de la heterocromatina de un cromosoma se restablecen a continuación de la replicación del DNA durante la fase S del ciclo celular. Cuando el DNA en la heterocromatina se replica, los octámeros de histona que están trimetilados en la lisina 9 de la H3 se distribuyen en ambos cromosomas hijos junto con un número igual de octámeros de histona recién ensamblados. La histona metil transferasa H3K9, asociada con los nucleosomas trimetilados, metila la lisina 9 de los nucleosomas recién ensamblados, regenerando la heterocromatina en ambos cromosomas hijos. En consecuencia, la heterocromatina está marcada con un *código epigenético*, llamado así debido a que no depende de la secuencia de bases en el DNA, que mantiene la represión de los genes asociados en las células hijas replicadas.

Otros dominios proteicos se asocian con las modificaciones de colas de histonas típicas de la eucromatina. Por ejemplo, el *bromodominio* se une a las colas de histonas acetiladas y por lo tanto está asociado con cromatina transcripcionalmente activa. Diversas proteínas involucradas en la estimulación de la transcripción de genes contienen bromodominios, como la subunidad más grande del TFIID (véase el Cap. 7). Este *factor de transcripción* contiene dos bromodominios muy cercanos que probablemente ayuden a TFIID a asociarse con la cromatina transcripcionalmente activa (p. ej., la eucromatina). Esta proteína y otras que contienen bromodominio también tienen actividad histona acetilasa, que contribuye a mantener la cromatina en un estado hipermetilado propicio para la transcripción. En consecuencia, un código epigenético asociado con la eucromatina ayuda a mantener la actividad transcripcional de los genes en la eucromatina a través de sucesivas divisiones celulares. Estos códigos epigenéticos para la heterocromatina y la eucromatina ayudan a mantener los patrones de expresión génica establecidos en diferentes tipos de células durante el desarrollo embrionario temprano a medida que específicos tipos celulares diferenciados se incrementan en número a través de la división celular. Es importante destacar que se ha encontrado

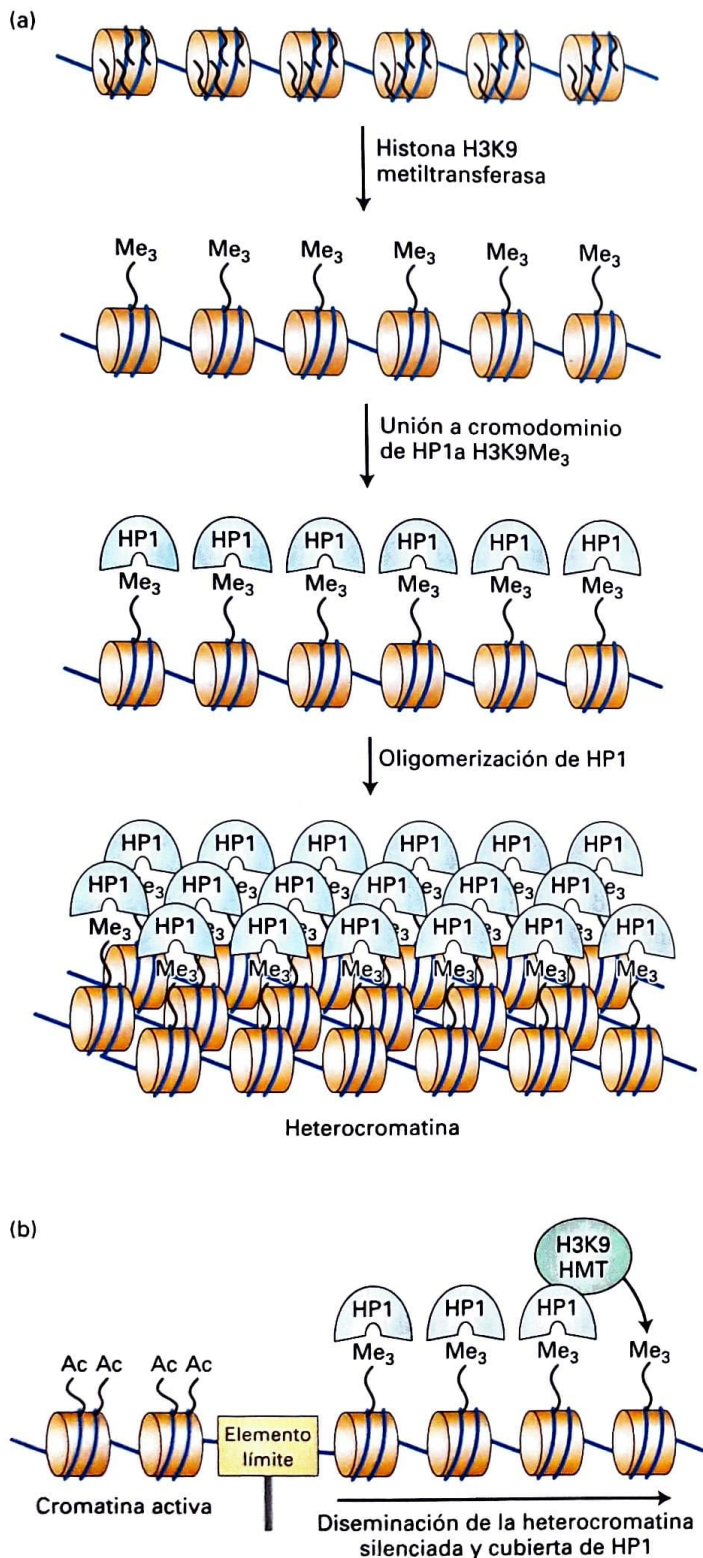


FIGURA 6-34 Modelo para la formación de heterocromatina mediante la unión de HP1 a la histona H3 trimetilada en la lisina 9. (a) La HP1 contribuye a la condensación de la heterocromatina mediante la unión a las colas N-terminales trimetiladas en la lisina 9 de la histona H3, seguida por la asociación a la HP1 unida a la histona. (b) La condensación de la heterocromatina puede diseminarse a lo largo de un cromosoma debido a que HP1 se une a una histona metiltransferasa (HMT) que metila la lisina 9 de la histona H3. Esto crea un sitio de unión para HP1 en el nucleosoma vecino. El proceso de diseminación continúa hasta que se encuentra un "elemento límite". (Parte [a] adaptado de G. Thiel y cols., 2004, *Eur. J. Biochem.* **271**:2855. Parte [b] adaptado de A. J. Bannister y cols., 2001, *Nature* **410**:120)

que alteraciones anormales en estos códigos epigenéticos contribuyen a la replicación patológica y al comportamiento de las células cancerosas (Capítulo 24).

En resumen, múltiples tipos de modificaciones covalentes de las colas de histonas pueden influir en la estructura de la cromatina al alterar las interacciones nucleosoma-nucleosoma y las interacciones con proteínas adicionales que participan o regulan procesos como la transcripción y la replicación del DNA. Estos mecanismos y procesos moleculares que gobiernan las modificaciones de la cromatina que regulan la transcripción se analizan en mayor detalle en el siguiente capítulo.

Inactivación del cromosoma X en las hembras de mamífero Un ejemplo importante del control de genes epigenético a través de la represión de la heterocromatina es la inactivación aleatoria y la condensación de uno de los dos cromosomas X en los mamíferos hembra. Cada mamífero hembra tiene dos cromosomas X, uno aportado por el óvulo a partir del cual se desarrolla (X_m) y otro aportado por el espermatozoide (X_p). Temprano durante el desarrollo embrionario, se produce la inactivación aleatoria de cualquiera de los dos cromosomas X_m o X_p en cada célula somática. Todas las células hijas subsiguientes mantienen el mismo cromosoma X inactivo al igual que sus células progenitoras. Como resultado de esto, la hembra adulta es un mosaico de clones, algunos expresan los genes procedentes del X_m y el resto expresa los genes del X_p . Esta inactivación de uno de los cromosomas X en los mamíferos hembra produce una *compensación de dosis*, el proceso que asegura que las células de las hembras expresen la misma concentración de proteínas codificadas en el cromosoma X que las células de los machos, que sólo tienen un cromosoma X.

Las histonas asociadas con el cromosoma X inactivo tienen modificaciones postraduccionales, características de otras regiones de la heterocromatina: la hipoacetilación de lisinas, la di- y trimetilación de la lisina 9 de la histona H3, la trimetilación de la lisina 27 de la H3 y una ausencia de metilación en la lisina 4 de la histona H3 (véase la Fig. 6-33b). La inactivación del cromosoma X en un estadio temprano del desarrollo embrionario está controlada por el centro de inactivación X, un locus complejo en el cromosoma X que determina cuál de los dos cromosomas X se inactivará y en qué células. El centro de inactivación X también contiene el gen *Xist*, que codifica un RNA notablemente largo, que no codifica proteína y que cubre sólo el cromosoma X del que fue transcrito, desencadenando así el silenciamiento del cromosoma.

A pesar de que el mecanismo de inactivación del cromosoma X no es bien comprendido, involucra varios procesos que incluyen la acción de los complejos proteicos *Polycomb*, que se analiza más adelante en el Capítulo 7. Una subunidad del complejo *Polycomb* contiene un cromodominio que se une a las colas de histona H3 cuando están trimetiladas en la lisina 27. El complejo *Polycomb* también contiene una histona metiltransferasa específica para la lisina 27 de H3. Este hallazgo contribuye a explicar cómo el proceso de inactivación X se propaga a lo largo de regiones grandes del cromosoma X y cómo se mantiene a través de la replicación del DNA, de modo similar a la heterocromatinización mediante la unión de HP1 a las colas de histona H3 metilada en la lisina 9 (véase la Fig. 6-34b).

La inactivación del cromosoma X es otro ejemplo de un proceso epigenético, es decir, un proceso que afecta la expresión de genes específicos y es heredado por las células hijas pero no es el resultado

de un cambio en la secuencia de DNA. En cambio, la actividad de los genes en el cromosoma X en los mamíferos hembra está controlado por la estructura de la cromatina, y no por la secuencia nucleotídica del DNA subyacente. Y el cromosoma X inactivado (cualquiera de los dos X_m o X_p) se mantiene en la progenie de todas las futuras divisiones celulares debido a que las histonas son modificadas en una manera específica, represiva, que es heredada fielmente a través de cada división celular.

Las proteínas no histonas organizan los bucles largos de cromatina

Aunque las histonas son las proteínas predominantes en la cromatina, las proteínas no histonas asociadas a la cromatina, menos abundantes, y la molécula de DNA en sí misma también son importantes para la estructura del cromosoma. Estudios recientes indican que no es la proteína sola la que otorga estructura a un cromosoma en metafase. Estudios micromecánicos en presencia de proteasas o nucleasas indican que el DNA, no las proteínas, es responsable de la integridad mecánica de un cromosoma metafásico cuando se tira de sus extremos. Estos resultados son consistentes con un armazón continuo de proteína en los ejes del cromosoma. En efecto, la integridad de la estructura de los cromosomas necesita del complejo de cromatina completo de DNA, de los octámeros de histonas y de las proteínas no histonas asociadas a la cromatina.

Los experimentos de hibridación in situ con diferentes sondas marcadas con fluorescencia para el DNA de un cromosoma humano en las células en interfase avalan el modelo en el cual la cromatina está dispuesta en bucles largos. En estos experimentos, algunas secuencias de sondas separadas por millones de pares de bases en un DNA lineal aparecen reproduciblemente muy cerca unas de otra en los núcleos en interfase de diferentes células del mismo tipo (Fig. 6-35). Se postuló que estos sitios de sondas estrechamente espaciados se encuentran cerca de regiones de la cromatina, llamadas *regiones asociadas al armazón* (SAR) o *regiones de adhesión a la matriz* (MAR), localizadas en las bases de los bucles de DNA. Las SAR/MAR han sido localizadas por digestión de los cromosomas libres de histonas con enzimas de restricción y la posterior recuperación de los fragmentos que permanecieron asociados con la preparación digerida, libre de histonas. Las distancias medidas entre las sondas son consistentes con los bucles de la cromatina que varían en tamaño de 1 millón a 4 millones de pares de bases en las células de mamífero en interfase. Los bucles de cromatina también se visualizan directamente mediante microscopía en la cromatina activa de ovocitos de anfibios en desarrollo ("cromosomas en escobilla", mostrados en la figura al comienzo del Cap. 8). Estas células son enormes en comparación a la mayoría de las células (≈ 1 mm de diámetro) debido a que acumulan todo el material nuclear y citoplasmático necesario para la división del huevo fecundado en las miles de células diferenciadas requeridas para generar un embrión en alimentación que pueda ingerir nutrientes adicionales.

En general, las SAR/MAR se encuentran entre las unidades de transcripción y los genes se localizan principalmente dentro de los bucles de cromatina. Como se analizó antes, los bucles están atados en sus bases por un mecanismo que no rompe las moléculas de DNA dúplex que se extienden a la longitud completa del cromosoma. La evidencia indica que las SAR/MAR pueden aislar genes vecinos. Algunas SAR/MAR funcionan como *aislantes*, es decir, secuencias de DNA de decenas de cientos de pares de bases que separan las uni-

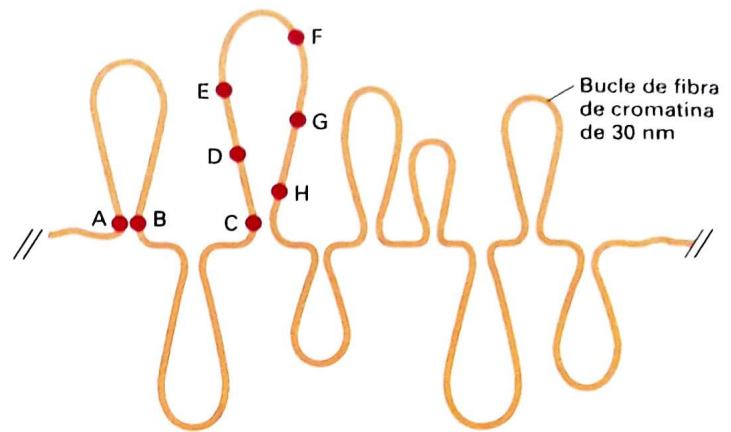


FIGURA EXPERIMENTAL 6-35 Sondas marcadas con fluorescencia hibridadas a los cromosomas en interfase demuestran los bucles de cromatina y permiten su medición. Se realizó hibridación in situ de las células en interfase con diferentes sondas específicas para secuencias separadas por distancias conocidas en el DNA clonado, lineal. Los círculos con letra representan sondas. La medición de las distancias entre diferentes sondas hibridadas, que se pueden distinguir por su color, muestra que algunas secuencias (p. ej., A y B), separadas por millones de pares de bases, aparecen localizadas cerca unas de otras dentro del núcleo. Para algunos grupos de secuencias, las distancias medidas en el núcleo entre una sonda (p. ej., C) y las secuencias sucesivamente más distantes inicialmente parecen incrementarse (p. ej., D, E, y F) y luego parecen disminuir (p. ej., G y H). (Adaptado de H. Yokota y cols., 1995, *J. Cell Biol.* **130**:1239)

dades de transcripción unas de otras. Las proteínas que regulan la transcripción de un gen no pueden influir en la transcripción de un gen vecino que está separado de él por un aislante.

Estructuras tipo anillo de los complejos de proteína SMC Las bases de los bucles de cromatina (véase la Fig. 6-35) en los cromosomas interfásicos se puede mantener en su lugar mediante proteínas llamadas *proteínas de mantenimiento de la estructura de cromosomas* o proteínas SMC (*structural maintenance of chromosome proteins*). Estas proteínas no histonas son vitales para el mantenimiento de la estructura morfológica de los cromosomas condensados durante la mitosis. En extractos preparados a partir de núcleos grandes de óvulos de *Xenopus laevis* (rana africana) los cromosomas pueden ser inducidos a condensarse como lo hacen en células intactas a medida que entran en el periodo de profase de la mitosis. Esta condensación falla y no se produce cuando un tipo de proteína SMC es eliminada del extracto con anticuerpos específicos. Las levaduras con mutaciones en ciertas proteínas SMC fallan en asociar apropiadamente las cromátidas hermanas después de la replicación del DNA en la fase S. En consecuencia, los cromosomas no se segregan adecuadamente a las células hijas durante la mitosis. Las proteínas SMC relacionadas son necesarias para la adecuada segregación de cromosomas en las bacterias y las archaea, indicando que ésta es una clase ancestral de proteínas vitales para la estructura de los cromosomas y la segregación en todos los reinos de la vida.

Cada monómero SMC contiene una región bisagra donde el polipéptido se pliega sobre sí mismo, formando una región espiral enro-

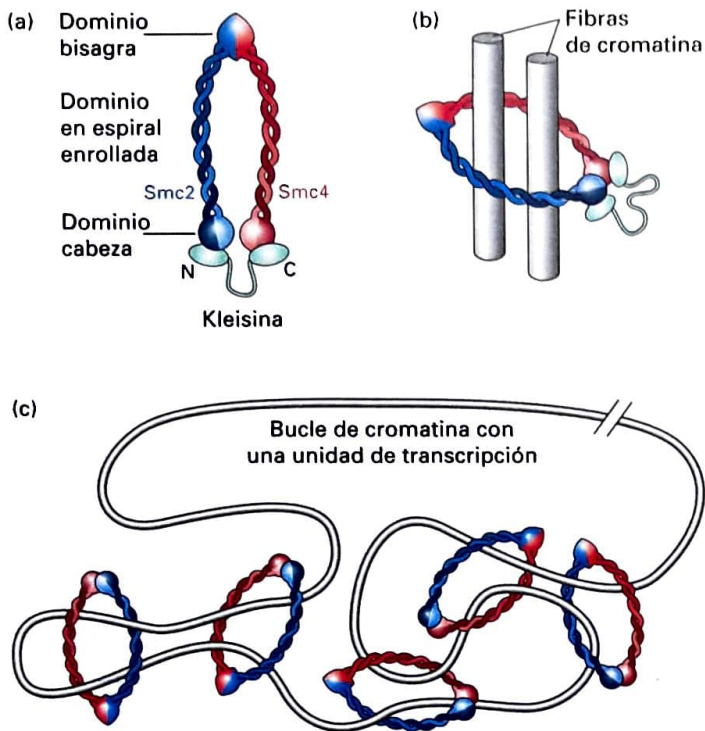


FIGURA 6-36 Modelo de los complejos SMC unidos a la cromatina.

(a) Modelo de un complejo de proteína SMC. (b) Modelo del complejo SMC que topológicamente une dos fibras de cromatina representadas por cilindros con el diámetro de un nucleosoma en relación a las dimensiones del complejo SMC. (c) Modelo para la unión de los complejos SMC a la base de un bucle de la cromatina en transcripción. [Adaptado de K. Nasmyth y C. H. Haering, 2005, *Ann. Rev. Biochem.* 74:595.]

llada, muy larga, acercando los extremos N- y C-terminal de manera tal que puedan interactuar para formar un dominio cabeza globular (Fig. 6-36a). El dominio bisagra de un monómero (azul) se une al dominio bisagra de un segundo monómero (rojo), formando un complejo dimérico con una forma aproximada de U. Los dominios cabeza de los monómeros tienen actividad ATPasa y están conectados por los miembros de otras familias de proteínas pequeñas llamadas *kleisinas*. El complejo SMC global es un anillo con un diámetro lo suficientemente grande para acomodar las dos fibras de 30 nm (Fig. 6-36b) y es capaz de unir dos moléculas de DNA circular in vitro. Se

propone que las proteínas SMC forman la base de los bucles al formar nudos limitados topológicamente en las fibras de cromatina de 30 nm, como se esquematiza en la Figura 6-36c. Esto se puede explicar porque la escisión del DNA en una cantidad relativamente pequeña de sitios conduce a la disolución rápida de la estructura de los cromosomas metafásicos condensados, mientras que la escisión mediante proteasas de las proteínas tiene sólo un efecto minoritario sobre la estructura cromosómica hasta que se digiere la mayor parte de la proteína: cuando el DNA se corta en cualquier lugar en una región larga de la cromatina que contiene diversos bucles de cromatina, los extremos rotos se pueden deslizar a través de los anillos de proteína SMC, “desatando” los nudos topológicos que constriñen los bucles de cromatina. Por el contrario, la mayoría de los anillos individuales de las proteínas SMC deben romperse antes de que se liberen las restricciones que mantienen juntas las bases de los bucles.

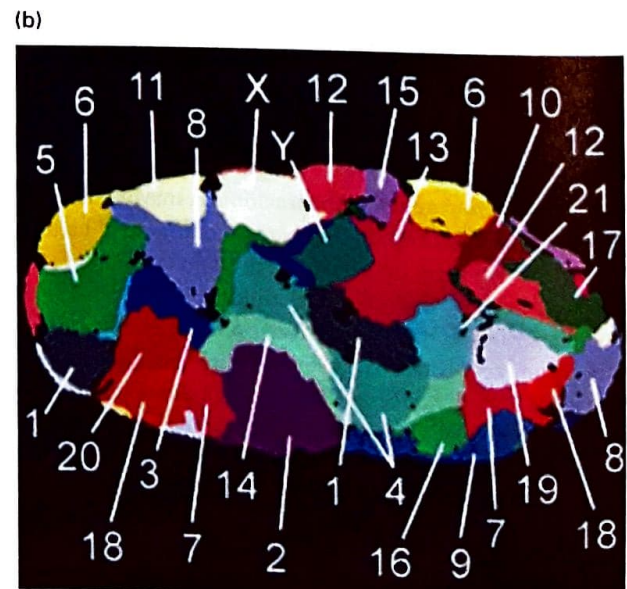
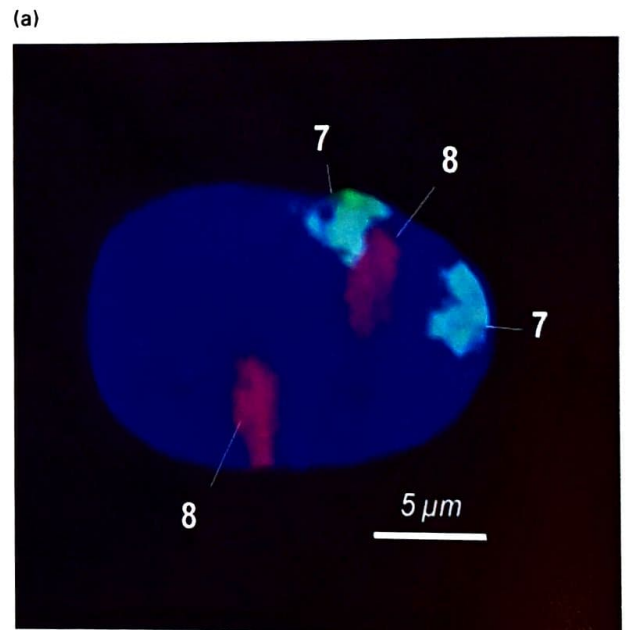


FIGURA EXPERIMENTAL 6-37 Durante la interfase, los cromosomas humanos permanecen en territorios que no se superponen en el núcleo.

Los fibroblastos humanos fijados en interfase se hibridaron in situ con sondas marcadas con fluorescencia para secuencias a lo largo de toda la longitud de los cromosomas 7 (verde) y 8 (rojo) humanos. El DNA se tiñó de azul con DAPI. En las células diploides, cada uno de los dos cromosomas 7 y los dos cromosomas 8 está restringido a un territorio o dominio dentro del núcleo, en lugar de estirarse por todo el núcleo. (b) Similar a (a) excepto que las sondas que colorean los cromosomas específicas para cada cromosoma se hibridaron para revelar la localización de casi todos los cromosomas en un fibroblasto humano de un hombre. Algunos de los cromosomas no se observan en esta muestra confocal del núcleo. (Parte [a] cortesía de Drs. I. Solovei y T. Cremer. Parte [b] de A. Bolzer y cols., 2005, *PLoS Biol* 3:26.)

Los territorios de cromosomas de interfase En los núcleos pequeños de la mayoría de las células, los cromosomas interfásicos individuales, que están menos condensados que los cromosomas metafásicos, no se pueden resolver por microscopía estándar o microscopía electrónica. No obstante, la cromatina de uno de los cromosomas en las células interfásicas no está diseminada por todo el núcleo. En su lugar, la cromatina en interfase está organizada en *territorios cromosómicos*. Como se ilustra en la Figura 6-37, los núcleos en interfase en hibridación in situ con sondas marcadas con fluorescencia para cromosomas específicos muestran que las sondas se visualizan dentro de regiones restrictivas del núcleo en lugar de aparecer por todo el núcleo. El uso de sondas específicas para diferentes cromosomas demuestra que existe poca superposición entre los cromosomas en el núcleo en interfase. Sin embargo, las posiciones precisas de los cromosomas no son reproducibles entre las células.

La estructura de los cromosomas metafásicos La condensación de los cromosomas durante la profase puede involucrar la formación de muchos bucles de cromatina, de manera tal que la longitud en cada bucle se reduce mucho en comparación a la que hay en las células en interfase. Sin embargo, el plegamiento de la cromatina en los cromosomas metafásicos no se comprende bien. El análisis microscópico de los cromosomas de mamífero a medida que se condensan durante la profase indica que la fibra de 30 nm se pliega en una fibra de 100 a 130 nm llamada *cromonema*. Como se describen en la Figura 6-38, una fibra cromonema se pliega entonces para formar una estructura con un diámetro de 200-250 nm llamada *cromátida en profase media*, que luego se pliega para dar las cromátidas de 500 a 700 nm de diámetro que se observan durante la metafase. Por último, las longi-

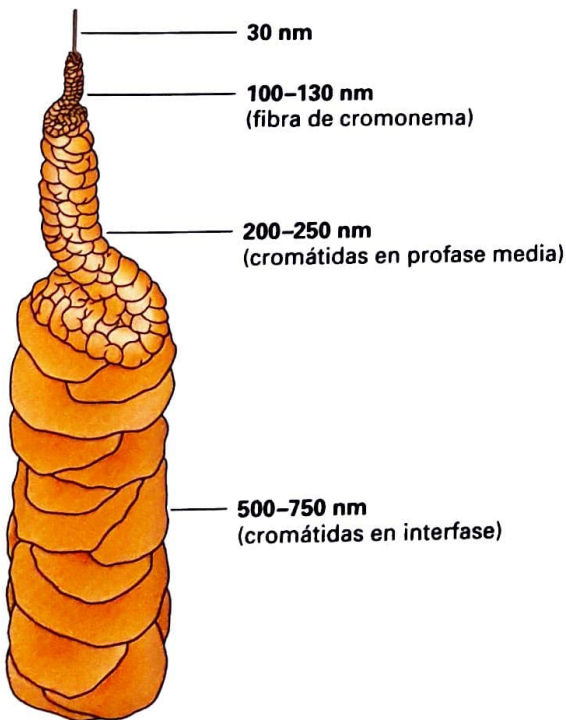


FIGURA 6-38 Modelo para el plegamiento de la fibra de cromatina de 30 nm en un cromosoma metafásico. Se describe una única cromátida de un cromosoma metafásico. (Adaptado de N. Kireeva y cols., 2004, *J. Cell. Biol.* 166:775)



FIGURA 6-39 Típico cromosoma metafásico. Como se puede ver en esta microfotografía electrónica de barrido, el cromosoma se ha replicado y comprende dos cromátidas, cada una conteniendo una de las dos moléculas de DNA idénticas. El centrómero, donde se unen las cromátidas en una constricción, es necesario para su separación más tarde en la mitosis. Las secuencias teloméricas especiales en los extremos actúan en la prevención del acortamiento del cromosoma. (Andrew Syred/Photo Researcher, Inc.)

tudes completas de dos cromosomas hijos asociados generados por la replicación del DNA durante la fase S previa del ciclo celular se condensan en estructuras con forma de barra que en la mayoría de los eucariontes están conectadas en la constricción central llamada el centrómero (Fig. 6-39).

Proteínas no histonas adicionales regulan la transcripción y la replicación

La masa total de las histonas asociadas con el DNA en la cromatina es casi igual a la del DNA. La cromatina en interfase y los cromosomas en metafase también contienen pequeñas cantidades de un conjunto complejo de otras proteínas. Por ejemplo, miles de factores de **transcripción** diferentes se asocian con la cromatina en interfase. La estructura y la función de estas proteínas no histonas cruciales, que regulan la

transcripción, se analizan en el Capítulo 7. Otras de las no histonas de poca abundancia asociadas con la cromatina regulan la replicación del DNA durante el ciclo celular eucarionte (Cap. 20).

Una pocas proteínas no histonas de unión al DNA, están presentes en cantidades muchos más grandes que los factores de transcripción o replicación. Algunas de éstas presentan alta movilidad durante la separación electroforética y por ende se las han designado como proteínas HMG (*high-mobility group*). Cuando se eliminan de las células de levadura los genes que codifican las proteínas HMG más abundantes, se interrumpe la transcripción normal en la mayoría de los genes analizados. Algunas proteínas HMG se han encontrado que asisten en la unión cooperativa de diversos factores de transcripción a secuencias de DNA específicas que están cerca unas de otras, estabilizando complejos multiproteicos que regulan la transcripción de un gen vecino, como se describirán en el Capítulo 7.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 6.6

Organización estructural de los cromosomas eucariontes

- En las células eucariontes, el DNA está asociado con una masa igual a las proteínas histonas en un complejo nucleoproteico altamente condensado llamado cromatina. La unidad monomérica de la cromatina es el nucleosoma, que consiste en un octámero de histonas alrededor del cual se enrollan 147 pb de DNA (véase la Fig. 6-29).
- Se cree que la cromatina en las regiones transcripcionalmente inactivas del DNA dentro de las células existe en forma de una fibra de 30- nm y en estructuras de orden superior construidas a partir de ella (véanse las Fig. 6-30 y 6-38).
- Se cree que la cromatina en las regiones transcripcionalmente activas del DNA dentro de las células existe en una forma abierta, extendida.
- Las colas de la histona H4, en particular la lisina 16 de la H4, son necesarias para plegar la cromatina como perlas en un collar (la fibra de cromatina de 10 nm) en una fibra de 30 nm.
- Las colas de histona se pueden modificar por acetilación, metilación, fosforilación y monoubicuitinación (véase la Fig. 6-31). Estas modificaciones afectan la estructura de cromatina al regular la unión de las colas de histonas a otras proteínas menos abundantes, asociadas a la cromatina.
- La acetilación y la desacetilación reversible de los residuos de lisinas en el extremo N-terminal de las histonas del centro regulan la condensación de la cromatina. Las proteínas involucradas en la transcripción, la replicación, la reparación y las enzimas como la DNasaI pueden acceder más fácilmente a la cromatina con colas de histonas hiperacetiladas (eucromatina) que a la cromatina con colas de histonas hipoacetiladas (heterocromatina).
- Cuando los cromosomas metafásicos se descondensen durante la interfase, las zonas de la heterocromatina permanecen mucho más condensadas que las regiones de eucromatina.
- La proteína 1 de la heterocromatina (HP1) usa un cromodominio que se une a la histona H3 trimetilada en la lisina 9. El dominio cro-

moshadow de HP1 también se asocia consigo mismo y con la histona metil transferasa que metila la lisina 9 de la H3. Estas interacciones provocan condensación de la fibra de cromatina de 30 nm y propagan la estructura de la heterocromatina a lo largo del cromosoma hasta que se encuentra un elemento límite (véase la Fig. 6-34).

- Un cromosoma X en casi cada célula de las hembras de mamífero está altamente condensado en la heterocromatina, dando como resultado la represión de casi todos los genes del cromosoma inactivo. Esta inactivación da como resultado compensaciones de dosis de forma tal que los genes en el cromosoma X se expresan en el mismo nivel tanto en machos como en hembras.
- Cada cromosoma eucarionte contiene una molécula de DNA única, empaquetada en nucleosomas y plegada en una fibra de cromatina de 30 nm que está asociada con un armazón de proteínas constituido en parte por proteínas de mantenimiento estructural de cromosomas (SMC) en sitios entre las unidades de transcripción (véase la Fig. 6-36c). El plegamiento adicional del armazón compacta aún más la estructura para dar una forma altamente condensada de los cromosomas metafásicos (véase la Fig. 6-38).

6.7 Morfología y elementos funcionales de los cromosomas eucariontes

Habiendo analizado en detalle la organización estructural de los cromosomas en la sección anterior, ahora se los describirá desde una perspectiva más global. Las primeras observaciones microscópicas acerca del número y el tamaño de los cromosomas y sus patrones de tinción llevaron al descubrimiento de muchas características generales importantes de la estructura cromosómica. Posteriormente, los investigadores identificaron regiones cromosómicas críticas específicas para su replicación y segregación a las células hijas durante la división celular. En esta sección, se analizan estos elementos funcionales de los cromosomas y se describe cómo los cromosomas evolucionaron a través de reordenamientos raros de cromosomas ancestrales.

El número, el tamaño y la forma de los cromosomas en la metafase son específicos de especie

Como se mencionó anteriormente, en las células que no se encuentran en división, los cromosomas individuales no son visibles, incluso con la adición de colorantes histológicos para DNA (p.ej., colorantes de Feulgen o Giemsa) o microscopia electrónica. Durante la mitosis y la meiosis, sin embargo, los cromosomas se condensan y se tornan visibles en el microscopio óptico. Por lo tanto, casi todo el trabajo citogenético (p. ej., estudios de la morfología de cromosomas) se ha realizado con cromosomas metafásicos condensados obtenidos de células en división, ya sean células somáticas en mitosis o gametos en división durante la meiosis.

La condensación de cromosomas metafásicos probablemente se produce a partir de varios órdenes de plegamiento de las fibras de cromatina de 30 nm (véase la Fig. 6-38). Al momento de la mitosis, las células ya han pasado por la fase S del ciclo celular y han replicado

su DNA. En consecuencia, los cromosomas que se tornan visibles durante la metafase son estructuras *duplicadas*. Cada cromosoma metafásico consiste en dos **cromátidas** hermanas, que están unidas en una región constreñida, el centrómero (véase la Fig. 6-39). El número, los tamaños y las formas de los cromosomas metafásicos constituyen el **cariotipo**, que es distintivo para cada especie. En la mayoría de los organismos, todas las células somáticas tienen el mismo cariotipo. Sin embargo, las especies que parecen bastante similares pueden tener cariotipos muy diferentes, lo cual indica que similares potenciales genéticos se pueden organizar en los cromosomas en formas muy diferentes. Por ejemplo, dos especies de ciervos pequeños, el muntiaco Indio y el muntiaco Reeves, contienen alrededor de la misma cantidad de DNA genómico. En una especie, este DNA está organizado en 22 pares de **autosomas** homólogos y dos cromosomas sexuales físicamente separados. Por el contrario, la otra especie contiene el menor número de cromosomas de cualquier mamífero, sólo tres pares de autosomas; un cromosoma sexual está físicamente separado, pero el otro está unido al extremo de un autosoma.

Durante la metafase, los cromosomas pueden distinguirse por los patrones de bandas y la coloración

Ciertos colorantes tiñen selectivamente algunas regiones de los cromosomas metafásicos más intensamente que otras, produciendo el patrón de bandas característico que son específicos de los cromosomas individuales. La regularidad de las bandas cromosómicas sirve como marcadores visibles, útiles a lo largo de la longitud de cada cromosoma y puede ayudar a distinguir los cromosomas de tamaño y forma similares.

En la actualidad, el método de *pintura cromosómica* simplifica en gran medida la diferenciación de los cromosomas de tamaño y forma similar. Esta técnica, una variación de la **hibridación in situ con fluorescencia (FISH)**, utiliza sondas específicas para sitios diseminados a lo largo de cada cromosoma. Las sondas están marcadas con diversos colorantes fluorescentes diferenciados con excitación y emisión de longitudes de onda distintivos. Las sondas específicas para cada cromosoma se marcan con una proporción predeterminada de cada uno de estos colorantes. Después de que las sondas se hibridan con los cromosomas y se elimina el exceso, la muestra se observa con un microscopio fluorescente en el cual un detector determina la proporción de cada colorante presente en cada posición fluorescente en el campo microscópico. Esta información es recolectada por una computadora y un programa especial asigna una imagen de color falso a cada tipo de cromosoma (Fig. 6-40, *izquierda*). Los gráficos computacionales permiten que los dos homólogos de cada cromosoma sean colocados uno al lado del otro y se los nombre de acuerdo a sus tamaños decrecientes. Tal presentación muestra claramente el cariotipo de la célula. La Figura 6-40 muestra un cariotipo masculino humano normal. La pintura cromosómica es un método poderoso para la detección de un número anormal de cromosomas, como la trisomía del cromosoma 21 en pacientes con síndrome de Down o las traslocaciones cromosómicas que se producen en individuos raros y en células cancerosas (Fig. 6-41). El uso de sondas con diferentes proporciones de colorantes fluorescentes que hibridan en posiciones diferentes a lo largo de cada cromosoma humano normal permite el análisis estructural más fino de los cromosomas que puede revelar más rápidamente deleciones o duplicaciones de las regiones cromosómicas. La figura al comienzo del capítulo ilustra el uso de tal *FISH multicolor* en el análisis del cariotipo de una mujer humana normal.



FIGURA EXPERIMENTAL 6-40 Los cromosomas humanos se identifican rápidamente mediante la coloración de los cromosomas. (a) Hibridación in situ con fluorescencia (FISH) de los cromosomas humanos de una célula mas-

culina en mitosis usando sondas que colorean los cromosomas. (b) Alineación de estos cromosomas coloreados mediante gráficos computacionales para revelar el cariotipo masculino humano normal. (Cortesía de M. R. Speicher.)

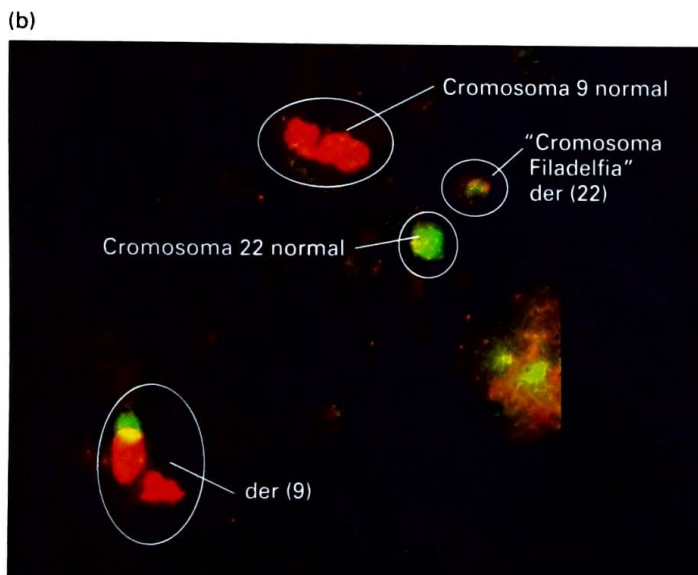
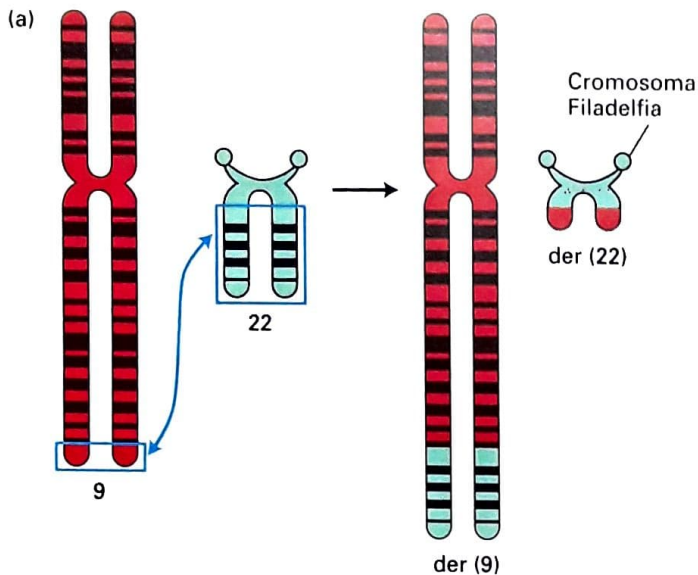


FIGURA EXPERIMENTAL 6-41 Las traslocaciones cromosómicas se pueden analizar usando sondas que colorean los cromosomas por FISH. Las traslocaciones cromosómicas características están asociadas a ciertos trastornos genéticos y tipos específicos de cánceres. Por ejemplo, en casi todos los pacientes con leucemia mieloide crónica, las células leucémicas contienen el cromosoma Filadelfia, un cromosoma 22 acortado [der(22)], y un cromosoma 9 [der(9)] anormalmente largo ("der" de derivado). Esto se produce por una traslocación entre los cromosomas 9 y 22. Esta traslocación se puede detectar mediante un análisis de bandas representado en (a) y FISH con sondas que colorean cromosomas (b). (Parte [a] de J. Kuby, 1997, *Immunology*, 3d ed., W.H. Freeman and Company p.)

La pintura cromosómica y la secuenciación de DNA revelan la evolución de los cromosomas

El análisis de los cromosomas de diferentes especies ha contribuido a dilucidar cómo evolucionaron los cromosomas. Por ejemplo, la hibridación de las sondas que colorean cromosomas, para el cromosoma 16 de la musaraña arborícola (*Tupaia belangeri*) con los cromosomas

metafásicos de la musaraña arborícola reveló las dos copias del cromosoma 16, tal como se esperaba (Fig. 6-42a). Sin embargo, cuando las mismas sondas que colorean los cromosomas se hibridaron a los cromosomas metafásicos humanos, la mayoría de las sondas se hibridaron al brazo largo del cromosoma 10 (Fig. 6-42b). Además, cuando múltiples sondas del brazo largo del cromosoma 10 humano con diferentes colorantes fluorescentes se hibridaron al cromosoma 10 humano y a los cromosomas metafásicos de la musaraña arborícola, se encontraron secuencias de musaraña homólogas a cada una de estas sondas a lo largo del cromosoma 16 de musaraña arborícola en el mismo orden en el que se presentan en el cromosoma 10.

Los resultados indican que durante la evolución de los seres humanos y de las musarañas arborícolas a partir de un ancestro común que vivió hace ≈ 85 millones de años, una secuencia de DNA continua y larga en uno de los cromosomas ancestrales se convirtió en el cromosoma 16 en las musarañas arborícolas, pero se desarrolló como el brazo largo del cromosoma 10 en los seres humanos. El fenómeno de los genes que se presentan en el mismo orden en un cromosoma de dos diferentes especies se denomina **sintenia conservada** (deriva del latín para "la misma cinta"). La presencia de dos o más genes en una región cromosómica común en dos o más especies indica un segmento sinténico conservado.

Las relaciones entre los cromosomas de muchos primates se han determinado mediante hibridaciones cruzadas de especies con sondas que colorean los cromosomas, como se muestra para los seres humanos y la musaraña arborícola en la Figura 6-42a, b. De estas relaciones, y de los análisis de alta resolución de las regiones de sintenia por secuenciación de DNA y otros métodos, ha sido posible proponer el cariotipo del ancestro común de todos los primates en base al número mínimo de reordenamientos cromosómicos necesarios para generar las regiones de sintenia en los cromosomas de los primates contemporáneos.

Se cree que los cromosomas humanos derivaron de un ancestro primate común con 23 autosomas más los cromosomas sexuales X e Y por diversos mecanismos diferentes (Fig. 6-42c). Algunos cromosomas humanos derivaron sin reordenamientos a gran escala de la estructura de cromosomas. Se cree, a su vez, que otros evolucionaron por la ruptura de un cromosoma ancestral en dos cromosomas o, por el contrario, por la fusión de dos cromosomas ancestrales. Incluso otros cromosomas humanos parecen haber sido generados por el intercambio de partes de brazos de cromosomas distintos, es decir, por traslocaciones recíprocas que involucraron dos cromosomas ancestrales. El análisis de las regiones de sintenia conservada entre los cromosomas de muchos mamíferos indica que los reordenamientos cromosómicos como la ruptura, la fusión y las traslocaciones se producen rara vez en la evolución de los mamíferos, alrededor de una vez cada cinco millones de años. Cuando ocurrieron tales reordenamientos cromosómicos, muy probablemente contribuyeron a la evolución de nuevas especies que no podían cruzarse con las especies a partir de las cuales evolucionaron.

Los reordenamientos cromosómicos similares a los inferidos para el linaje del primate se han inferido para otros grupos de organismos relacionados, incluyendo linajes de invertebrados, plantas y hongos. La excelente concordancia entre las predicciones de las relaciones evolutivas en base al análisis de las regiones de sintenia de los cromosomas de organismos con estructura anatómica relacionada (p. ej., entre animales, entre insectos con organización corporal similar, entre plantas similares, etc.) y las relaciones evolutivas basadas en el registro fósil y en la extensión de la divergencia de las secuencias de

(a)



(b)

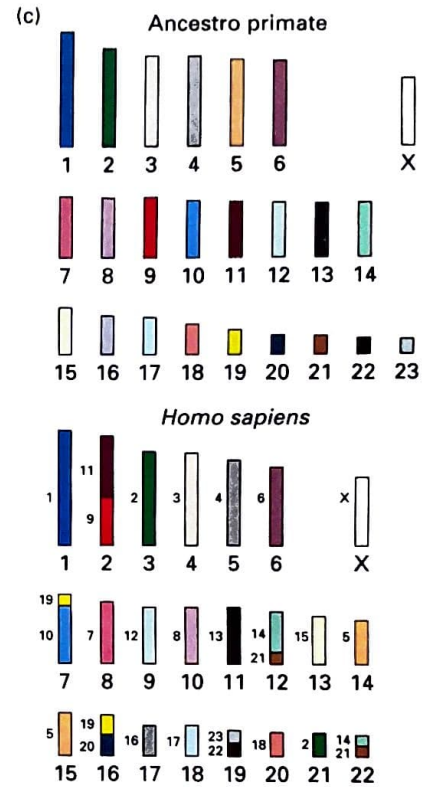
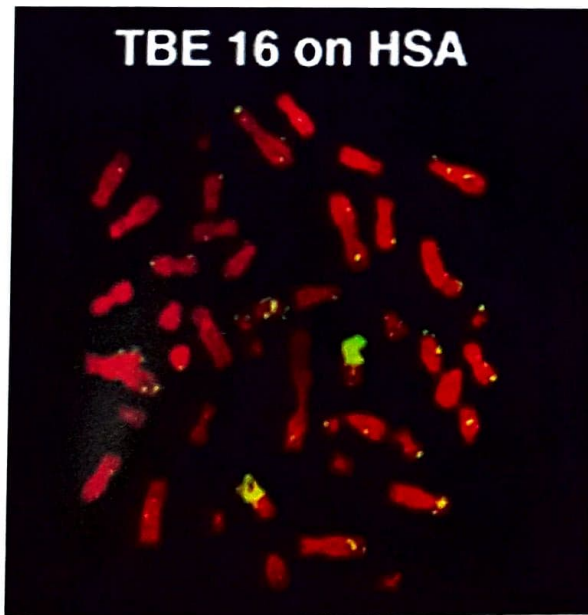


FIGURA 6-42 Evolución de los cromosomas de primate. (a) Las sondas que colorean cromosomas para el cromosoma 16 de la musaraña arborícola (*T. be-langeri*, lejanamente emparentada con los seres humanos) se hibridó (amarillo) a los cromosomas metafásicos de la musaraña (rojo). (b) El mismo cromosoma 16 de musaraña arborícola se hibridó con los cromosomas metafásicos. (c) Evolución propuesta de los cromosomas humanos (abajo) a partir de los cromosomas del ancestro común de todos los primates (arriba). Los cromosomas del ancestro común de los primates propuesto se enumeran de acuerdo a sus tamaños, con cada cromosoma representado por un color diferente. Los cromosomas humanos también se enumeran de acuerdo a sus tamaños relativos con los colores tomados a partir de los colores de los cromosomas del primate ancestral común propuesto de los cuales derivaron. Los números pequeños a la izquierda de las regiones coloreadas de los cromosomas humanos indican el número del cromosoma ancestral del cual deriva la región. Los cromosomas humanos derivaron de los cromosomas propuestos del ancestro común de los primates sin reordenamientos significativos (p. ej., el cromosoma 1 humano), por fusión (p. ej., el cromosoma 2 humano por fusión de los cromosomas ancestrales 9 y 11), por ruptura (p. ej., los cromosomas 14 y 15 humanos por ruptura del cromosoma ancestral 5), o traslocaciones cromosómicas (p. ej., una traslocación recíproca entre los cromosomas ancestrales 14 y 21 generaron los cromosomas 12 y 22 humanos). (Partes [a] y [b] Muller y cols., 1999. *Cromosoma* **108**:393. Parte [c] derivado de L. Froenicke, 2005, *Cytogenet. Genome Res.* **108**:122.)

DNA para los genes homólogos son un argumento fuerte para la validez de la evolución como el proceso que generó la diversidad de los organismos contemporáneos.

Los cromosomas politénicos en interfase surgen por amplificación del DNA

Las glándulas salivales de especies de *Drosophila* y de otras especies de insecto contienen cromosomas en interfase alargados que son visibles

en el microscopio óptico. Cuando se fijan y se tiñen con colorantes para DNA, estos **cromosomas politénicos** se caracterizan por un gran número de bandas bien demarcadas, reproducibles, a las que se les asignaron números estandarizados (Fig. 6-43a). Las bandas densamente teñidas representan regiones donde la cromatina está más condensada y las regiones interbanda, claras, donde la cromatina está menos condensada. Aunque los mecanismos moleculares que controlan la formación de bandas en los cromosomas politénicos no se comprenden bien, el patrón de bandas altamente reproducible visto en los cromosomas

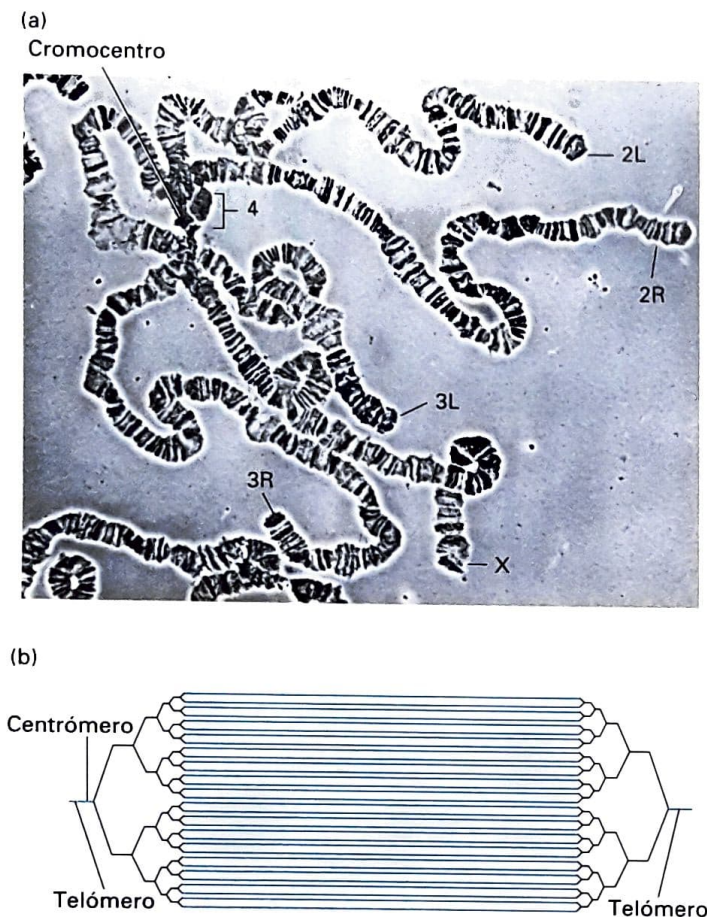


FIGURA EXPERIMENTAL 6-43 Patrón de bandas de los cromosomas politénicos de las glándulas salivales de *Drosophila*. (a) En esta microfotografía óptica de los cromosomas de las glándulas salivales de *Drosophila melanogaster*, se pueden observar cuatro cromosomas (X, 2, 3, y 4), con un total de aproximadamente 5 000 bandas distinguibles. El patrón de bandas es el producto del empaquetamiento reproducible del DNA y proteínas dentro de cada sitio amplificado a lo largo del cromosoma. Las bandas oscuras son regiones de cromatina más densamente compactada. Los centrómeros de los cuatro cromosomas suelen aparecer fusionados en el cromocentro. Las puntas de los cromosomas 2 y 3 están marcadas (L = brazo izquierdo, R = brazo derecho), como lo está la punta del cromosoma X. (b) El patrón de amplificación de un cromosoma durante cinco replications. El DNA doble hebra está representado por una línea única. El DNA de los telómeros y los centrómeros no está amplificado. En los cromosomas politénicos de las glándulas salivales, cada cromosoma progenitor sufre ≈ 10 replications ($2^{10} = 1024$ hebras). (Parte [a] cortesía de J. Gall. Parte [b] adaptado de C. D. Laird y col., 1973, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **38**:311)

de glándula salivales de *Drosophila* proporcionan un método extremadamente poderoso para localizar secuencias de DNA específicas a lo largo de las longitudes de los cromosomas en estas especies. Las traslocaciones cromosómicas y las inversiones se detectan rápidamente, y las proteínas cromosómicas específicas se pueden localizar en los cromosomas politénicos en interfase mediante inmunotinción con anticuerpos específicos contra ellos (Fig. 7-13). Los cromosomas politénicos de insecto ofrecen uno de los únicos sistemas experimentales de toda la naturaleza, donde son posibles tales estudios de inmunolocalización sobre cromosomas interfásicos descondensados.

Una amplificación generalizada del DNA da origen a los cromosomas politénicos que se encuentran en las glándulas salivales de *Drosophila*. Este proceso, llamado *politenización*, se produce cuando el DNA se replica repetidamente en todas partes, excepto en los telómeros y centrómeros, pero los cromosomas hijos no se separan. El resultado es un cromosoma agrandado compuesto de muchas copias paralelas de sí mismo, se producen 1 024 a partir de 10 de tales replications en las glándulas salivales de *Drosophila melanogaster* (Fig. 6-34b). La amplificación del DNA cromosómico incrementa en gran medida el número de copia de genes, presumiblemente al suministrar suficiente mRNA para la síntesis masiva de proteínas en las glándulas salivales. Las bandas en los cromosomas politénicos de *Drosophila* representan 50 000-100 000 pares de bases, y el patrón de bandas revela que la condensación del DNA varía mucho a lo largo de estas regiones relativamente cortas de un cromosoma interfásico.

Tres elementos funcionales son necesarios para la replicación y la herencia estable de los cromosomas

Aunque los cromosomas difieren en longitud y número entre las especies, los estudios citogenéticos han demostrado que todos ellos se comportan de modo similar en el momento de la división celular. Más aún, cualquiera de los cromosomas eucariontes debe contener tres elementos funcionales para poder replicarse y segregarse correctamente: (1) los **orígenes de replicación** en los cuales las DNA polimerasa y otras proteínas inicien la síntesis del DNA (véanse las Figs. 4-31 y 4-33); (2) el **centrómero**, la región constreñida necesaria para la segregación adecuada de los cromosomas hijos y (3) los dos extremos, o **telómeros**. Los estudios de transformación de levadura descritos en la Figura 6-44 demostraron las funciones de estos tres elementos cromosómicos y establecieron su importancia para la función cromosómica.

Como se analizó en el Capítulo 4, la replicación del DNA comienza a partir de sitios que están diseminados por todo el cromosoma eucarionte. El genoma de la levadura contiene muchas secuencias de ≈ 100 pb, llamadas *secuencias de replicación autónoma* (ARS), que actúan como orígenes de replicación. La observación de que la inserción de una ARS en un plásmido circular permite que el plásmido se replique en las células de levaduras proporciona la primera identificación funcional de secuencias de origen en el DNA eucarionte (véase la Fig. 6-44a).

A pesar de que los plásmidos circulares que contienen SAR se pueden replicar en las células de levadura, sólo alrededor del 5-20% de las células de la progenie contienen el plásmido debido a que la segregación mitótica de los plásmidos es defectuosa. Sin embargo, los plásmidos que también contienen una secuencia CEN, derivada de los centrómeros de levadura se segregan igual o casi igual en las células madre e hijas durante la mitosis (véase la Fig. 6-44b).

Si los plásmidos circulares que contienen una secuencia ARS y CEN son cortados una vez con una enzima de restricción, los plásmidos lineales resultantes no producen colonias *LEU⁺* a menos que contengan secuencias teloméricas (TEL) ligadas a sus extremos (véase la Fig. 6-44c). Los primeros experimentos exitosos que involucraron la transfección de células de levadura con plásmidos lineales se lograron mediante el uso de una molécula de DNA que, como se sabía, se replicaba como una molécula lineal en el protozoo ciliado *Tetrahymena*. Durante parte del ciclo de vida de *Tetrahymena*, mucho del DNA

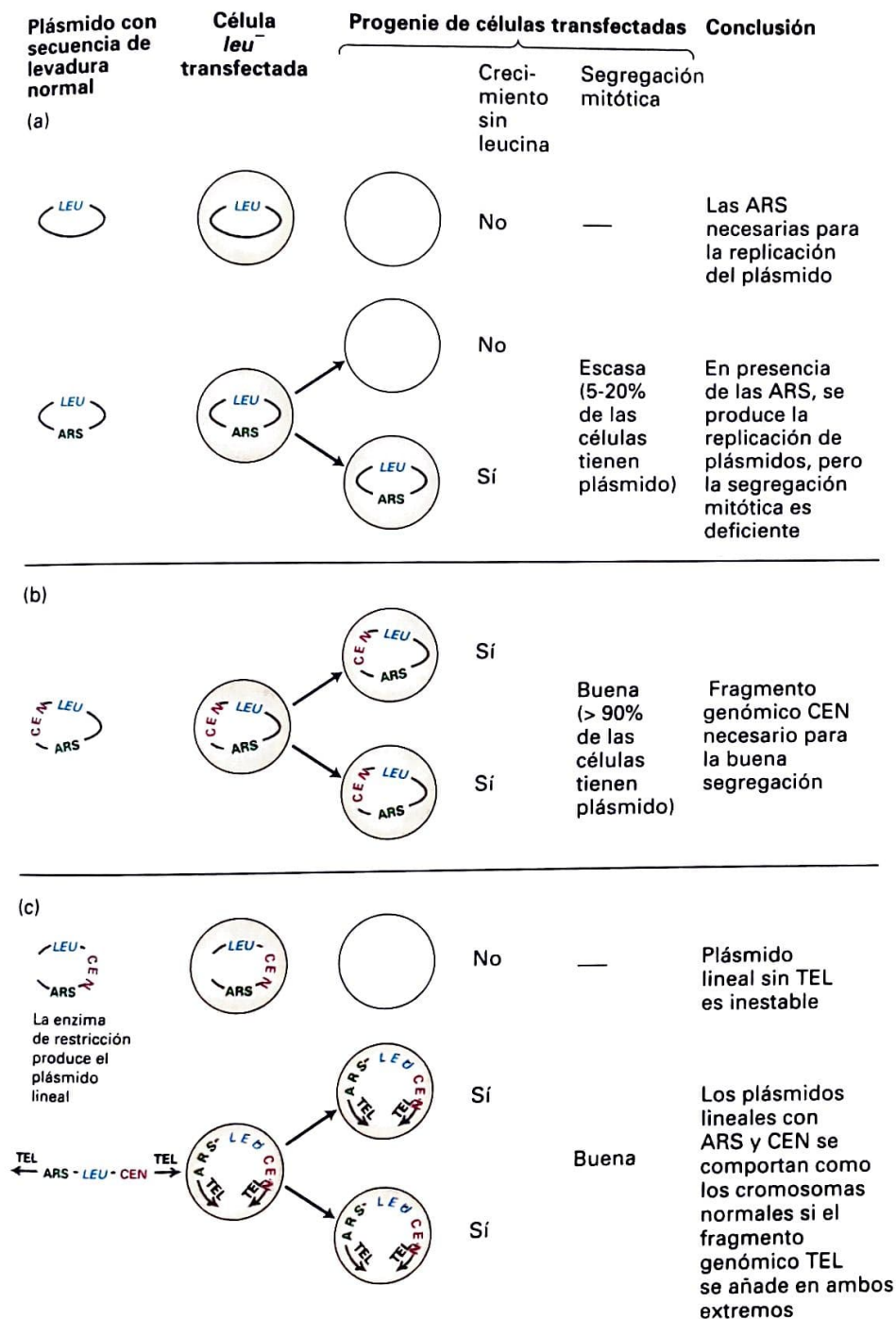


FIGURA EXPERIMENTAL 6-44 Los experimentos de transfección de levaduras identifican los elementos cromosómicos funcionales necesarios para la replicación y segregación normal. En estos experimentos, se diseñaron plásmidos conteniendo el gen *LEU* a partir de células de levadura normal y se los introdujo por transfección en células *leu*⁻. Si los plásmidos se mantienen en células *leu*⁻, se transforman a *LEU*⁺ por el gen *LEU* del plásmido y pueden formar colonias en un medio sin leucina. (a) Las secuencias que permiten la replicación autónoma (ARS) de un plásmido se identificaron porque su inserción en un vector plasmídico conteniendo un gen *LEU* clonado resultó en una frecuencia alta de transformación a *LEU*⁺. Sin embargo, incluso los plásmidos con ARS presentan escasa segregación durante la mitosis, y por lo tanto no aparecen en cada una de las células hijas. (b) Cuando las piezas rotas de forma aleatoria de DNA genómico de levadura son insertadas dentro de plásmidos conteniendo ARS y *LEU*, algunas de las células posteriormente transformadas producen colonias grandes, lo cual indica que una tasa elevada de segregación mitótica entre sus plásmidos está facilitando el crecimiento continuo de las células hijas. El DNA recuperado de los plásmidos en estas colonias grandes contiene secuencias centroméricas (CEN) de levadura. (c) Cuando las células *leu*⁻ de levadura son transformadas con plásmidos lineales conteniendo secuencias ARS y *LEU* y CEN, no se desarrollan colonias. La adición de secuencias teloméricas (TEL) a los extremos del DNA lineal da a los plásmidos lineales la posibilidad de replicarse como cromosomas nuevos que se comportan mucho más parecido a los cromosomas normales tanto en la meiosis como en la mitosis. (Véase A. W. Murray y J. W. Szostak, 1983, *Nature* **305**:89, y L. Clarke y J. Carbon, 1985, *Ann. Rev. Genet.* **19**:29.)

nuclear se copia repetidamente en piezas cortas para formar lo que se denomina un *macronúcleo*. Uno de estos fragmentos repetidos se identificó como un dímero de DNA ribosómico, los extremos de los cuales contenían una secuencia repetida (G₄T₂)_n. Cuando una sección de esta secuencia TEL repetida se unió a los extremos del plásmido lineal conteniendo las SAR y CEN, se produjo la replicación y correcta segregación de los plásmidos lineales. Esta primera clonación y caracterización de los telómeros generó el premio Nobel de Medicina y Fisiología en 2009.

Las secuencias de los centrómeros varían enormemente en longitud y complejidad

Una vez que se clonaron las regiones de los centrómeros de la levadura que confieren segregación mitótica, se pudo determinar y comparar sus secuencias, revelando tres regiones (I, II, III) que son conservadas entre los centrómeros de cromosomas en diferentes levaduras (Fig. 6-45a). Las secuencias nucleotídicas cortas, bastante bien conservadas se encuentran en las regiones I y III. La región II no tiene una secuencia específica, pero es rica en A-T con una longitud bastante constante,

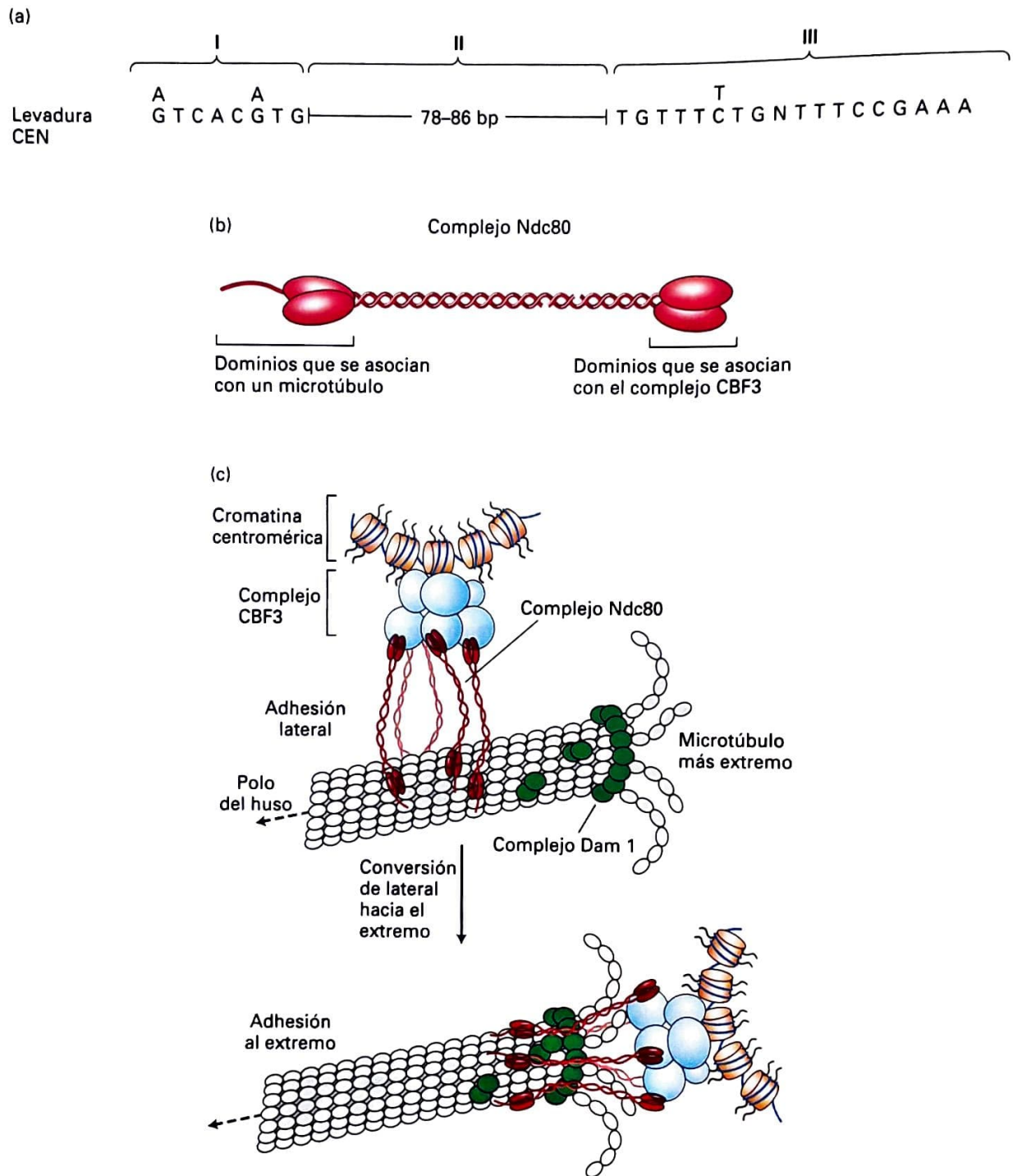


FIGURA 6-45 La interacción microtúbulos-cinetocoro en *S. cerevisiae*.

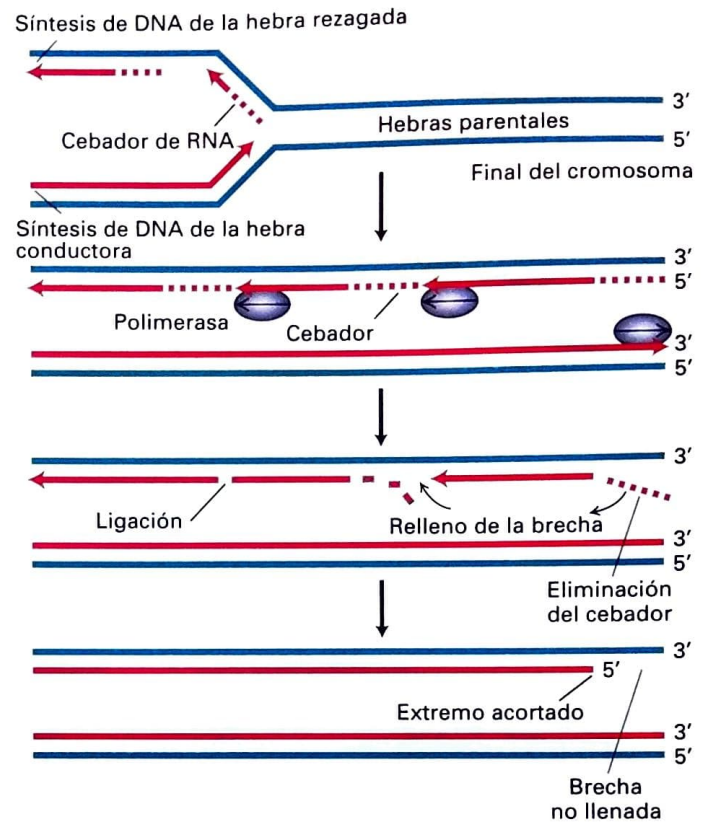
(a) Secuencia de un solo centrómero de *S. cerevisiae*, (b) Los complejos Ndc80 se asocian en tanto con los microtúbulos como con el complejo CBF3. (c) Diagrama del complejo CBF3 asociado al centrómero y sus complejos Ndc80 asociados que se asocian con un anillo de proteínas Dam1 en el extremo de un

microtúbulo del huso. Los complejos Ndc80 inicialmente realizan interacciones laterales con el lateral de un microtúbulo del huso (arriba) y luego se asocian con el anillo Dam1, haciendo una adhesión sobre el extremo (abajo) del microtúbulo. (Parte [a] de L. Clarke y J. Carbon, 1985, *Ann. Rev. Genet.* 19:29. Parte [b] y [c] adaptado de T. U. Tanaka, 2010, *Embo J.* 29:4070.)

probablemente debido a que las regiones I y III se encuentran en el mismo lado de un octámero de histonas asociado al centrómero especializado. Este octámero de histonas especializado asociado al centrómero contiene las histonas inusuales H2A, H2B y H4, y una forma variante de la histona H3. Los centrómeros de todos los eucariontes de modo similar contienen nucleosomas con una forma especializada de histona H3 específica de centrómero, llamada complejo CENP-A en los seres humanos. En *S. cerevisiae* el complejo CBF3 de proteínas se

asocia con este nucleosoma especializado. El complejo CBF3 a su vez se asocia con complejos multiproteicos alargados Ndc80 (Fig. 6-45b) que inicialmente hacen interacciones laterales con un microtúbulo del huso y posteriormente interactúan con un complejo Dam1 que forma un anillo alrededor del extremo del microtúbulo (Fig. 6-45c). Esto produce una interacción en el extremo del centrómero con el microtúbulo del huso. *S. cerevisiae* tiene, por mucho, el centrómero más simple conocido en la naturaleza.

Figura 6-46 La replicación del DNA estándar lleva a la pérdida de DNA en el extremo 5' de cada hebra de una molécula lineal de DNA. Se muestra la replicación del extremo derecho de un DNA lineal; el mismo proceso ocurre en el extremo izquierdo (mostrado por la inversión de la figura). A medida que la horquilla de replicación se aproxima al extremo de la molécula de DNA progenitor, la hebra conductora se puede sintetizar hasta el final de la hebra molde parental sin la pérdida de desoxirribonucleótidos. Sin embargo, como la síntesis de la hebra retardada requiere de cebadores de RNA, el extremo derecho de la hebra retardada de DNA hija permanecería con ribonucleótidos que son eliminados y por lo tanto no pueden servir como el molde para una DNA polimerasa replicativa. Se deben utilizar mecanismos alternativos para evitar el acortamiento sucesivo de la hebra rezagada con cada ronda de replicación. (Adaptado de Nobel Assembly at the Karolinska Institute.)



En la levadura *S. pombe*, los centrómeros son de $\approx 40-100$ kb en longitud y están compuestos de copias repetidas de secuencias similares a las de los centrómeros de *S. cerevisiae*. Múltiples copias de proteínas homólogas a las que interactúan con los centrómeros de *S. cerevisiae* se unen a estos complejos de los centrómeros de *S. pombe* y a su vez unen los cromosomas mucho más largos de *S. pombe* a diversos microtúbulos del aparato del uso mitótico. En los animales y las plantas, los centrómeros tienen megabases de longitud y están compuestos de múltiples repeticiones de DNA de secuencia simple. En los seres humanos, los centrómeros contienen disposiciones de 2 a 4 megabases de un DNA de secuencia simple de 171 pb llamado DNA *alfoide* que están unidos por nucleosomas que contienen la variante H3 de la histona CENP-A, como así también otro DNA repetitivo de secuencia simple.

En los eucariontes superiores, una estructura compleja de proteína llamada el **cinetocoro** se ensambla en los centrómeros y se asocia con múltiples fibras del huso mitótico durante la mitosis (véase la Fig. 18-39). En los seres humanos y en otros eucariontes superiores, se encuentran homólogos de muchas proteínas asociadas al centrómero de las levaduras. Para aquellas proteínas de levadura donde los homólogos claramente no son evidentes en las células superiores en base a comparaciones de secuencia aminioácídica (como el complejo Dam1), se ha propuesto que en los cinetocoros funcionan complejos alternativos con similares propiedades que están unidos a los microtúbulos del huso mitótico. La función de las proteínas del centrómero y del cinetocoro que se unen a ellos durante la segregación de las cromátidas hermanas en la mitosis y en la meiosis se describen en los Capítulos 18 y 19.

La adición de las secuencias teloméricas por la telomerasa evita el acortamiento de los cromosomas

La secuenciación de los telómeros de múltiples organismos, incluyendo los seres humanos, ha mostrado que la mayoría son oligómeros repetitivos con un alto contenido de G en la hebra con su extremo 3' al final del cromosoma. La secuencia repetitiva telomérica en los seres humanos y otros vertebrados es TTAGGG. Estas secuencias simples están repetidas en la punta del extremo de los cromosomas en algunos cientos de pares de bases en las levaduras y los protozoos, y unos pocos miles de pares de bases en los vertebrados. El extremo 3' de las hebras ricas en G se extienden 12-16 nucleótidos más allá del extremo 5' de la

hebra complementaria rica en C. Esta región está unida por proteínas específicas que protegen los extremos de los cromosomas lineales del ataque por parte de las nucleasas.

La necesidad de una región especializada en los extremos de los cromosomas eucariontes es evidente cuando se considera que todas las DNA polimerasas conocidas alargan las cadenas de DNA en el extremo 3', y todas requieren un cebador de RNA o DNA. A medida que la horquilla de replicación se aproxima al final de un cromosoma lineal, la síntesis de la hebra conductora continua hasta el final de la hebra molde de DNA, completando una doble hélice de DNA hija. Sin embargo, debido a que el molde de la hebra retardada se copia de manera discontinua, no se puede replicar en su totalidad (Fig. 6-46). Cuando se elimina el cebador de RNA final, no existe hebra en dirección 5' sobre la cual la DNA polimerasa pueda trabajar para llenar los huecos resultantes. Sin algún tipo de mecanismo especial, la hebra de DNA hija, resultante de la síntesis de la hebra rezagada, se acortaría en cada división celular.

El problema del acortamiento de los telómeros se resuelve mediante una enzima que añade las secuencias repetidas teloméricas (TEL) al extremo de cada cromosoma. La enzima es un complejo de RNA-proteína llamada *transferasa terminal telomérica* o *telomerasa*. Debido a que la secuencia de RNA asociada a la telomerasa, como veremos, sirve como molde para la adición de desoxirribonucleótidos a los extremos de los telómeros, la fuente de la enzima y no la fuente del cebador de DNA telomérico determina la secuencia añadida. Esto se probó mediante la transformación de *Tetrahymena* con una forma mutante del gen codifi-

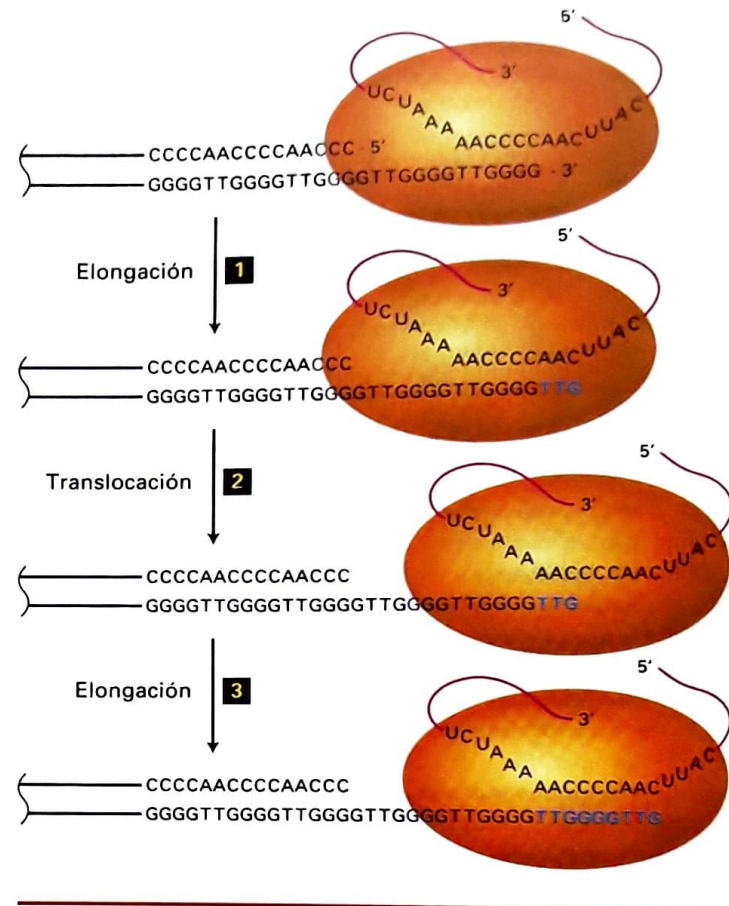
FIGURA 6-47 Mecanismo de acción de la telomerasa. El extremo 3' de una hélice final de un telómero es extendido por la telomerasa, contrarrestando la incapacidad del mecanismo de replicación del DNA para sintetizar el extremo final de DNA lineal. La telomerasa alarga este extremo de una hélice mediante un mecanismo de transcripción inversa reiterativo. Se describe la acción de la telomerasa del protozoo *Tetrahymena*, que añade una unidad de repetición T₂G₄; otras telomerasas añaden secuencias levemente diferentes. La telomerasa contiene un molde de RNA (rojo) que forma apareamiento de bases con el extremo 3' del molde de la hebra retardada. El sitio catalítico de la telomerasa luego añade desorribonucleótidos TTG (azul) usando la molécula de RNA como un molde (paso **1**). Las hebras del dúplex DNA-RNA resultante se cree que se deslizan (translocan) relativamente entre sí de manera tal que la secuencia TTG en el extremo 3' del DNA en replicación forma apareamientos de bases con la secuencia de RNA complementaria en la RNA telomerasa (paso **2**). Las telomerasas pueden añadir múltiples repeticiones al repetir los pasos **2** y **3**. La DNA polimerasa α -primasa puede cebar la síntesis de nuevos fragmentos de Okazaki en esta hebra molde extendida. El resultado neto evita el acortamiento de la hebra rezagada en cada ciclo de la replicación del DNA (De C. W. Greider y E. H. Blackburn, 1989, *Nature* **337**:331.)

cado por la telomerasa asociada al RNA. La telomerasa resultante añade una secuencia de DNA complementaria a la secuencia de RNA mutada a los extremos de los cebadores teloméricos. Así la telomerasa es una forma especializada de una transcriptasa inversa que transporta su propio molde de RNA interno para dirigir la síntesis de DNA. Estos experimentos también ganaron el premio Nobel en Fisiología y Medicina por el descubrimiento y caracterización del mecanismo de telomerasa.

La Figura 6-47 describe cómo la telomerasa, mediante la transcripción inversa de su RNA asociado, alarga el extremo 3' del DNA de una hélice en el extremo de la hebra rica en G mencionada anteriormente. Las células de ratones con desactivación génica o noqueados (*knockout*) que no pueden producir el RNA asociado a la telomerasa no presentan actividad telomerasa y sus telómeros se acortan sucesivamente con cada generación celular. Tales ratones pueden criarse y reproducirse normalmente durante tres generaciones antes de que las repeticiones teloméricas largas se erosionen sustancialmente. Luego, la ausencia de DNA telomérico produce efectos adversos, incluyendo la fusión de extremos de los cromosomas y pérdida cromosómica. A la cuarta generación, el potencial reproductivo de estos ratones noqueados disminuye y no pueden producir descendencia después de la sexta generación.

 Los genes humanos que expresan la proteína telomerasa y el RNA asociado a la telomerasa están activos en las células germinales y las células madre, pero están inactivos en la mayoría de las células de los tejidos adultos que se replican sólo una cantidad limitada de veces, o nunca más se replicarán (estas células se denominan *postmitóticas*). Sin embargo, estos genes están activados en la mayoría de las células cancerosas humanas, donde la telomerasa es necesaria para las múltiples divisiones celulares necesarias para formar un tumor. Este fenómeno estimuló la búsqueda de inhibidores de la telomerasa humana como potenciales agentes terapéuticos para tratar el cáncer. ■

Mientras la telomerasa evita el acortamiento en la mayoría de los eucariontes, algunos organismos usan estrategias alternativas. Las es-



pecies de *Drosophila* mantienen las longitudes de los telómeros al regular la inserción de los retrotransposones sin LTR en los telómeros. Éste es uno de los pocos casos en el que un elemento móvil tiene una función específica en sus organismos huésped.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 6.7

Morfología y elementos funcionales de los cromosomas eucariontes

- Durante la metafase, los cromosomas eucariontes se condensan lo suficiente como para que puedan ser visualizados en el microscopio óptico.
- El cariotipo cromosómico es característico de cada especie. Las especies estrechamente relacionadas pueden tener cariotipos extremadamente diferentes, lo cual indica que la información genética similar se puede organizar en cromosomas de diferentes maneras.
- El análisis de las bandas y la pintura cromosómica se utilizan para identificar los diferentes cromosomas metafásicos humanos y para detectar traslocaciones y deleciones (véase la Fig. 6-41).

- El análisis de los reordenamientos de cromosomas y de regiones de sintenia conservada entre especies relacionadas permite a los científicos hacer predicciones acerca de la evolución de los cromosomas (véase la Fig. 6-42c). Las relaciones evolutivas entre organismos indicadas por estos estudios son consistentes con las relaciones evolutivas propuestas en base al registro fósil y el análisis de la secuencia de DNA.

- Los patrones de bandas altamente reproducibles de los cromosomas politénicos tornan posible la visualización de deleciones y reordenamientos cromosómicos como cambios en el patrón normal de las bandas.

- Se necesitan tres tipos de secuencias de DNA para que una molécula lineal de DNA funcione como cromosomas: un origen de replicación, llamado ARS en las levaduras; una secuencia centromérica (CEN); y dos secuencias teloméricas (TEL) en los extremos del DNA (véase la Fig. 6-44).

- La telomerasa, un complejo de proteína y RNA, tiene una actividad especial de transcriptasa inversa que completa la replicación de los telómeros durante la síntesis de DNA (véase la Fig. 6-47). En la ausencia de telomerasa, la hebra de DNA hija resultante de la síntesis de la hebra rezagada se acortaría en cada una de las divisiones celulares en la mayoría de los eucariontes (véase la Fig. 6-46).

Perspectivas para el futuro

La secuencia genómica humana es una mina de oro para nuevos descubrimientos en la biología celular y molecular, en la identificación de proteínas nuevas que pueden ser la base de terapias eficaces de enfermedades humanas y para la comprensión de la historia humana primitiva y la evolución. Sin embargo, encontrar nuevos genes es como encontrar una aguja en un pajar, debido a que sólo $\approx 1,5\%$ de la secuencia codifica proteínas o RNA funcional. La identificación de genes en las secuencias genómicas bacterianas es relativamente simple debido a la carencia de intrones; simplemente la búsqueda de marcos abiertos de lecturas largos libres de codones de terminación identifica a la mayoría de los genes. Por el contrario, la búsqueda de genes humanos es complicada por la estructura de los genes humanos, la mayoría de los cuales están compuestos de múltiples exones relativamente cortos separados por intrones no codificantes, mucho más largos. La identificación de unidades de transcripción complejas mediante análisis de secuencias de DNA genómico solo es extremadamente difícil. Futuras mejoras en métodos de bioinformática para la identificación de genes y la caracterización de copias de cDNA de mRNA aislados a partir de cientos de tipos celulares humanos, probablemente conducirá al descubrimiento de nuevas proteínas, a un mejor entendimiento de los procesos biológicos y puede llevar a aplicaciones en medicina y agricultura.

Hemos visto que aunque la mayoría de los transposones no funcionan directamente en los procesos celulares, los mismos han ayudado a modelar los genomas modernos al promover las duplicaciones de genes, la combinación de exones, la generación de nuevas combinaciones de secuencias de control de la transcripción y otros aspectos de los genomas contemporáneos. También nos enseñan acerca de

nuestra historia y nuestros orígenes, puesto que los retrotransposones L1 y *Alu* se han insertado en sitios nuevos en individuos a lo largo de nuestra historia. Una gran cantidad de estas repeticiones dispersas son polimórficas dentro de las poblaciones, se producen en un sitio particular en algunos individuos y no en otros. Los individuos que comparten una inserción en un sitio particular descienden del mismo ancestro común que se desarrolló a partir de un óvulo o espermatozoide en el cual ocurrió esa inserción. El tiempo transcurrido desde la inserción inicial se puede estimar mediante las diferencias en las secuencias del elemento que surgen de la acumulación de mutaciones aleatorias. Posteriores análisis de los polimorfismos de los retrotransposones contribuirá muchísimo, y sin lugar a dudas, a la comprensión tanto de las migraciones humanas desde que el *Homo sapiens* evolucionó por primera vez, como a la historia de las poblaciones contemporáneas.

Como se describió en el Capítulo 5, se aprovechó el uso del elemento P del transposón de DNA de *Drosophila* por su fácil y estable transformación de genes en la línea germinal de *Drosophila*. Esto ha sido un método poderoso para la experimentación en la biología celular y molecular en este organismo. Un área activa de investigación actual es la del uso de transposones y retrotransposones de mamífero para la transformación de células humanas para terapia génica. Esto promete ser un área excitante de la medicina en los futuros tratamientos de enfermedades genéticas como la anemia falciforme y la fibrosis quística, como así también de enfermedades más comunes, en especial cuando se los acopla a técnicas recientemente desarrolladas para la generación de células madre pluripotentes (células iPS) a partir de células diferenciadas de un paciente pediátrico o adulto (Cap. 21).

Palabras clave

bioinformática 252	regiones asociadas
centrómero 270	a la matriz (MAR) 263
cromátida 267	monocistrónico 225
cromatina 224	nucleosoma 225
herencia citoplasmática 246	marco abierto de lectura
transposón de DNA 235	(ORF) 253
ccódigo epigenético 261	cromosoma politénico 269
eucromatina 260	familia de proteínas 228
combinación de	pseudogén 228
exones 243	retrotransposón 235
hibridación in situ	DNA repetitivo 223
con fluorescencia (FISH) 267	regiones asociadas
familia de genes 228	al armazón (SAR) 263
genómica 225	DNA de secuencia
heterocromatina 260	simple (satélite) 232
histona 225	SINE 240
código de histonas 258	proteínas SMC 263
cariotipo 267	telómero 270
LINE 240	unidad de transcripción 225
repeticiones terminales	elemento de DNA
largas (LTR) 238	transponible 223

Revisión de los conceptos

1. Los genes se pueden transcribir a mRNA para genes que codifican proteína o a RNA para genes como los RNAs ribosómico o de transferencia. Defina qué es un gen. Para las siguientes características, indique si se aplican a (a) unidades de transcripción continuas, (b) simples o (c) complejas.
 - (i) Se encuentran en eucariontes.
 - (ii) Contienen intrones.
 - (iii) Sólo capaces de hacer una proteína única a partir de un gen dado.
2. La secuenciación del genoma humano reveló mucho acerca de la organización de genes. Describa las diferencias entre genes solitarios, familias de genes, pseudogenes y genes repetidos en tándem.
3. Mucho del genoma humano consiste en DNA repetitivo. Describa la diferencia entre DNA microsatélite y minisatélite. ¿Cómo ayuda este DNA repetitivo a la identificación de individuos por la técnica de las huellas genéticas?
4. Los elementos de DNA móviles que se pueden mover o transponer a un sitio nuevo directamente como DNA se denominan transposones de DNA. Describa el mecanismo por el cual un transposón de DNA bacteriano, llamado secuencia de inserción, se puede transponer.
5. Los retrotransposones son una clase de elementos móviles que se transponen mediante un intermediario de RNA. Contraste el mecanismo de transposición entre los retrotransposones que contienen repeticiones terminales largas (LTR) y aquellos que carecen de LTR.
6. Analice el papel que los transposones pueden haber cumplido en la evolución de los organismos modernos. ¿Qué es la combinación de exones? ¿Cuál es el papel que cumplen los transposones en el proceso de combinación de exones?
7. Se cree que las mitocondrias y los cloroplastos evolucionaron a partir de una bacteria simbiótica presente en células nucleadas. ¿Cuál es la evidencia experimental de este capítulo que avala esta hipótesis?
8. ¿Qué son los genes parálogos y ortólogos? ¿Cuáles son algunas de las explicaciones para el hallazgo de que los seres humanos, siendo organismos mucho más complejos que el nematodo *C. elegans*, tengan una cantidad de genes inferior a vez y media que él (25 000 versus 18 000)?
9. El DNA en una célula se asocia con proteínas para formar cromatina. ¿Qué es un nucleosoma? ¿Cuál es la función que cumplen las histonas en los nucleosomas? ¿De qué manera se disponen los nucleosomas en las fibras condensadas de 30 nm?
10. ¿Cómo las modificaciones de la cromatina regulan la transcripción? ¿Qué modificaciones se observan en las regiones del genoma que se están transcribiendo activamente? ¿Qué sucede con las regiones que no se están transcribiendo activamente?
11. Describa la organización general de un cromosoma eucarionte. ¿Qué función estructural realizan las regiones asociadas al armazón (SAR) o las regiones de adhesión a la matriz (MAR)? ¿Por qué es lógico que los genes que codifican proteínas no se localicen en estas regiones?
12. ¿Qué es el FISH? Describa brevemente cómo funciona. ¿Cómo se utiliza el FISH para caracterizar traslocaciones cromosómicas asociadas con ciertos trastornos genéticos y tipos específicos de cánceres?
13. ¿Qué es la pintura cromosómica y por qué es útil esta técnica? ¿Cómo se pueden usar sondas que coloreen cromosomas para analizar la evolución de los cromosomas de mamífero?
14. Ciertos organismos contienen células que poseen cromosomas politénicos. ¿Qué son los cromosomas politénicos, dónde se encuentran y para qué sirven?
15. La replicación y la segregación de cromosomas eucariontes requie-

ren de tres elementos funcionales: orígenes de replicación, un centrómero y telómeros. ¿Cómo se vería afectado un cromosoma si careciera de (a) orígenes de replicación o de (b) un centrómero?

16. Describa el problema que se produce durante la replicación de los extremos de los cromosomas. ¿Cómo se relacionan los telómeros con este problema?

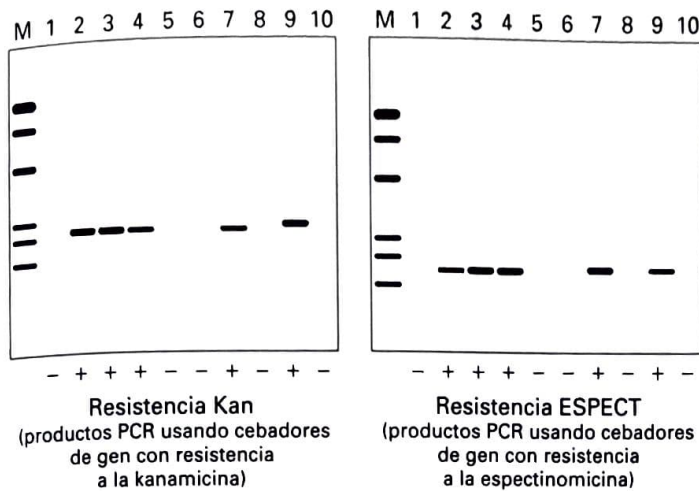
Análisis de los datos

1. Para determinar si la transferencia génica de un genoma de orgánulo al núcleo se puede observar en el laboratorio, se construyó un vector de transformación de cloroplasto que contenía dos marcadores seleccionables de resistencia a antibiótico, cada uno con su propio promotor: el gen de resistencia a la espectinomicina y el gen de resistencia a la kanamicina (véase S. Stegermann y cols., 2003, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 100:8828-8833). El gen de resistencia a la espectinomicina estaba controlado por un promotor de cloroplasto, lo cual brinda un marcador seleccionable específico de cloroplasto. Las plantas que crecieron en espectinomicina son blancas, a menos que ellas expresen el gen de resistencia a la espectinomicina en el cloroplasto. El gen de resistencia a la kanamicina, insertado en el plásmido adyacente al gen de resistencia a la espectinomicina, estaba bajo control de un promotor nuclear fuerte. Después de la transformación con este plásmido, se seleccionaron las plantas de tabaco transgénicas, resistentes a la espectinomicina, identificando las plantas verdes que crecían en un medio con espectinomicina. Estas plantas contienen los dos genes de resistencia a antibiótico insertados en el genoma de cloroplasto mediante un acontecimiento de recombinación; sin embargo, la resistencia a la kanamicina no se expresa debido a que está bajo control de un promotor nuclear. Estas plantas resistentes a la espectinomicina crecieron durante múltiples generaciones y se usaron en los siguientes estudios.

a. Hojas de plantas transgénicas resistentes a la espectinomicina se colocaron en un medio de regeneración de plantas conteniendo kanamicina. Alguna de las células de la hoja eran resistentes a la kanamicina, y se convirtieron en plantas resistentes a kanamicina. El polen (progenitor) de las plantas resistentes a kanamicina se usó para polinizar plantas de tipo silvestre (no transgénica). Las semillas resultantes fueron germinadas en un medio con y sin kanamicina. La mitad de las plántulas resultantes eran resistentes a kanamicina. Cuando a estas plantas resistentes a la kanamicina se les permitió autopolinizarse, la descendencia exhibió una proporción 3:1 de los fenotipos resistente a kanamicina respecto del sensible. ¿Qué se puede deducir de estos datos acerca de la localización del gen de la resistencia a la kanamicina?

b. Para determinar si la transferencia del gen de resistencia a la kanamicina al núcleo era mediada por un intermediario de DNA o de RNA, se extrajo DNA de 10 plántulas a partir de semillas producidas por una planta de tipo silvestre polinizada con una planta resistente a kanamicina. Las 10 plántulas, numeradas del 1-10 en los carriles del gel correspondientes en la figura de abajo, consisten en 5 plantas resistentes a la kanamicina (+) y 5 plantas sensibles a la kanamicina (-). Cada muestra de DNA se sometió a análisis por PCR usando cebadores para amplificar el gen de resistencia a kanamicina (gel de la izquierda) o el gen de resistencia a espectinomicina (gel de la derecha). La línea marcada con M muestra los marcadores de peso molecular. ¿Qué sugiere la correspondencia entre la presencia o la ausencia de productos de PCR

generados en la misma planta con ambos grupos de cebadores, acerca del modo de transferencia del gen de kanamicina al núcleo?



c. Cuando las plantas transgénicas originales, que fueron seleccionadas en espectinomicina pero no en kanamicina, se usaron para polinizar plantas de tipo silvestre, ninguna descendencia fue resistente a kanamicina. ¿Qué se puede deducir de estas observaciones?

2. El DNA satélite es un componente conocido de nuestro genoma y se puede encontrar tanto en DNA codificante como no codificante. Cuando se lo encuentra en DNA codificante, el número de repeticiones puede producir proteínas alteradas. Pero los efectos de estas repeticiones en el DNA no codificante no se comprende bien. Para determinar si las repeticiones en la región promotora pueden alterar la expresión génica y la compactación de la cromatina, Vences y cols. (Vences y cols., 2009 *Science* 324:1213-1216) buscaron en el genoma de *Sacharomyces cerevisiae* la presencia de DNA repetitivo en promotores y examinaron cómo la alternancia en el número de repeticiones afecta la expresión génica y el empaquetamiento del DNA.

a. El grupo primero buscó DNA satélite en el genoma de varias cepas de *S. cerevisiae* y encontró que el 25% de los promotores contenía al menos una región de repetición. Además, un único promotor en diferentes cepas suele contener distintos números de repeticiones en cada región del DNA satélite. ¿Cuál es el mecanismo propuesto por el cual el número de repeticiones en una región dada del DNA satélite puede aumentar?

b. Para determinar si existe una correlación entre el número de repeticiones y la expresión génica, se analizó la transcripción en el gen SDT1. El promotor SDT1 contiene DNA satélites y se modificó el número de repeticiones en esta región, variando entre 0 repeticiones y 60 repeticiones. Se descubrió que la expresión SDT1, analizada por PCR cuantitativa con transcriptasa inversa (Q RT-PCR, véase Capítulo 5), aumentaba cuando el número de repeticiones aumentaba desde 0 hasta 13 repeticiones. La expresión de SDT1 luego disminuye progresivamente a medida que el número de repeticiones aumenta desde 13 hasta 60. ¿Qué conclusión se puede hacer en base a estos resultados experimentales? Explique cómo se puede usar la Q RT-PCR para analizar la expresión génica de SDT1.

c. La conclusión de la parte (b) lleva entonces al grupo a determinar si una célula puede adaptarse a su entorno alterando el número de repeticiones en el DNA satélite del promotor. El promotor del gen SDT1

(que contiene 48 repeticiones) se adhirió al marco abierto de lectura de URA3, un gen responsable de la síntesis del nucleótido uracilo. Las células con esta proteína híbrida se colocaron en un medio sin uracilo o en un medio con uracilo. Después de crecer en esos medios, se analizó el número de repeticiones en el promotor que controla la expresión de URA3. Aquellos que crecieron en un medio sin uracilo mostraron una disminución del número de repeticiones en el promotor, mientras que aquellos que crecieron con uracilo aún tuvieron, en promedio, 48 repeticiones. ¿Qué conclusión se puede hacer de estos resultados? En base a los datos de (b), ¿cuántas repeticiones era probable encontrar en los promotores de URA3 para las células que crecieron sin uracilo?

d. La localización del DNA repetitivo en los promotores se comparó con la localización de los nucleosomas y se encontró que la densidad de los nucleosomas en un promotor estaba inversamente correlacionada con el número de repeticiones en esa localización del DNA. A partir de esto, ¿Qué concluiría usted acerca del DNA repetitivo y el empaquetamiento de la cromatina? ¿Qué efecto tendría la disminución de las repeticiones en la unión del centro de las histonas al DNA?

Referencias

Estructura de genes eucariontes

Black, D. L. 2003. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Ann. Rev. Biochem.* 72:291-336.

Davuluri, R. V., et al. 2008. The functional consequences of alternative promoter use in mammalian genomes. *Trends Genet.* 24:167-177.

Wang, E. T., et al. 2008. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* 456:470-476.

Organización cromosómica de los genes y el DNA no codificante

Celniker, S. E., and G. M. Rubin. 2003. The *Drosophila melanogaster* genome. *Ann. Rev. Genomics Hum. Genet.* 4:89-117.

Grook, Z. R., and D. Housman. 2011. Huntington's disease: can mice lead the way to treatment? *Neuron* 69:423-435.

Feuillet, C., et al. 2011. Crop genome sequencing: lessons and rationales. *Trends Plant Sci.* 16:77-88.

International Human Genome Sequencing Consortium. 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431:931-945.

Giardina, E., A. Spinella, and G. Novelli. 2011. Past, present and future of forensic DNA typing. *Nanomedicine (Lond.)* 6:257-270.

Hannan, A. J. 2010. TRPiig up the genome: tandem repeat polymorphisms as dynamic sources of genetic variability in health and disease. *Discov. Med.* 10:314-321.

Jobling, M. A., and P. Gill. 2004. Encoded evidence: DNA in forensic analysis. *Nat. Rev. Genet.* 5:739-751.

Lander, E. S., et al. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409:860-921.

Todd, P. K., and I. T. Paulson. 2010. RNA-mediated neurodegeneration in repeat expansion disorders. *Ann. Neurol.* 67:291-300.

Venter, J. C. et al. 2001. The sequence of the human genome. *Science* 291:1304-1351.

Elementos transponibles (móviles) de DNA

Curcio, M. J., and K. M. Derbyshire. 2003. The outs and ins of transposition: from mu to kangaroo. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4:865-877.

Goodier, J. L., and H. H. Kazazian, Jr. 2008. Retrotransposons revisited: the restraint and rehabilitation of parasites. *Cell* 135:23-35.

Jones, R. N. 2005. McClintock's controlling elements: the full story. *Cytogenet. Genome Res.* **109**:90-103.

Lisch, D. 2009. Epigenetic regulation of transposable elements in plants. *Ann. Rev. Plant Biol.* **60**:43-66.

DNA de orgánulos

Bendich, A. J. 2004. Circular chloroplast chromosomes: the grand illusion. *Plant Cell* **16**:1661-1666.

Bonawitz, N. D., D. A. Clayton, and G. S. Shadel. 2006. Initiation and beyond: multiple functions of the human mitochondrial transcription machinery. *Mol. Cell* **24**:813-825.

Chan, D. C. 2006. Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* **125**:1241-1251.

Genómica: análisis amplio de la estructura del genoma y la expresión génica

BLAST Information can be found at: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
1000 Genomes Project Consortium, G.P. 2010. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* **467**:1061-1073.

Alkan, C., B. P. Coe, and E. E. Eichler. 2011. Genome structural variation discovery and genotyping. *Nat. Rev. Genet.* **12**:363-376.

Chimpanzee Sequencing and Analysis Consortium. 2005. Initial sequence of the chimpanzee genome and comparison with the human genome. *Nature* **437**:69-87.

du Plessis, L., N. Skunca, and C. Dessimoz. 2011. The what, where, how and why of gene ontology—a primer for bioinformaticians. *Brief Bioinform.* 2011 Feb 17. [Epub ahead of print]

Ideker, T., J. Dutkowski, and L. Hood. 2011. Boosting signal-to-noise in complex biology: prior knowledge is power. *Cell* **144**:860-863.

International Human Genome Sequencing Consortium. 2004. Finishing the dichromatic sequence of the human genome. *Nature* **431**:931-945.

Lander, E., S. 2011. initial impact of the sequencing of the human genome. *Nature* **470**:187-197.

Mills, R. E., et al. 2011. Mapping copy number variation by population-scale genome sequencing. *Nature* **470**:59-65.

Picardi, E., and G. Pesque. 2010. Computational methods for ab initio and comparative gene finding. *Meth. Mol. Biol.* **609**:269-284.

Ramskold, D., et al. 2009. An abundance of ubiquitously expressed genes revealed by tissue transcriptome sequence data. *PLoS Comput. Biol.* **5**:e1000598.

Raney, B. J., et al. 2011. ENCODE whole-genome data in the UCSC genome browser (2011 update). *Nucl. Acids Res.* **39**:D871-D875.

Sleator, R. D. 2010. An overview of the current status of eukaryote gene prediction strategies. *Gene* **461**:1-4.

Sonah, H., et al. 2011. Genomic resources in horticultural crops: status, utility and challenges. *Biotechnol. Adv.* **29**:199-209.

Stratton, M. R. 2011. Exploring the genomes of cancer cells: progress and promise. *Science* **331**:1553-1558.

Venter, J. C. 2011. genome-sequencing anniversary. The human genome at 10: successes and challenges. *Science* **331**:546-547.

Organización estructural de los cromosomas eucariontes

Bannister, A. J., and J. Kouzarides. 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* **21**:381-395.

Bernstein, B. E., A. Meissner, and E. S. Lander. 2007. The mammalian epigenome. *Cell* **128**:669-681.

Horn, P. J. and C. L. Peterson. 2006. Heterochromatin assembly: a new twist on an old model. *Chromosome Res.* **14**:83-94.

Kurdistan, S. K. 2011. Histone modifications in cancer biology and prognosis. *Prog. Drug Res.* **67**:91-106.

Luger, K., 2006. Dynamic nucleosomes. *Chromosome Res.* **14**:5-16.

Luger, K., and T. J. Richmond. 1998. The histone tails of the nucleosome. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **3**:140-146.

Nasmyth, K., and C. H. Haering, 2005. The structure and function of SMC and kleisin complexes. *Ann. Rev. Biochem.* **74**:595-648.

Schalch, T., et al. 2005. X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre. *Nature* **436**:138-141.

Woodcock, C. L., and R. P. Ghosh. 2010. Chromatin higher-order structure and dynamics. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* **2**:a000596.

Morfología y elementos funcionales de los cromosomas eucariontes

Armanios, M., and C. W. Greider. 2005. Telomerase and cancer stem cells. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **70**:205-208.

Belmont, A. S. 2006. Mitotic chromosome structure and condensation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**:632-638.

Blackburn, E. H. 2005. Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions. *FEBS Lett.* **579**:859-862.

Cvetič, C., and J. C. Walter. 2005. Eukaryotic origins of DNA replication: could you please be more specific? *Semin. Cell Dev. Biol.* **16**:343-353.

Froenicke, L. 2005. Origins of primate chromosomes as delineated by Zoo-FISH and alignments of human and mouse draft genome sequences. *Cytogenet. Genome Res.* **108**:122-138.

MacAlpine, D. M., and S. P. Bell. 2005. A genomic view of eukaryotic DNA replication. *Chromosome Res.* **13**:309-326.

Ohta, S., et al. 2011. Building mitotic chromosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **23**:114-121.

Tanaka, T. U. 2010. Kinetochore-microtubule interactions: steps towards bi-orientation. *EMBO J.* **29**:4070-4082.



Los cromosomas politénicos de *Drosophila* teñidos con anticuerpos contra una ATPasa que remodela cromatina llamada Kismet (azul), la RNA polimerasa II con fosforilación CTD (rojo) y la RNA polimerasa II con alta fosforilación CTD (verde). [Cortesía de John Tamkun, véase S. Srinivasan y cols., 2005, *Development* **132**:1623.]

Control transcripcional de la expresión génica

En los capítulos anteriores hemos visto que las propiedades y funciones de cada tipo de célula están determinadas por las proteínas que contienen. En este capítulo y el siguiente consideraremos cómo se regulan las clases y cantidades de diversas proteínas producidas por un tipo de célula particular en un organismo multicelular. Esta regulación de la **expresión génica** es el proceso fundamental que controla el desarrollo de un organismo multicelular como nosotros mismos a partir de una célula huevo fecundada en miles de tipos de células de las que están formados. Cuando la expresión génica se trunca, se alteran las propiedades celulares, un proceso que con demasiada frecuencia lleva al desarrollo de cáncer. Como se analizará en el Capítulo 25, los genes que codifican proteínas que moderan el crecimiento celular se encuentran anormalmente reprimidos en las células cancerosas, mientras que los genes que codifican proteínas que estimulan el crecimiento celular y la replicación son activados de manera inadecuada en las células cancerosas. Las anomalías en la expresión génica dan como resultado defectos del desarrollo como el paladar hendido, la tetralogía de Fallot (un defecto grave del desarrollo del corazón que puede tratarse quirúrgicamente) y muchos otros. La regulación de la expresión génica también cumple un papel vital en las bacterias y otros microor-

ganismos unicelulares, donde permite que las células ajusten su maquinaria enzimática y los componentes estructurales en respuesta a sus cambios nutricionales y ambiente físico. En consecuencia, para comprender cómo responden los microorganismos a su ambiente y cómo se desarrollan normalmente los organismos multicelulares, y también cómo se producen las anomalías patológicas de la expresión génica, es esencial comprender las interacciones moleculares que controlan la producción de proteínas.

Los pasos básicos en la expresión génica, p. ej., el proceso donde la información codificada en un gen particular es decodificada en una proteína particular, se analizan en el Capítulo 4. La síntesis de mRNA requiere que una **RNA polimerasa** inicie la transcripción (**iniciación**), polimerice los ribonucleótidos trifosfatos complementarios a la hebra codificante de DNA (**elongación**) y luego termine la transcripción (**terminación**) (véase la Fig. 4-11). En las bacterias, los ribosomas y los factores de transcripción tienen acceso inmediato a los nuevos transcritos de RNA recién sintetizados, que funcionan como mRNA sin modificaciones posteriores. En los eucariontes, sin embargo, el transcrito de RNA inicial es sometido a un procesamiento que produce un mRNA funcional (véase la Fig. 4-15). El mRNA luego es transportado

CONTENIDO

7.1	Control de la expresión génica en bacterias	282	7.5	Mecanismos moleculares de represión y activación de la transcripción	315
7.2	Panorama general del control génico en eucariontes	288	7.6	Regulación de la actividad de los factores de transcripción	323
7.3	Promotores y factores de transcripción generales de la RNA polimerasa II	295	7.7	Regulación epigenética de la transcripción	327
7.4	Secuencias reguladoras en los genes que codifican proteínas y las proteínas mediante las cuales funcionan	302	7.8	Otros sistemas de transcripción eucariontes	336

desde ese sitio de síntesis en el núcleo hasta el citoplasma, donde es traducido a proteína con la ayuda de los ribosomas, tRNA, y factores de traducción (véanse las Figs. 4-24, 4-25 y 4-27).

La regulación puede producirse en diversos de los varios pasos en la expresión génica mencionados anteriormente: iniciación de la transcripción, elongación, procesamiento del RNA, exportación del mRNA desde el núcleo y traducción a proteína. Esto da como resultado una producción *diferencial* de proteínas en diferentes tipos celulares o estadios del desarrollo o en respuesta a condiciones externas. Aunque se han encontrado ejemplos de regulación en cada paso de la expresión génica, el control de la iniciación y la elongación de la transcripción,

los primeros dos pasos, son los mecanismos más importantes para determinar si la mayoría de los genes son expresados y cuántos de los mRNA codificados y, en consecuencia, de las proteínas, se producen. Los mecanismos moleculares que regulan la iniciación y la elongación de la transcripción son críticos para numerosos fenómenos biológicos, incluido el desarrollo de un organismo multicelular a partir de un único óvulo fecundado como se mencionó antes, las respuestas inmunitarias que nos protegen de los microorganismos patógenos y los procesos neurológicos como el aprendizaje y la memoria. Cuando estos mecanismos que controlan la función transcripcional trabajan de manera incorrecta, se producen los procesos patológicos. Por ejemplo, la activi-

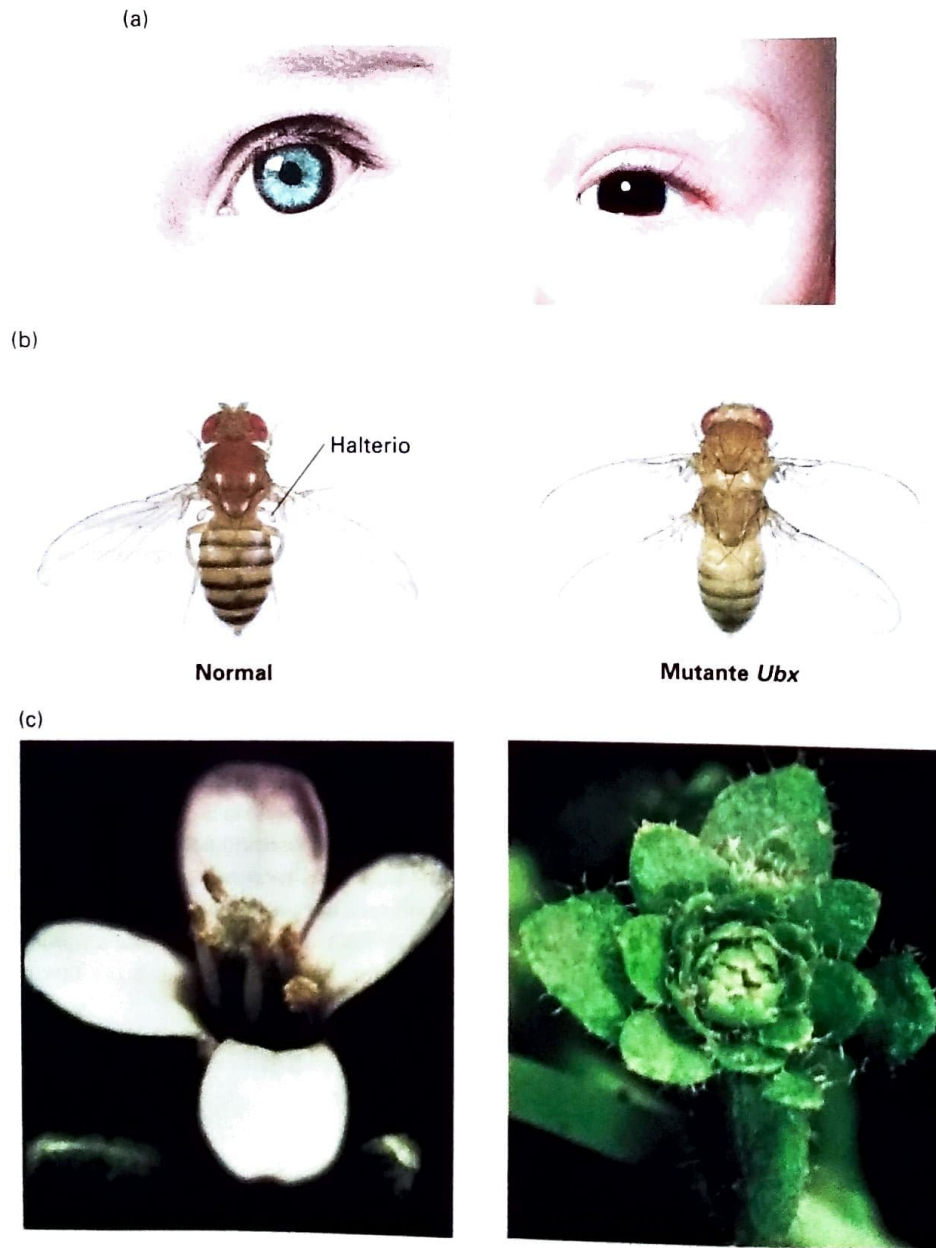


FIGURA 7-1 Fenotipos de mutaciones en los genes que codifican factores de transcripción. (a) Una mutación que inactiva una copia del gen *Pax6* ya sea en el cromosoma 9 paterno o materno da como resultado un fallo en el desarrollo del iris o *aniridia*. (b) Las mutaciones homocigotas que evitan la expresión del gen *Ubx* en el tercer segmento torácico de *Drosophila* dan como resultado la transformación del tercer segmento, que normalmente tiene un órgano de equilibrio llamado un halterio, en una segunda copia de segmento torácico que se desarrolla en alas. (c) Las mutaciones en *Arabidopsis*

thaliana que inactivan ambas copias de tres genes de identidad de órgano floral transforman las partes normales de la flor en estructuras similares a hojas. En cada caso, estas mutaciones afectan los factores de transcripción de regulación maestros que regulan múltiples genes, incluidos muchos genes que codifican otros factores de transcripción. (Parte [a], izquierda: © Simon Fraser/Photo Researchers, Inc.; derecha: Visuals Unlimited. Parte [b], de E. B. Lewis, 1978. *Nature* **276**:565. Parte [c] de D. Wiegand y E. M. Meyerowitz, 1994. *Cell* **78**:203.)

dad reducida del gen *Pax6* causa *aniridia*, una anomalía en el desarrollo del iris (Fig. 7-1a). El *Pax6* es un **factor de transcripción** que normalmente regula la transcripción de los genes involucrados en el desarrollo del ojo. En otros organismos, las mutaciones en los factores de transcripción causan un par extra de alas que se desarrollan en *Drosophila* (Fig. 7-1b), alteran las estructuras de las flores en las plantas (Fig. 7-1c) y son responsables de muchas otras anomalías del desarrollo.

La transcripción es un proceso complejo que involucra muchos tipos de regulación. En este capítulo nos centraremos en los acontecimientos moleculares que determinan cuándo ocurre la transcripción de un gen. Primero, se considerarán los mecanismos de la expresión génica en las bacterias, donde el DNA no está unido a las histonas y es empaquetado en nucleosomas. Las proteínas **represoras** y **activadoras** reconocen el DNA y se unen a él en regiones específicas para controlar la transcripción de un gen cercano. El resto del capítulo se centra en la regulación eucarionte y cómo se aplican los dogmas básicos de la regulación bacteriana en forma más compleja en los organismos superiores. Estos mecanismos también usan la asociación del DNA con los octámeros de histonas, formando es-

tructuras de cromatina con varios grados de condensación y modificaciones postraduccionales como la acetilación y la metilación para regular la transcripción. La Figura 7-2 proporciona un panorama general de la regulación de la transcripción en metazoos (animales multicelulares) y los procesos esquematizados en este capítulo. Se analizarán cómo las secuencias de DNA específicas funcionan como **regiones de control de la transcripción** al servir como los sitios de unión para los factores de transcripción (represores y activadores) y cómo las RNA polimerasas responsables de la transcripción se unen a las secuencias del **promotor** para iniciar la síntesis de una molécula de RNA complementaria al molde de DNA. A continuación, se considerará cómo influyen los activadores y los represores en la transcripción por medio de las interacciones con complejos multiproteicos grandes. Algunos de estos complejos modifican la condensación de la cromatina y alteran el acceso de los factores de transcripción y la RNA polimerasa al DNA cromosómico. Otros complejos influyen en la velocidad a la cual se une la RNA polimerasa al DNA en el sitio de iniciación de la transcripción, como también a la frecuencia de iniciación. Investigaciones muy recientes revelan que, en los animales multicelula-

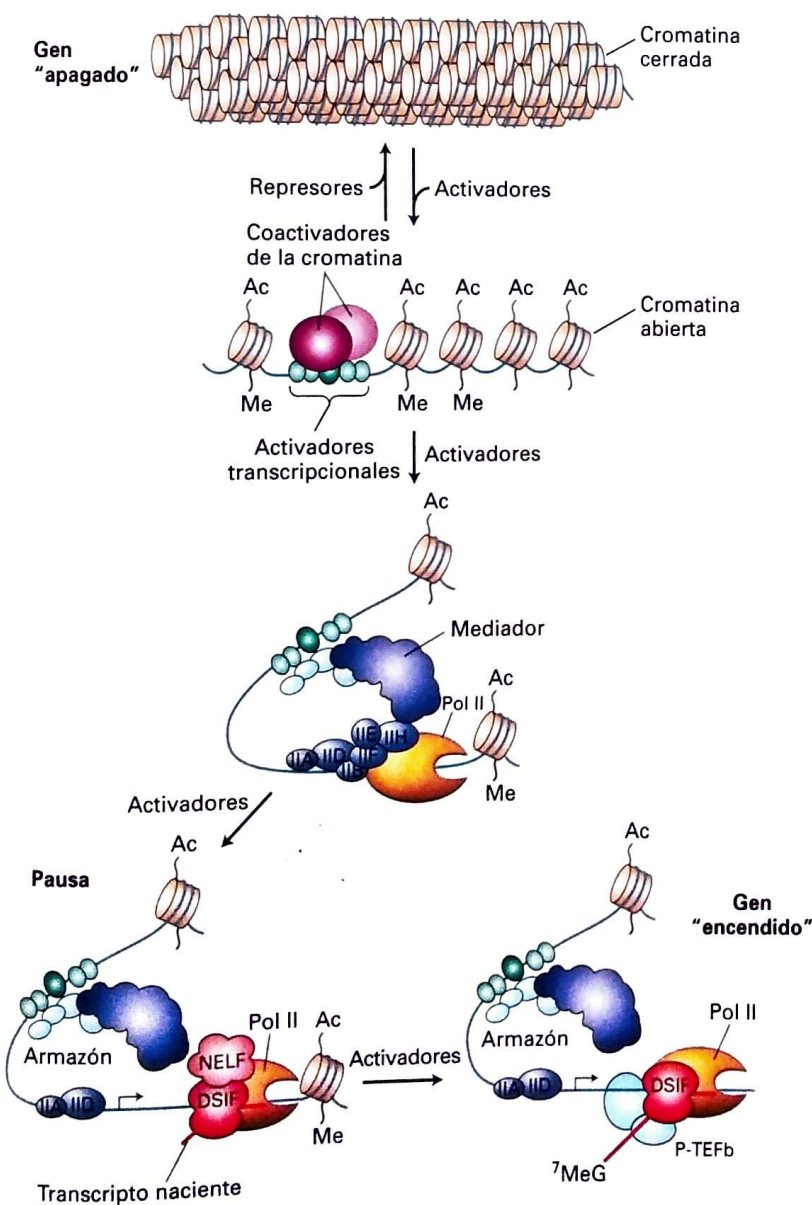
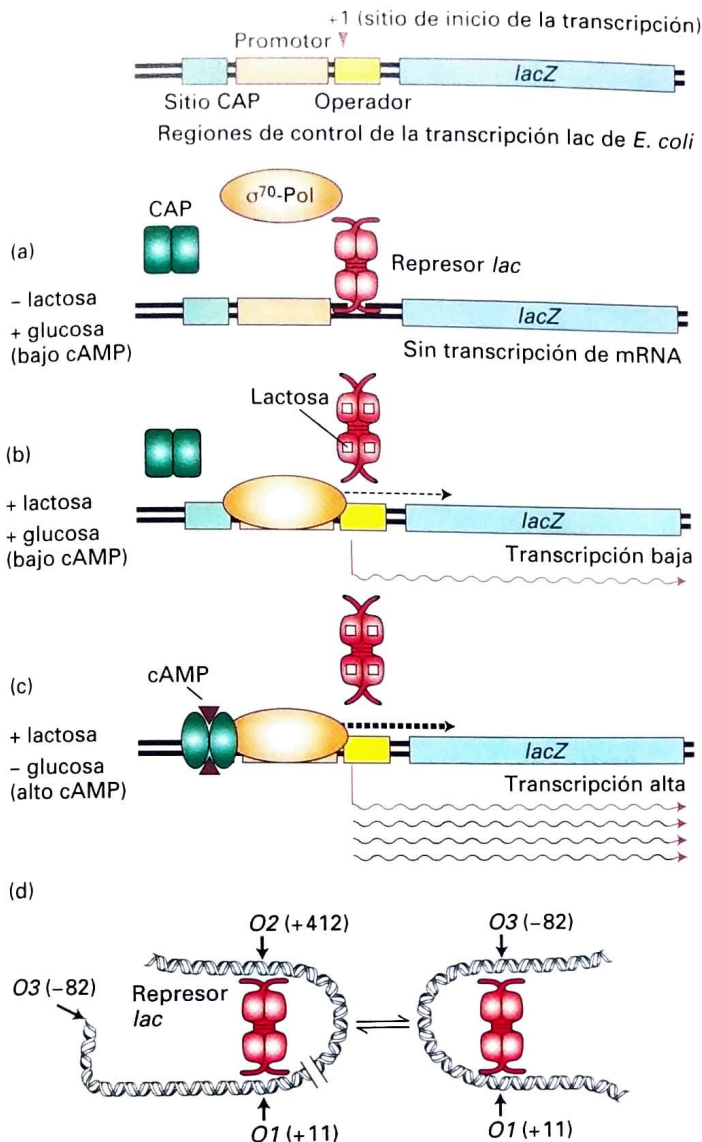


FIGURA 7-2 Panorama general del control de la transcripción eucarionte. Los genes inactivos se ensamblan en regiones de la cromatina condensada que inhiben a la RNA polimerasa y a sus factores de transcripción generales asociados (GTF) de interactuar con los promotores. Las proteínas activadoras se unen a elementos de control de secuencia de DNA específica en la cromatina e interactúan con complejos multiproteicos coactivadores de la cromatina y el mediador multisubunidad para ensamblar la RNA polimerasa y los factores de transcripción generales en los promotores. Alternativamente, las proteínas represoras se unen a otros elementos de control para inhibir la iniciación por parte de la RNA polimerasa e interactúan con complejos multiproteicos correpresores para condensar la cromatina. La RNA polimerasa inicia la transcripción pero se detiene después de transcribir 20-50 nucleótidos debido a la acción de inhibidores de la elongación. Los activadores promueven la asociación de los factores de elongación que liberan los inhibidores de la elongación y permiten la elongación productiva a través de todo el gen. DSIF es el factor inductor de la sensibilidad DRB, NELF es el factor de elongación negativa y P-TEFb es una proteína-quinasa que comprende la CDK9 y la ciclina T. [Adaptado de S. Malik y R. G. Roeder, 2010, *Nat. Rev. Genet.* 11:761.]



la síntesis de solo bajos niveles de mRNA *lac* hasta que la concentración citosólica de glucosa caiga a niveles bajos. La transcripción del operón *lac* bajo diferentes condiciones está controlado por el represor *lac* y la proteína activadora del catabolito (CAP, *catabolite activator protein*) (también llamada CRP, por proteína receptora del catabolito [*catabolite receptor protein*]), cada uno de los cuales se une a una secuencia de DNA específica en la región de control de la transcripción *lac* llamadas **operador** y el **sito CAP**, respectivamente (Fig. 7-3, arriba).

Para que la transcripción del operón *lac* comience, la subunidad σ^{70} de la RNA polimerasa debe unirse al promotor *lac* en las secuencias promotoras -35 y -10. Cuando la lactosa está presente, el represor *lac* se une al operador *lac*, que se superpone con el sitio de inicio de la transcripción. Por lo tanto, el represor *lac* unido al sitio operador bloquea la unión de σ^{70} y, por ende, la iniciación de la transcripción por la RNA polimerasa (Fig. 7-3a). Cuando la lactosa está presente, se une a sitios de unión específicos en cada subunidad del represor tetramérico *lac* y causa un cambio conformacional en la proteína que hace que se disocie del operador *lac*. Como resultado, la polimerasa se puede unir al promotor e iniciar la transcripción del operón *lac*. Sin embargo,

FIGURA 7-3 Regulación de la transcripción del operón *lac* de *E. coli*.

(Arriba) La región de control de la transcripción, compuesta por ≈ 100 pares de bases, incluye tres regiones de unión a proteína: el sitio CAP, que une la proteína activadora del catabolito; el promotor *lac*, que une el complejo RNA polimerasa- σ^{70} , y el operador *lac*, que une el represor *lac*. El gen *lacZ* que codifica la enzima β -galactosidasa, el primero de tres genes en el operón, se muestra a la derecha. (a) En ausencia de lactosa, se produce muy poco mRNA *lac* debido a que el represor *lac* se une al operador, inhibiendo la iniciación de la transcripción por parte de la RNA polimerasa- σ^{70} . (b) En presencia de glucosa y lactosa, el represor *lac* une lactosa y se disocia del operador, lo que permite que la RNA polimerasa- σ^{70} inicie la transcripción a un ritmo bajo. (c) La transcripción máxima del operón *lac* se produce en presencia de lactosa y en ausencia de glucosa. En esta situación, aumenta el cAMP en respuesta a la baja concentración de glucosa y se forma el complejo CAP-cAMP, que se une al sitio CAP, donde interactúa con la RNA polimerasa para estimular la velocidad de la iniciación de la transcripción. (d) El represor tetramérico *lac* se une al operador *lac* primario (*O1*) y uno de los dos operadores secundarios (*O2* u *O3*) simultáneamente. Las dos estructuras están en equilibrio. [Parte (d) adaptado de B. Muller-Hill, 1998, *Curr. Opin. Microbiol.* 1:145.]

cuando la glucosa también está presente, la velocidad de iniciación de la transcripción (p. ej., el número de veces por minuto que diferentes moléculas de RNA polimerasas inician la transcripción) es muy baja, lo que da como resultado la síntesis solo de bajos niveles del mRNA *lac* y de las proteínas codificadas en el operón *lac* (Fig. 7-3b). La frecuencia de iniciación de la transcripción es baja debido a que las secuencias -35 y -10 en el promotor *lac* difieren de las secuencias de unión de σ^{70} que se mostraron previamente.

Una vez que la glucosa es extraída del medio y la concentración de glucosa intracelular disminuye, *E. coli* responde sintetizando AMP cíclico, o cAMP. A medida que la concentración de cAMP aumenta, este se une a un sitio en cada subunidad de la proteína CAP dimérica, provocando un cambio de conformación que le permite unirse al sitio CAP en la región de control de transcripción de *lac*. El complejo CAP-cAMP interactúa con la polimerasa unida al promotor, estimulando la velocidad de iniciación de la transcripción. Esta activación lleva a la síntesis de altos niveles de *lac* mRNA y posteriormente de las enzimas codificadas por el operón *lac* (Fig. 7-3).

En efecto, el operón *lac* es más complejo de lo que se describe en el modelo simplificado de la Figura 7-3, partes (a)-(c). El represor tetramérico *lac* suele unirse a dos sitios simultáneamente, uno al operador primario (*lacO1*) que se solapa con la región de DNA unida por la RNA polimerasa en el promotor en uno de los dos operadores secundarios centrados en +412 (*lacO2*) y -82 (*lacO3*) (Fig. 7-3b). El represor tetramérico *lac* es un dímero de dímeros. Cada dímero se une a un operador. La unión simultánea del represor tetramérico *lac* al operador *lac* primario *O1* y a uno de los dos operadores secundarios es posible debido a que el DNA es bastante flexible, como vimos en el empaquetamiento del DNA alrededor de la superficie de un octámero de histona en los nucleosomas de los eucariotes (Fig. 6-29).

Estos operadores secundarios funcionan para aumentar la concentración local del represor *lac* en la microvecindad del operador donde la unión del represor bloquea la unión de la RNA polimerasa. Como el equilibrio de las reacciones de unión depende de las concentraciones de las parejas de unión, la concentración local aumentada resultante del represor *lac* en la vecindad de *O1* incrementa la unión del represor a *O1*. Existen aproximadamente 10 tetrámeros de represores *lac* por célula.

la de *E. coli*. Debido a la unión a O2 y O3, casi siempre hay un tetrámero de represor *lac* mucho más cerca de O1 de lo que sería el caso si los 10 represores difundieran al azar por toda la célula. Si tanto O2 como O3 están mutados de manera tal que el represor *lac* no se une más a ellos con alta afinidad, la represión en el promotor *lac* se reduce en un factor de 70. La mutación de solo O2 o solo O3 reduce el doble la represión, lo cual indica que cualquiera de estos dos operadores secundarios proporciona la mayor parte de la estimulación de la represión.

Aunque los promotores de diferentes genes de *E. coli* muestran considerable homología, sus secuencias exactas difieren. La secuencia promotora determina la velocidad intrínseca a la cual el complejo RNA polimerasa- σ^{70} inicia la transcripción de un gen en la ausencia de un represor o activador. Los promotores que soportan una tasa alta de iniciación de la transcripción tienen secuencias -35 y -10 similares al promotor ideal mostrado anteriormente y se denominan *promotores fuertes*. Aquellos que soportan una tasa baja de iniciación de la trans-

cripción difieren de esta secuencia ideal y se denominan *promotores débiles*. El operón *lac*, por ejemplo, tiene un promotor débil. Su secuencia difiere del promotor consenso fuerte en diversas posiciones. Esta baja tasa intrínseca es reducida aún más por el represor *lac* y aumentada sustancialmente por el activador cAMP-CAP.

Pequeñas moléculas regulan la expresión de muchos genes bacterianos por medio de los represores y activadores de unión al DNA

La transcripción de la mayoría de los genes de *E. coli* está regulada por procesos similares a aquellos descritos para el operón *lac*, aunque las interacciones detalladas difieren en cada promotor. El mecanismo general involucra un represor específico que se une a la región operadora de un gen u operón, bloqueando la iniciación de la transcripción. Una molécula de ligando (o ligandos) pequeña se une al represor, controla

Cuadro 7-1 Factores sigma de <i>E. coli</i>			
Factor sigma	Promotores reconocidos	Promotor consenso	
		Región -35	Región -10
σ^{70} (σ^D)	Genes de mantenimiento, la mayoría de los genes en las células que se replican exponencialmente	TTGACA	TATAAT
σ^S (σ^{38})	Genes en fase estacionaria y respuesta al estrés general	TTGACA	TATAAT
σ^{32} (σ^H)	Inducidos por proteínas desplegadas en el citoplasma; genes que codifican chaperonas que vuelven a plegar proteínas desplegadas y sistemas de proteasas que llevan a la degradación de proteínas desplegadas en el citoplasma	TCTCNCCCTTGAA	CCCCATNTA
σ^E (σ^{24})	Activados por proteínas desplegadas en el espacio periplasmático y en la membrana celular; genes que codifican proteínas que restauran la integridad de la envoltura nuclear	GAACTT	TCTGA
σ^F (σ^{28})	Genes involucrados en el ensamblaje de flagelos	CTAAA	CCGATAT
FecI (σ^{18})	Genes necesarios para la incorporación de hierro	TTGGAAA	GTAATG
		REGIÓN -24	REGIÓN -12
σ^{54} (σ^N)	Genes para el metabolismo del nitrógeno y otras funciones	CTGGNA	TTGCA

FUENTE: T. M. Gruber y C. A. Gross, 2003, *Ann. Rev. Microbiol.* 57:441, S. L. McKnight y K. R. Yamamoto, eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press; R. L. Gourse, W. Ross y S. T. Rutherford, 2006, *J. Bacteriol.* 188:4627; U. K. Sharma y D. Chatterji, 2010, *FEMS Microbiol. Rev.* 34:646.

su actividad de unión al DNA y, en consecuencia, la velocidad de transcripción apropiadas para las necesidades de la célula. Al igual que para el operón *lac*, muchas regiones de control de la transcripción contienen uno o más operadores secundarios que contribuyen al nivel de represión.

Las proteínas activadoras específicas, como CAP en el operón *lac*, también controlan la transcripción de un subgrupo de genes bacterianos que tienen sitios de unión para el activador. Al igual que CAP, otros activadores se unen al DNA junto con la RNA polimerasa, estimulando la transcripción a partir de un promotor específico. La actividad de unión al DNA de un activador puede ser modulada en respuesta a las necesidades celulares mediante la unión de ligandos de moléculas pequeñas (p. ej., cAMP) o por modificaciones postraduccionales, como la fosforilación, que alteran la conformación del activador.

La iniciación de la transcripción a partir de algunos promotores requiere factores sigma alternativos

La mayoría de los promotores de *E. coli* interactúan con RNA polimerasa σ^{70} , la principal forma de iniciación de la enzima bacteriana. Sin embargo, la transcripción de ciertos grupos de genes es iniciada por las RNA polimerasas de *E. coli* que contienen uno de los diversos factores sigma alternativos que reconocen diferentes secuencias promotoras consenso, además de la σ^{70} que reconoce (Cuadro 7-1). Estos factores σ alternativos son necesarios para la transcripción de grupos de genes con funciones relacionadas como aquellas involucradas en la respuesta al shock térmico o la falta de nutrientes, a la motilidad, o la esporulación en las eubacterias grampositivas. En *E. coli* existen seis factores alternativos además del principal factor σ “doméstico”, el σ^{70} . El genoma de la bacteria esporulativa, grampositiva *Streptomyces coelicolor* codifica 63 factores σ , el récord actual, sobre la base del análisis de secuencias de cientos de genomas de eubacterias. La mayoría están estructural y funcionalmente relacionados con σ^{70} . Pero una clase no está relacionada, representada en *E. coli* por σ^{54} . La iniciación de la transcripción por las RNA polimerasas que contienen factores similares a σ^{70} está regulada por represores y activadores que se unen al DNA cerca de la región donde se une la polimerasa, similar a la iniciación por la RNA polimerasa σ^{70} en sí misma.

La transcripción por la σ^{54} -RNA polimerasa está controlada por activadores que se unen lejos del promotor

La secuencia de un factor sigma de *E. coli*, σ^{54} , es distintivamente diferente de la de todos los factores similares a σ^{70} . La transcripción de los genes por la RNA polimerasa que contiene σ^{54} está regulada solamente por activadores cuyos sitios de unión al DNA, llamados **potenciadores** o **intensificadores**, en general se localizan entre 80-160 pares de bases corriente arriba del sitio de inicio. Incluso cuando los potenciadores se encuentran más de una kilobase más allá del sitio de inicio, los activadores σ^{54} pueden activar la transcripción.

El activador mejor caracterizado, σ^{54} —la proteína NtrC (proteína C reguladora de nitrógeno)— estimula la transcripción del gen *glnA*. Este gen codifica la enzima glutamina sintetasa, que sintetiza el aminoácido glutamina a partir de ácido glutámico y amoníaco. La RNA polimerasa σ^{54} se une al promotor *glnA* pero no separa las hebras de DNA e inicia la transcripción hasta que es activada por NtrC, una proteína dimérica. NtrC, a su vez, está regulada por una proteína-cinasa llamada NtrB. En respuesta a bajos niveles de glutamina, NtrB fosforila

a NtrC dimérica, que luego se une a un potenciador corriente arriba del promotor *glnA*. NtrC fosforilada unida al potenciador luego estimula a la polimerasa σ^{54} unida al promotor para separar las hebras de DNA e iniciar la transcripción.

Estudios con microscopia electrónica demuestran que NtrC unida al potenciador y la polimerasa σ^{54} unida al promotor interactúan directamente, formando un lazo o bucle en el DNA entre los sitios de unión (Fig. 7-4). Como se analizó anteriormente en este capítulo, este mecanismo de activación se asemeja al mecanismo predominante de los activadores transcripcionales en los eucariontes.

NtrC tiene actividad ATPasa y se necesita de la hidrólisis de ATP para la activación de la polimerasa σ^{54} unida por la NtrC fosforilada. Evidencia de esto es que los mutantes con una NtrC defectuosa en la hidrólisis de ATP son invariablemente defectuosos en la estimulación de la polimerasa σ^{54} para separar las hebras de DNA en el sitio de inicio de la transcripción. Se postula que la hidrólisis de ATP suministra la energía necesaria para la separación de las hebras de DNA. Por el contrario, la polimerasa σ^{70} no requiere de la hidrólisis de ATP para separar las hebras en el sitio de inicio.

Muchas respuestas bacterianas están controladas por sistemas reguladores de dos componentes

Como recién vimos, el control del gen *glnA* de *E. coli* depende de dos proteínas, NtrC y NtrB. Tales sistemas reguladores de dos componentes controlan muchas respuestas de las bacterias a los cambios en el entorno. A concentraciones elevadas de glutamina, ésta se une a un dominio sensor de NtrB y causa un cambio conformacional en la proteína que inhibe su actividad de histidina cinasa (Fig. 7-5a). Al mismo tiempo, el dominio regulador de NtrC bloquea el dominio de unión al DNA a partir del potenciador de *glnA*. En condiciones de baja glutamina, ésta se disocia del dominio sensor en la proteína NtrC, llevando a la activación de un dominio histidina cinasa *transmisor* en la NtrB que transfiere el fosfato γ del ATP a un residuo de histidina (H) en el dominio *transmisor*. Esta fosfohistidina luego transfiere el fosfato a un residuo de ácido aspártico (D) en la proteína NtrC. Esto provoca un cambio conformacional en NtrC que desmascara el dominio de unión al DNA de NtrC, de manera tal que se puede unir al potenciador de *glnA*.

Muchas otras respuestas bacterianas están reguladas por dos proteínas con homología a NtrB y NtrC (Fig. 7-5b). En cada uno de estos sistemas reguladores, una proteína, llamada *histidina cinasa sensora*, contiene un dominio transmisor histidina cinasa que es regulado en respuesta a los cambios medioambientales detectados por un dominio sensor. Cuando se activa, el dominio transmisor transfiere el fosfato del ATP al residuo de histidina en el dominio transmisor. La segunda proteína, llamada un *regulador de respuesta*, contiene un dominio *receptor* homólogo a la región de NtrC que contiene el residuo de ácido aspártico que es fosforilado por NtrB activada. El regulador de respuesta contiene un segundo dominio funcional que está regulado por la fosforilación del dominio receptor. En muchos casos este dominio del regulador de respuesta es un dominio de unión al DNA específico de secuencia que se une a secuencias de DNA relacionadas y funciona tanto como represor, como el represor *lac*, o como un activador, como CAP o NtrC, regulando la transcripción de genes específicos. Sin embargo, el dominio efector también puede tener otras funciones, como controlar la dirección en la cual la bacteria nada en respuesta a un gradiente de concentración de nutrientes. Aunque to-

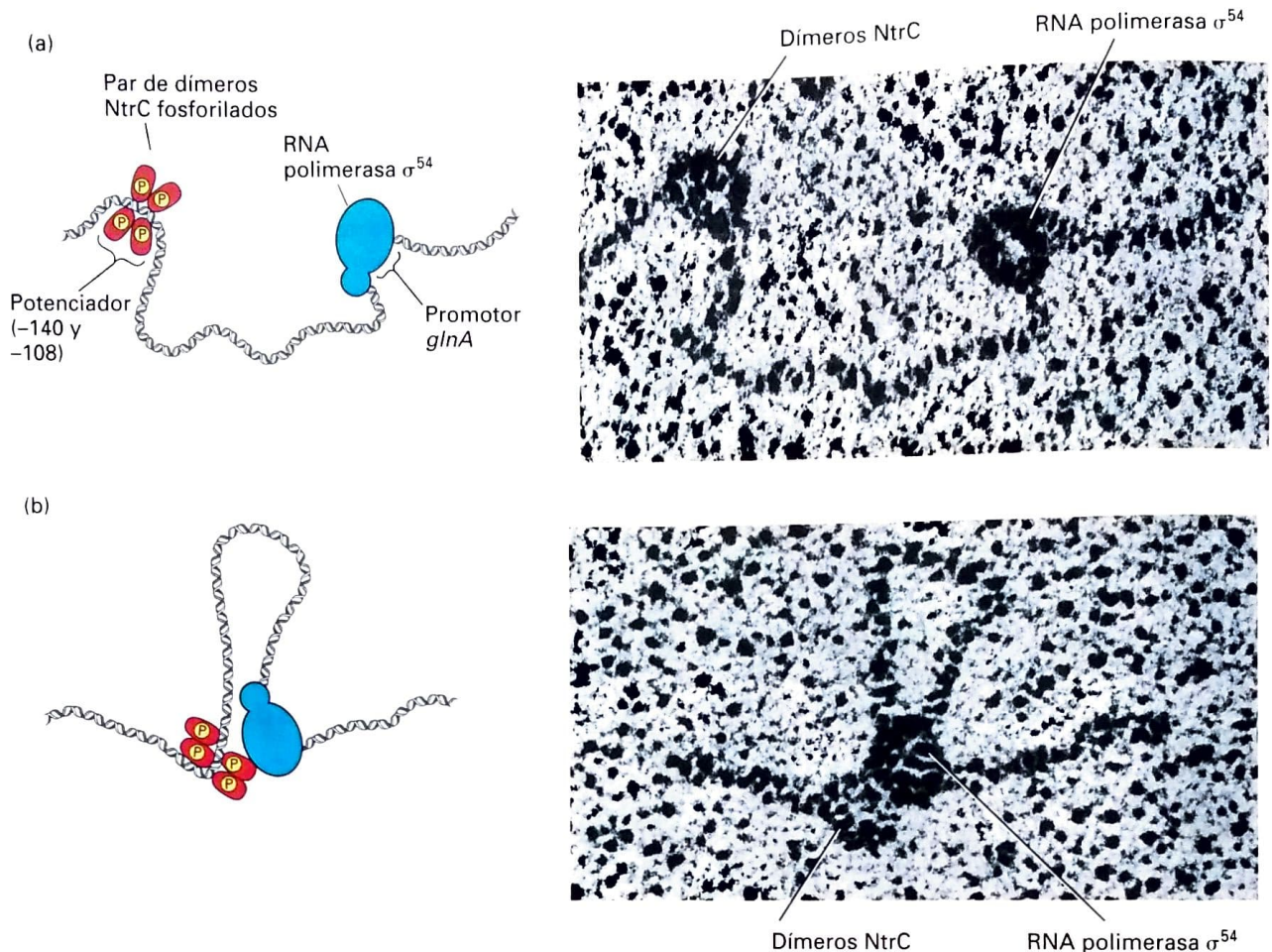


FIGURA EXPERIMENTAL 7-4 La formación de un bucle de DNA permite la interacción del NtrC unido y la RNA polimerasa- σ^{54} . (a) Dibujo (izquierda) y microfotografía electrónica (derecha) del fragmento de restricción de DNA con dímeros de NtrC fosforilados en la región potenciadora cerca de un extremo y la RNA polimerasa- σ^{54} unida al promotor de *glnA* cerca del otro

extremo. (b) Dibujo (izquierda) y microfotografía electrónica (derecha) de la misma preparación de fragmento que muestra que los dímeros NtrC y la RNA polimerasa- σ^{54} se unen entre sí con el DNA que interviene formando un bucle entre ellos. [Microfotografías de W. Su y cols., 1990, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* **87**:5505; cortesía de S. Kustu.]

dos los dominios transmisores son homólogos (como lo son también los dominios receptores), el dominio transmisor de una proteína sensora específica fosforilará solo los dominios receptores de reguladores de respuesta específica, permitiendo las respuestas específicas a diferentes cambios ambientales. En las plantas también se encuentran similares sistemas reguladores de dos componentes histidil-aspartil de retransmisión por fosfato.

Control de la elongación de la transcripción

Además de la regulación de la transcripción iniciada por activadores y represores, la expresión de muchos operones bacterianos está controlada por la regulación de la elongación de la transcripción en la región proximal al promotor. Esto se descubrió por primera vez en estudios de la transcripción del operón *Trp* en *E. coli* (Fig. 4-13). La transcripción del operón *Trp* es reprimida por el represor Trp cuando la concentración del triptófano en el citoplasma es alta. Pero los niveles bajos de iniciación de la transcripción que aún se produce son controlados aún más mediante un proceso denominado *atenuación* cuando la concentración de tRNA^{Trp} es suficiente como

para soportar una alta tasa de síntesis proteica. Los primeros 140 nt del operón *Trp* no codifican proteínas necesarias para la biosíntesis de triptófano, sino que consisten en una secuencia líder como se esquematiza en la Figura 7-6a. La región 1 de esta secuencia líder contiene dos codones sucesivos de Trp. La región 3 puede formar apareamiento de bases con las regiones 2 y 4. Un ribosoma sigue de cerca detrás de la RNA polimerasa e inicia la traducción de un péptido líder poco después de que emerge el extremo 5' de la secuencia líder del Trp de la RNA polimerasa. Cuando la concentración de tRNA^{Trp} es suficiente para llevar a cabo una alta tasa de síntesis de proteína, el ribosoma traduce a través de la región 1 a la región 2, bloqueando la capacidad de la región 2 de formar apareamiento de bases con la región 3 a medida que emerge desde la superficie de la RNA polimerasa que transcribe (Fig. 7-6b, izquierda). En su lugar, la región 3 forma apareamientos de bases con la región 4 tan pronto como emerge desde la superficie de la polimerasa, formando una horquilla de RNA (véase Fig. 4-9a) seguida por varios uracilos, que es una señal para la RNA polimerasa bacteriana de pausar la transcripción y terminar. Como consecuencia, el resto del operón *Trp* largo no se transcribe, y la célula no desperdicia energía necesaria

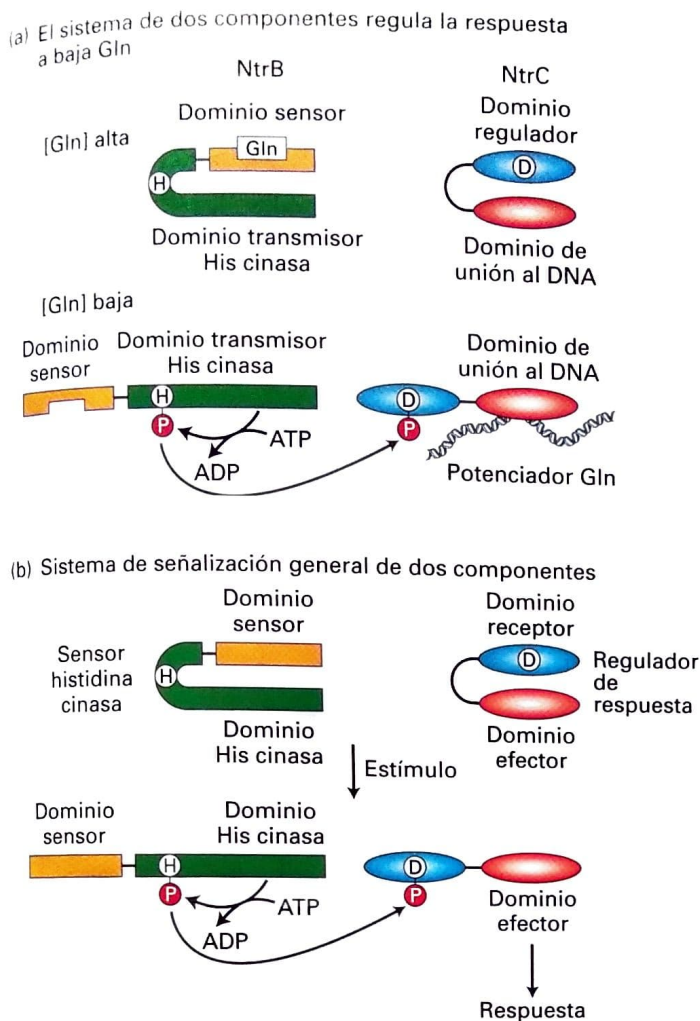


FIGURA 7-5 Sistemas reguladores de dos componentes. A bajas concentraciones citoplasmáticas de glutamina, esta se disocia del NtrB y provoca un cambio de conformación que activa un dominio proteína-cinasa transmisor que transfiere un fosfato γ del ATP a una histidina (H) conservada en el dominio transmisor. Luego este fosfato es transferido a un ácido aspártico (D) en el dominio regulador del regulador de respuesta NtrC. Esto convierte a NtrC en su forma activada, que se une a los sitios potenciadores corriente arriba del promotor de *glnA* (Figura 7-4). (b) Organización general de los sistemas reguladores fosforilantes de dos componentes histidil-aspartil en bacterias y plantas [Adaptado de A. H. West y A. M. Stock, 2001, *Trends Biochem. Sci.* **26**:369]

para su síntesis o para la traducción de las proteínas codificadas cuando la concentración del triptófano es alta.

Sin embargo, cuando la concentración de tRNA^{Trp} no es suficiente para poder llevar a cabo una alta tasa de síntesis proteica, el ribosoma se detiene en los dos codones de Trp sucesivos en la región 1 (Fig. 7-6b, derecha). En consecuencia, la región 2 forma apareamiento de bases con la región 3 tan pronto como emerge de la RNA polimerasa que está transcribiendo. Esto evita que la región 3 forme apareamiento de bases con la región 4, por lo tanto no se forma la horquilla 3-4 y la RNA polimerasa no realiza una pausa o termina la transcripción. Como resultado, las proteínas necesarias para la síntesis de triptófano son traducidas por los ribosomas que inician la traducción en los codones de inicio para cada una de las proteínas en el mRNA policistrónico largo de Trp.

La atenuación de la elongación de la transcripción también se produce en algunos operones y los genes simples que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de otros aminoácidos y metabolitos a través de la función de los *ribosensores*. Estos RNA forman estructuras terciarias que pueden unir moléculas pequeñas cuando están presentes en concentraciones lo suficientemente altas. En algunos casos esto da

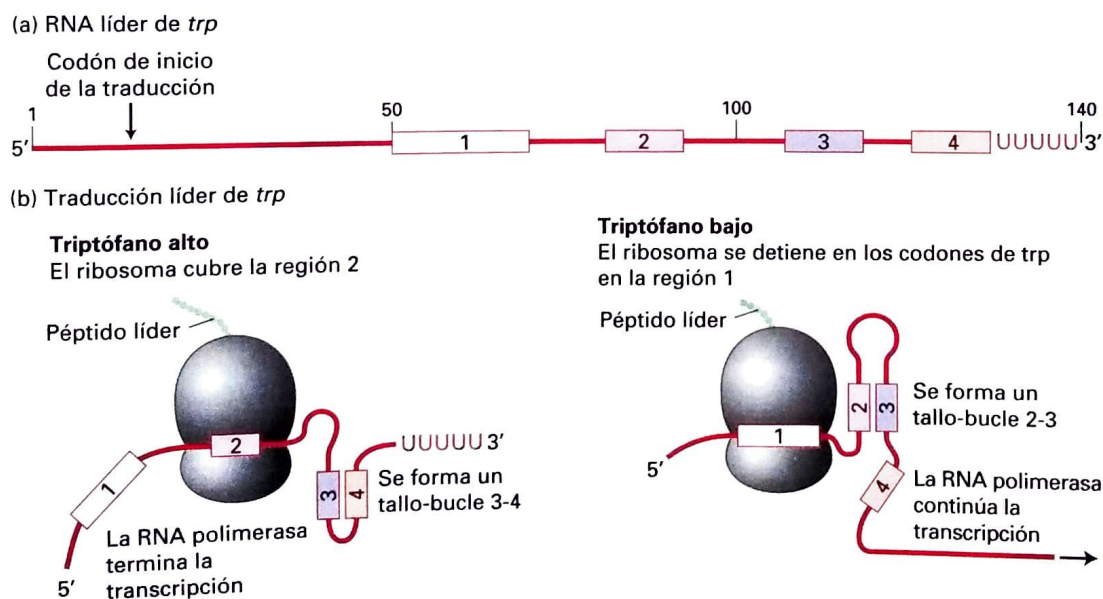


FIGURA 7-6 Control transcripcional mediante regulación de la elongación y la terminación por parte de la RNA polimerasa en el operón *Trp* de *E. coli*. (a) Diagrama de los 140 nucleótidos del RNA líder de *trp*. Las regiones coloreadas son cruciales para el control de la atenuación. (b) La región de la secuencia líder *trp* comienza en el extremo 5' inmediatamente después de que es sintetizado, mientras que la síntesis del resto de la molécula de mRNA *trp* policistrónica continúa. A concentraciones elevadas de

tRNA^{Trp} aminoacilado, la formación del tallo-bucle 3-4 seguida por una serie de U provoca la terminación de la transcripción. A bajas concentraciones de tRNA^{Trp} aminoacilado, la región 3 se encuentra secuestrada en el tallo-bucle 2-3 y no puede formar apareamiento de bases con la región 4. En ausencia de la estructura de tallo-bucle necesaria para la terminación, la transcripción del operón *trp* continúa. [Véase C. Yanofsky, 1981, *Nature* **289**:751.]

como resultado la formación de estructuras de horquillas que conducen a la terminación temprana de la transcripción como en el operón *Trp*. Cuando la concentración de estos ligandos de moléculas pequeñas es más baja, los metabolitos no son unidos por el RNA y se forman estructuras alternativas de RNA que no inducen la terminación de la transcripción. Como se analiza a continuación, aunque el mecanismo de pausa de la transcripción y la terminación en los eucariontes es diferente, recientemente se ha descubierto que la regulación de la pausa transcripcional proximal al promotor y de la terminación también se producen frecuentemente en la regulación de la expresión génica en organismos multicelulares.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 7.1

Control de la expresión génica en bacterias

- La expresión génica tanto en procariontes como en eucariontes está regulada principalmente por mecanismos que controlan la iniciación de la transcripción.
- El primer paso en la iniciación de la transcripción en *E. coli* es la unión de la subunidad σ que forma complejo con una RNA polimerasa a un promotor.
- La secuencia nucleotídica de un promotor determina su fuerza, es decir, cuán frecuentemente se unen diferentes moléculas de RNA polimerasas e inician la transcripción por minuto.
- Los represores son proteínas que se unen a las secuencias operadoras que se superponen o se encuentran adyacentes a los promotores. La unión de un represor a un operador inhibe la iniciación de la transcripción.
- La actividad de unión al DNA de la mayoría de los represores bacterianos está modulada por los ligandos de moléculas pequeñas. Esto permite que las células bacterianas regulen la transcripción de los genes específicos en respuesta a cambios en la concentración de varios nutrientes en el ambiente y a metabolitos en el citoplasma.
- El operón *lac* y algunos otros genes bacterianos también están regulados por las proteínas activadoras que se unen al lado del promotor y aumentan la tasa de iniciación de la transcripción mediante la interacción directa con la RNA polimerasa unida a un promotor adyacente.
- El principal factor sigma en *E. coli* es σ^{70} , pero también se encuentran varios otros factores sigma, menos abundantes, cada uno de los cuales reconocen diferentes secuencias promotoras consenso o interactúan con diferentes activadores.
- La iniciación de la transcripción por todas las RNA polimerasas de *E. coli*, excepto aquellas que contienen σ^{54} , puede ser regulada por los represores y los activadores que se unen cerca del sitio de inicio de la transcripción (véase la Fig. 7-3).
- Los genes transcritos por la RNA polimerasa σ^{54} son regulados por activadores que se unen a los potenciadores localizados ≈ 100 pares de bases corriente arriba del sitio de inicio. Cuando el activador y la RNA polimerasa σ^{54} interactúan, el DNA entre sus sitios de unión forman un bucle (véase la Fig. 7-4).
- En los sistemas reguladores de dos componentes, una proteína actúa como un sensor y controla la concentración de nutrientes u otros

componentes en el ambiente. En condiciones adecuadas, primero se transfiere el fosfato γ de un ATP a una histidina en la proteína sensora y luego a un ácido aspártico en una segunda proteína, el regulador de respuesta. El regulador de respuesta fosforilado luego ejecuta una función específica en respuesta al estímulo, como la unión a secuencias reguladoras de DNA, y estimula o reprime de esta forma la transcripción de genes específicos (véase la Fig. 7-5).

• La transcripción en las bacterias también se puede regular mediante control de la elongación transcripcional en la región proximal al promotor. Esto puede regularse por la unión de ribosomas al mRNA naciente como en el caso del operón *Trp* (Fig. 7-6), o por los *ribosensores*, las estructuras terciarias de RNA que unen moléculas pequeñas, para determinar si se forma una estructura en horquilla seguida por una cadena de uracilos, lo que provoca que la RNA polimerasa bacteriana realice una pausa y termine la transcripción.

7.2 Panorama general del control génico en eucariontes

En las bacterias, el control génico sirve principalmente para permitir que una única célula se ajuste a los cambios en su ambiente, de manera tal que se optimice su crecimiento y división. En los organismos multicelulares, los cambios ambientales también inducen cambios en la expresión génica. Un ejemplo es la respuesta al bajo oxígeno (hipoxia) en la cual un grupo específico de genes es inducido rápidamente para ayudar a la célula a sobrevivir bajo condiciones de hipoxia. Estas incluyen las proteínas angiogénicas secretadas que estimulan el crecimiento y la penetración de capilares nuevos dentro del tejido circundante. Sin embargo, el propósito más característico y de mayor alcance biológico del control génico en los organismos multicelulares es la ejecución del programa genético que subyace al desarrollo embriológico. La generación de muchos tipos celulares diferentes que en forma colectiva forman un organismo multicelular depende de que los genes adecuados se activen en las células correctas en el momento oportuno durante el período de desarrollo.

En la mayoría de los casos, una vez que una célula ha dado un paso en el desarrollo, no retrocede. Por lo tanto, las decisiones son fundamentalmente diferentes de la activación y la represión reversible de los genes bacterianos en respuesta a las condiciones ambientales. En la ejecución de sus programas genéticos, muchas células diferenciadas (p. ej., las células cutáneas, los eritrocitos y las células productoras de anticuerpos) siguen un destino que las lleva a la muerte celular, sin dejar descendencia. Los patrones fijos del control génico que conducen a la diferenciación sirven a las necesidades de todo el organismo y no a la supervivencia de una célula individual. A pesar de las diferencias en los propósitos del control génico en bacterias y eucariontes, dos características clave del control transcripcional primero descubiertas en las bacterias y descriptas en la sección anterior también se aplican a las células eucariontes. Primero, las secuencias de DNA reguladoras de unión a proteínas, o los elementos de control, están asociadas con genes. Segundo, las proteínas específicas que se unen a una secuencia reguladora de un gen determinan dónde comenzará la transcripción y activará o reprimirá su transcripción. Una diferencia fundamental entre el control transcripcional en las bacterias y los eucariontes es una consecuencia de la asociación de DNA cromosómico eucarionte con octámeros de histonas, formando nucleosomas que se asocian con las fibras de cro-

matina que además se asocian a la cromatina variando los grados de condensación (Figs. 6-29, 6-30, 6-32 y 6-33). Las células eucariontes explotan la estructura de la cromatina para regular la transcripción, un mecanismo de control de la transcripción que no está disponible en las bacterias. Como se representa en la Figura 7-2, en los eucariontes multicelulares, muchos genes inactivos están ensamblados en la cromatina condensada, que inhibe la unión de las RNA polimerasas y los factores de transcripción general requeridos para la iniciación de la transcripción. Las proteínas activadoras se unen a los elementos de control cerca del sitio de inicio de la transcripción de un gen así como a kilobases alejadas y promueve la descondensación de la cromatina, la unión de la RNA polimerasa al promotor y la elongación de la transcripción por medio de la cromatina. Las proteínas represoras se unen a elementos de control alternativos y causan la condensación de la cromatina y la inhibición de la unión de la polimerasa o la elongación. En esta sección se analizarán los principios generales del control génico eucarionte y se señalan algunas similitudes y diferencias entre los sistemas eucariontes y bacterianos. Las secciones subsiguientes de este capítulo conducirán a aspectos específicos de la transcripción eucarionte en mayor detalle.

Los elementos reguladores en el DNA eucarionte se pueden encontrar junto a los sitios de inicio de la transcripción o a muchas kilobases de distancia

Las mediciones directas de las tasas de transcripción de múltiples genes en diferentes tipos celulares demuestran que la regulación de la transcripción, ya sea en el paso de iniciación o durante la elongación al alejarse del sitio de inicio de la transcripción, es la forma más común de control génico en eucariontes, como también lo es en bacterias. En los eucariontes, como en las bacterias, una secuencia de DNA que especifica dónde se une la RNA polimerasa e inicia la transcripción de un gen se denomina un promotor. La transcripción a partir de un promotor particular está controlada por las proteínas de unión al DNA que son funcionalmente equivalentes a los represores y activadores bacterianos. Estudios recientes sugieren que la capacidad intrínseca de la secuencia de DNA de una región promotora para asociarse con octámeros de histonas también influye en la transcripción. Puesto que las proteínas reguladoras de la transcripción pueden funcionar como activadores o represores de la transcripción, según su asociación con otras proteínas, suelen denominarse en forma más general como *factores de transcripción*. Los elementos de control de la transcripción en los genomas eucariontes que unen factores de transcripción suelen estar localizados mucho más lejos del promotor que ellos regulan que en el caso de los genomas procariontes. En algunos casos, los factores de transcripción que regulan la expresión de genes que codifican proteínas en los eucariontes superiores se unen a sitios reguladores decenas de miles de pares de bases ya sea **corriente arriba** (opuesta a la dirección de la transcripción) o **corriente abajo** (en la misma dirección de la transcripción) a partir del promotor. Como resultado de esta disposición, múltiples factores de transcripción a elementos de control alternativos, dirigiendo la expresión del mismo gen en diferentes tipos de células y en diferentes momentos durante el desarrollo.

Por ejemplo, diversas secuencias de DNA de control de la transcripción separadas regulan la expresión del gen de mamíferos que codifica el factor de la transcripción *Pax6*. Como se mencionó anteriormente, la proteína *Pax6* es necesaria para el desarrollo del ojo. *Pax6* también es

necesaria para el desarrollo de ciertas regiones del cerebro y la médula espinal y las células en el páncreas que secretan hormonas como la insulina. Como también se mencionó anteriormente, los seres humanos heterocigotos con solo un gen *Pax6* funcional nacen con *aniridia*, una falta de iris en los ojos (Fig. 7-1a). El gen *Pax6* se expresa a partir de los últimos tres promotores alternativos que funcionan en diferentes tipos de células y en diferentes momentos durante la embriogénesis (Fig. 7-7a).

Los investigadores a menudo analizan las regiones de control génico mediante preparación de moléculas de DNA recombinantes que pueden contener un fragmento de DNA para ser probado con la región codificante para un **gen indicador (informador)** que es fácil de analizar. Los genes indicadores típicos son luciferasa, que genera luz que puede ser evaluada con mayor sensibilidad y por muchos órdenes de magnitud de intensidad usando un luminómetro. Otros genes indicadores usados con frecuencia codifican una proteína verde fluorescente (véase Figs. 9-8d y 9-15) y la β -galactosidasa de *E. coli*, que genera un precipitado azul intenso cuando es incubada con X-gal, el análogo a la lactosa, insoluble e incoloro. Cuando se preparan ratones transgénicos (véase Fig. 5-43) que contienen un gen indicador β -galactosidasa fusionado a 8 kb de DNA corriente arriba del exón 0 de *Pax6*, la β -galactosidasa se observa en los cristalinos, las córneas y el páncreas en desarrollo del embrión a mitad de término de la gestación (Fig. 7-7b). El análisis de los ratones transgénicos con fragmentos de DNA más pequeños a partir de esta región permitió el mapeo de las regiones de control de la transcripción separadas que regulan la transcripción en el páncreas y en los cristalinos y la córnea. Los ratones transgénicos con otras construcciones de genes indicadores revelan regiones de control de la transcripción adicionales (Fig. 7-7a). Éstas controlan la transcripción en la retina en desarrollo y en diferentes regiones del cerebro en desarrollo (encéfalo). Algunas de estas regiones de control de la transcripción están en intrones entre los exones 4 y 5 y entre los exones 7 y 8. Por ejemplo, un gen informador bajo control de la región marcada *retina* en la Figura 7-7a entre los exones 4 y 5 lleva a la expresión del gen informador específicamente en la retina (Fig. 7-7c).

Las regiones de control para muchos genes se encuentran a varios cientos de kilobases de distancia de los exones codificantes del gen. Un método para identificar tales regiones de control distantes es comparar las secuencias de organismos lejanamente relacionados. Las regiones de control de la transcripción para un gen conservado también suele estar conservadas y pueden ser reconocidas en la base de una secuencia no funcional que divergió durante la evolución. Por ejemplo, existe una secuencia de DNA humano ≈ 500 kilobases corriente abajo del gen *SALL1* que está altamente conservada en ratones, ranas, pollos y peces (Fig. 7-8a). *SALL1* codifica un represor de la transcripción necesario para el desarrollo normal del intestino delgado, los riñones, los miembros y los oídos. Cuando se generaron ratones transgénicos que contenían esta secuencia de DNA conservada unida a un gen indicador β -galactosidasa (Fig. 7-8b), los embriones transgénicos expresaron una alta concentración del gen indicador β -galactosidasa específicamente en los esbozos de los miembros en desarrollo (Fig. 7-8c). Los pacientes humanos con deleciones en esta región del genoma se desarrollan con anomalías en los miembros. Estos resultados indican que esta región conservada dirige la transcripción del gen *SALL1* en el desarrollo de los miembros. Presumiblemente, otros potenciadores controlan la expresión de este gen en otros tipos de células, donde funcionan en el desarrollo normal de oídos, intestino delgado y riñones. Después de analizar las proteí-

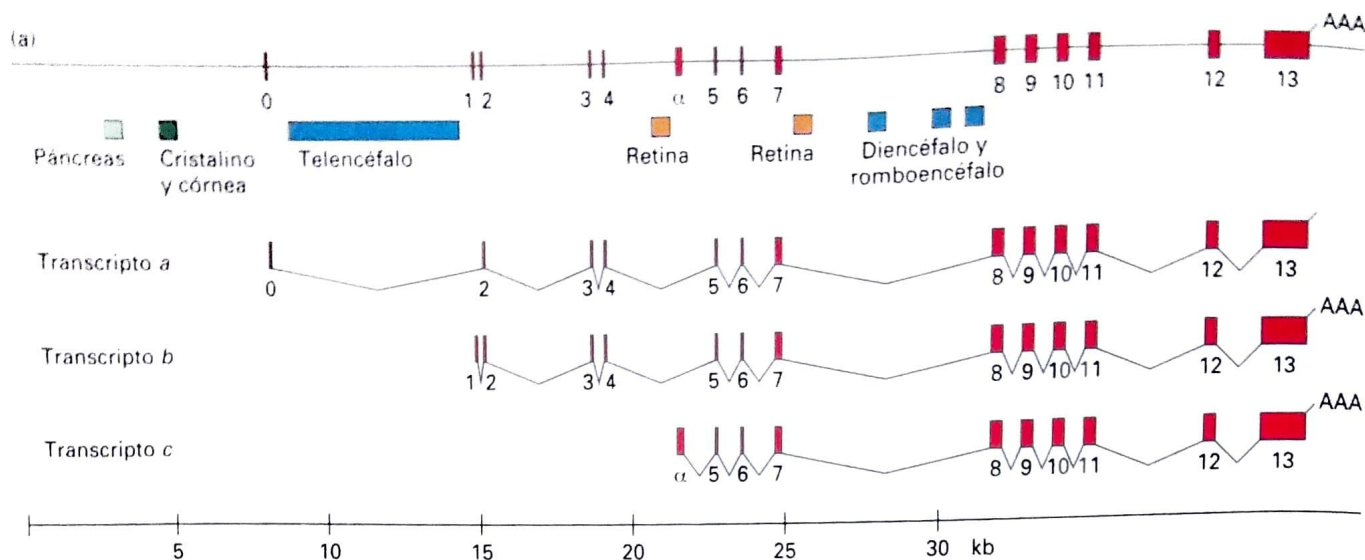
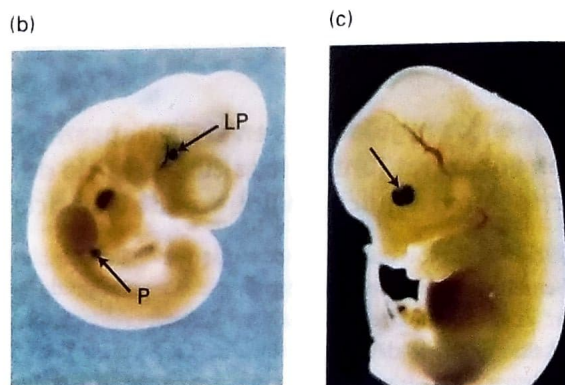


FIGURA 7-7 Análisis de las regiones de control de la transcripción del gen murino Pax6 en ratones transgénicos. (a) Tres promotores de Pax6 alternativos se utilizan en distintos momentos durante la embriogénesis en diferentes tejidos específicos del embrión en desarrollo. Las regiones de control de la transcripción que regulan la expresión de Pax6 en diferentes tejidos se indican mediante rectángulos coloreados. La región de control específica del telencéfalo en el intrón 1 entre los exones 0 y 1 no se ha mapeado a alta resolución. Las otras regiones de control mostradas tienen = 200-500 pares de bases de longitud. (b) La β-galactosidasa expresada en los tejidos de un embrión murino con un transgen β-galactosidasa informador 10,5 días después de la fecundación. El genoma del embrión murino que contiene un transgen con 8 kb de DNA corriente arriba del exón 0 se fusionó a la región codificante de la β-galactosidasa. Fosita del cristalino (*lens pit*, LP) es el tejido que se desarrollará en las lentes del ojo. La expresión también se observó en tejidos que se desarrollarán en el páncreas (P). (c) La expresión de la β-galactosidasa en un embrión de 13,5 días con un gen informador β-galactosidasa bajo control de la secuencia en la parte (a) entre los exones 4 y 5 marcados como Retina. Las flechas apuntan hacia las regiones nasal y temporal del desarrollo de la retina. Las regiones de control de la transcripción de Pax6 también se encontraron 17 kb corriente abajo desde el exón 3' en un intrón del gen vecino. [Parte (a) adaptado de B. Kammendal y cols., 1999, *Dev. Biol.* 205:79. Partes (b) y (c) cortesía de Peter Gruss.]



Cada RNA polimerasa eucarionte cataliza la transcripción de los genes que codifican diferentes clases de RNA (Cuadro 7-2). La RNA polimerasa I (Pol I), localizada en el nucléolo, transcribe genes que codifican el precursor rRNA (*pre-rRNA*), que se procesa en los rRNA 28S, 5,8S y 18S. La RNA polimerasa III (Pol III) transcribe los genes que codifican los tRNA, el rRNA 5S y un grupo de RNA pequeños, estables, que incluye uno involucrado en el procesamiento del RNA (U6) y el componente RNA de la partícula de reconocimiento de la señal (SRP) involucrado en el direccionamiento de las proteínas nacientes hacia el retículo endoplasmático (Cap. 13). La RNA polimerasa II (Pol II) transcribe todos los genes que codifican proteínas: es decir, funciona en la producción de los mRNA. La RNA polimerasa II también produce cuatro de los cinco RNA nucleares pequeños que intervienen en el corte y empalme del RNA y los micro-RNA (miRNA) involucrados en el control de la traducción así como los RNA de interferencia pequeños (siRNA) estrechamente relacionados (véase el Cap. 8).

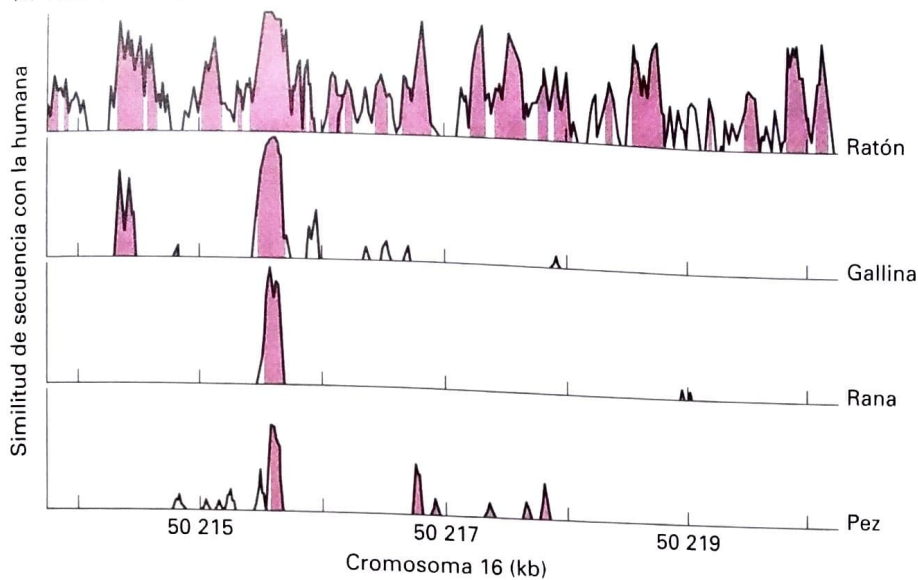
Cada una de las tres RNA polimerasas eucariontes es más compleja que la RNA polimerasa de *E. coli*, aunque sus estructuras son similares (Fig. 7-10a, b). Las tres contienen dos subunidades grandes y 10-14 subunidades más pequeñas, algunas de las cuales son comunes entre las dos o las tres polimerasas. Las RNA polimerasas eucariontes mejor caracterizadas son de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Cada uno de los genes de levadura que codifican las subunidades de las polimerasas se han sometido a mutaciones por noqueo de genes (*knockout*) y se han caracterizado los fenotipos resultantes. Además, se ha determinado la

nas que llevan a cabo la transcripción en las células eucariontes y los promotores eucariontes, regresaremos a un análisis de cómo se cree que funcionan tales regiones de control de la transcripción, llamadas **potenciadores**.

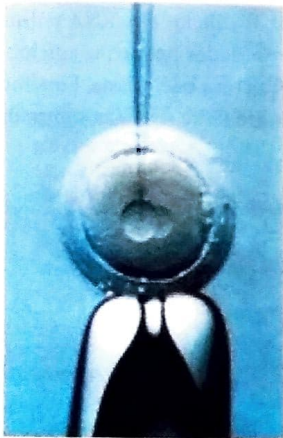
Tres RNA polimerasas eucariontes catalizan la formación de diferentes RNA

El núcleo de todas las células eucariontes analizadas hasta el momento (p. ej., vertebrados, *Drosophila*, levaduras y células vegetales) contienen tres RNA polimerasas diferentes, designadas I, II y III. Estas enzimas eluyen a diferentes concentraciones salinas durante la cromatografía de intercambio iónico, lo que refleja las diversas cargas netas de las polimerasas. Las tres polimerasas también difieren en su sensibilidad a α-amanitina, un octapéptido cíclico venenoso producido por algunos hongos (Fig. 7-9). La RNA polimerasa I es insensible a la α-amanitina, pero la RNA polimerasa II es muy sensible —el fármaco se une cerca del sitio activo de la enzima e inhibe la traslocación de ésta a lo largo del DNA molde—. La RNA polimerasa III tiene una sensibilidad intermedia.

(a) Análisis comparativo



(b) Microinyección en óvulo de ratón



(c) Tinción informador E11.5

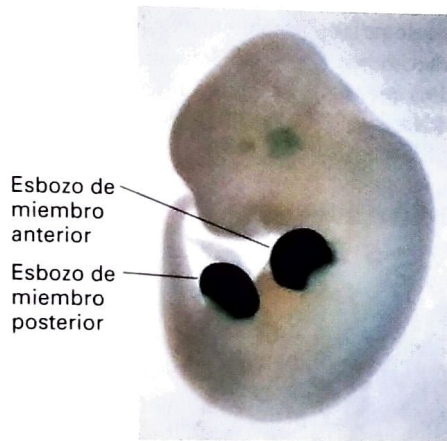


FIGURA EXPERIMENTAL 7-8 El potenciador del gen *SALL1* humano activa la expresión de un gen informador en las yemas de las extremidades del embrión murino en desarrollo.

(a) Representación gráfica de la secuencia de DNA conservada en una región del genoma humano (desde 50214-50220,5 kb de la secuencia del cromosoma 16) $\approx$ 500 kb corriente abajo desde el gen *SALL1* que codifica un represor de la transcripción dedos de cinc. Una región de $\approx$ 500 pb de secuencia no codificante está conservada desde los peces hasta los seres humanos. Novecientos pares de bases incluida esta región conservada se insertaron en un plásmido al lado de la región codificante para la β -galactosidasa de *E. coli*. (b) El plásmido se microinyectó dentro de un pronúcleo de un huevo murino fecundado y se implantó en el útero de una ratona seudopreñada para generar un embrión murino transgénico con el "gen informador" en el plásmido inyectado incorporado en su genoma (véase la Fig. 5-43). (c) Después de 11,5 días de desarrollo, cuando se desarrollaron los esbozos de los miembros, el embrión fijado y permeabilizado se incubó en X-gal, que es convertido por la β -galactosidasa en un compuesto insoluble de color azul intenso. La región de $\approx$ 900 pb de DNA humano que contenía un potenciador estimuló la intensa transcripción del gen informador β -galactosidasa en los esbozos de los miembros específicamente. [De VISTA Enhancer Browser, <http://enhancer.lbl.gov>. Partes (b) y (c) cortesía de Len A. Pennacchio, Joint Genome Institute, Lawrence Berkeley National Laboratory.]

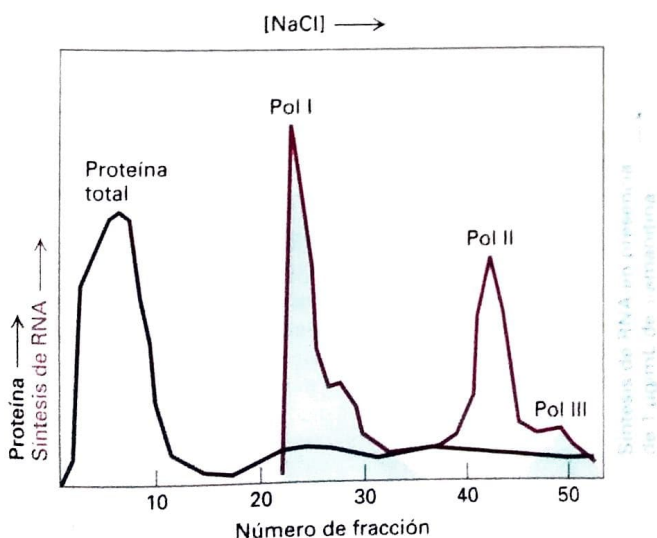
estructura tridimensional de la RNA polimerasa II de levadura (Fig. 7-10b, c). Las tres RNA polimerasas nucleares de todos los eucariontes analizadas hasta el momento son muy similares a las de las levaduras. Las plantas contienen dos RNA polimerasas nucleares adicionales

(RNA polimerasas IV y V), que están estrechamente relacionadas con su RNA polimerasa II pero tienen una única subunidad grande y algunas subunidades únicas adicionales. Éstas actúan en la represión transcripcional mediante los siRNA nucleares en las plantas, que se analizará hacia el final de este capítulo.

Las dos subunidades grandes de las tres RNA polimerasas eucariontes (y las RNA polimerasas IV y V de las plantas) están relacionadas entre sí y son similares a las subunidades β' y β de *E. coli*, respectivamente (Fig. 7-10). Cada una de las polimerasas eucariontes también contiene una subunidad del tipo ω y dos subunidades del

FIGURA EXPERIMENTAL 7-9 La columna de cromatografía separa e identifica las tres polimerasas de RNA eucariontes, cada una de las cuales tiene su propia sensibilidad a la α -amanitina.

Un extracto proteico del núcleo de células eucariontes cultivadas fue pasado a través de una columna de DEAE. Sphadex adsorbió proteínas eluidas (curva negra) con una solución de incremento constante de la concentración de NaCl. Las fracciones del eluido se evaluaron para actividad polimerasa de RNA (curva roja). A una concentración de 1 μ g/mL, la α -amanitina inhibe la actividad de la polimerasa II pero no afecta a las polimerasas I y III (sombreado verde). La polimerasa III es inhibida por 10 μ g/mL de α -amanitina, mientras que la polimerasa I no se ve afectada ni siquiera por estas concentraciones tan elevadas. [Véase R. G. Roeder, 1974, *J. Biol. Chem.* **249**:241.]



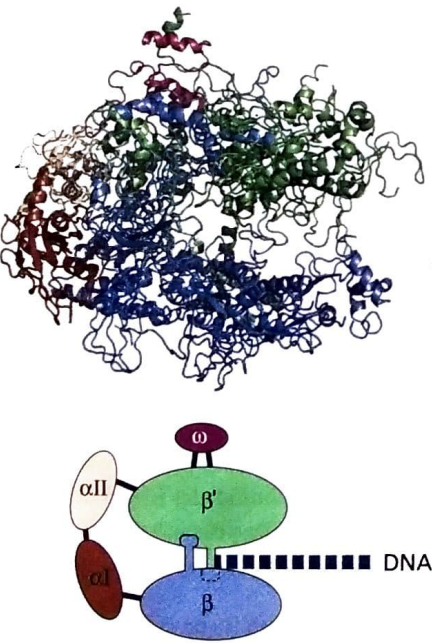
Cuadro 7-2 Clases de RNA transcritos por las tres RNA polimerasas nucleares eucariontes y sus funciones

Polimerasa	RNA transcripto	Función del RNA
RNA polimerasa I	Pre-rRNA (rRNA 28S, 18S, 5,8S)	Componentes de ribosomas, síntesis de proteína
RNA polimerasa II	mRNA snRNA siRNA miRNA	Codifica proteína Corte y empalme de RNA Represión mediada por cromatina, control de la traducción Control de la traducción
RNA polimerasa III	tRNA 5S rRNA snRNA U6 7S RNA Otros RNA cortos estables	Síntesis de proteína Componente de ribosoma, síntesis de proteína Corte y empalme de RNA Partícula de reconocimiento de la señal para inserción de polipéptidos en el retículo endoplasmático Diversas funciones, desconocidas para muchos

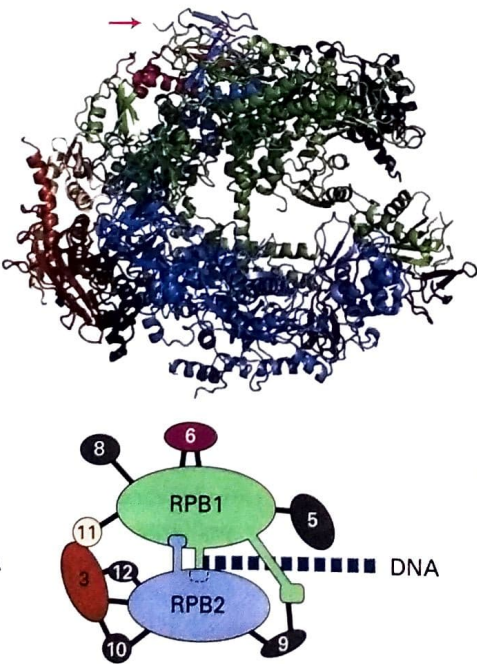
tipo α no idénticas (Fig. 7-11). Las amplias similitudes en la estructura de estas subunidades centrales en las RNA polimerasas de varias fuentes indican que esta enzima surgió temprano en la evolución y se conservó en gran medida. Esto parece lógico para una enzima que cataliza un proceso tan fundamental como es el copiado de RNA a par-

tir de DNA. Además, a sus subunidades centrales relacionadas con las subunidades de la RNA polimerasa de *E. coli*, las tres RNA polimerasas de levadura contienen cuatro subunidades pequeñas adicionales, comunes a ellas pero no a la RNA polimerasa bacteriana. Finalmente, cada RNA polimerasa nuclear eucarionte tiene diversas subunidades

(a) RNA polimerasa bacteriana



(b) RNA polimerasa II de levadura



(c) RNA polimerasa II de levadura

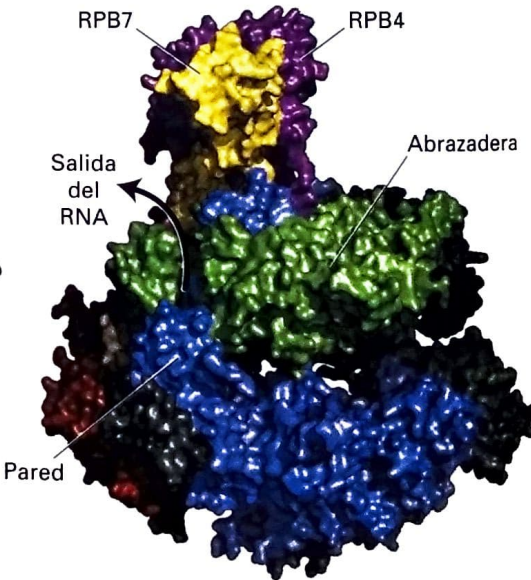


FIGURA 7-10 Comparación de las estructuras tridimensionales de las RNA polimerasas bacteriana y eucarionte. (a, b) Estos modelos de C_{α} se basan en el análisis cristalográfico de rayos x de la RNA polimerasa de la bacteria *T. aquaticus* y el centro de la RNA polimerasa II de *S. cerevisiae*. (a) Las cinco subunidades de la enzima bacteriana se distinguen por el color. En este modelo solo se incluyen los dominios N-terminales de las subunidades α . (b) En este modelo se muestran 10 de las 12 subunidades que constituyen la RNA polimerasa II de la levadura. Las subunidades que son similares en conformación a aquellas en la enzima bacteriana se muestran en los mismos colores. El dominio C-terminal de una subunidad grande RPB1 no se observó en la

estructura cristalina, pero se sabe que se extiende desde la posición marcada con una flecha roja. (RPB es la abreviatura para "RNA polimerasa B," que es una forma alternativa de referirse a la RNA polimerasa II.) Se esquematiza al DNA penetrando las polimerasas a medida que éstas transcriben hacia la derecha. (c) Modelo espacial de la RNA polimerasa II de levadura que incluye las subunidades 4 y 7. Estas subunidades se extienden desde la porción central de la enzima mostrada en (b) cerca de la región del dominio C-terminal de la subunidad grande. [Parte (a) basada en las estructuras cristalinas de G. Zhang y cols., 1999, *Cell* **98**:811. Parte (b) adaptado de P. Cramer y cols., 2001, *Science* **292**:1863. Parte (c) de K. J. Armache y cols., 2003, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* **100**:6964, y D. A. Bushnell y R. D. Kornberg, 2003, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* **100**:6969.]

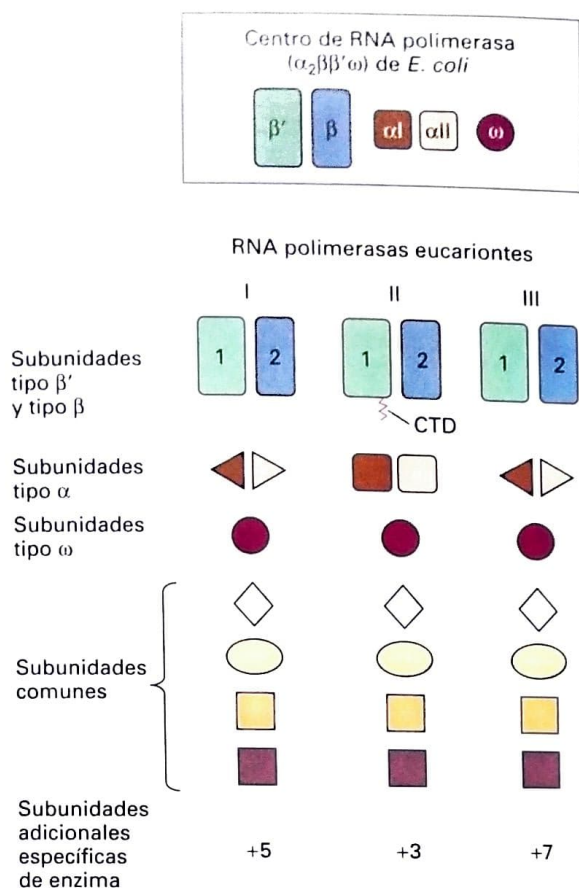


FIGURA 7-11 Representación esquemática de la estructura de las subunidades centrales de la RNA polimerasa de *E. coli* y de las RNA polimerasas nucleares de levadura. Las tres polimerasas de levadura tienen 5 subunidades centrales homólogas a las subunidades β , β' , las dos α y ω de la RNA polimerasa de *E. coli*. La subunidad más grande (RPB1) de la RNA polimerasa II además contiene un dominio C-terminal (CTD) esencial. Las RNA polimerasas I y III contienen las mismas dos subunidades de tipo α no idénticas, mientras que la RNA polimerasa II contiene dos subunidades de tipo α diferentes. Las tres polimerasas comparten la misma subunidad de tipo ω y otras 4 subunidades comunes. Además, cada polimerasa de levadura contiene de 3 a 7 subunidades únicas más pequeñas.

ribonucleótidos hasta que termina la transcripción. Después de la terminación y de que se libera el RNA del canal de salida, la abrazadera puede abrirse, liberando la enzima del DNA molde. Esto puede explicar cómo la RNA polimerasa II humana puede transcribir el gen humano más largo que codifica la distrofina (*DMD*), que tiene ≈ 2 millones de pares de bases de longitud, sin disociarse y terminar la transcripción. Debido a que la elongación de la transcripción procede a 1-2 kb por minuto, ¡la transcripción del gen *DMD* requiere aproximadamente un día!

Los experimentos de noqueo de genes en levadura indican que la mayoría de las subunidades de las tres RNA polimerasas nucleares son esenciales para la viabilidad de la célula. La interrupción de algunos genes de subunidades de polimerasa que no son absolutamente esenciales para la viabilidad (p. ej., subunidades 4 y 7 de la RNA polimerasa II) no obstante producen células de escaso crecimiento. Por lo tanto, todas las subunidades son necesarias para que las RNA polimerasas eucariontes funcionen normalmente. Archaea, al igual que las eubacterias, tiene un tipo simple de RNA polimerasa involucrada en la transcripción génica. Pero las RNA polimerasas de archaea, como las RNA polimerasas nucleares eucariontes, tienen del orden de una docena de subunidades. Archaea también tiene factores de transcripción relacionados, que se describen más adelante, compatibles con sus relaciones evolutivas más cercanas a los eucariontes que a las eubacterias (Fig. 1-1a).

específicas de la enzima que no están presentes en las otras dos RNA polimerasas nucleares (Fig. 7-11). Tres de estas subunidades adicionales de Pol I y Pol III son homólogas a las tres subunidades adicionales específicas de Pol II. Las otras dos subunidades específicas de Pol I son homólogas al factor de transcripción general TFIIF de la Pol II, analizado más adelante, y las cuatro subunidades adicionales de Pol III son homólogas a los factores de transcripción generales TFIIF y TFIIE de la Pol II.

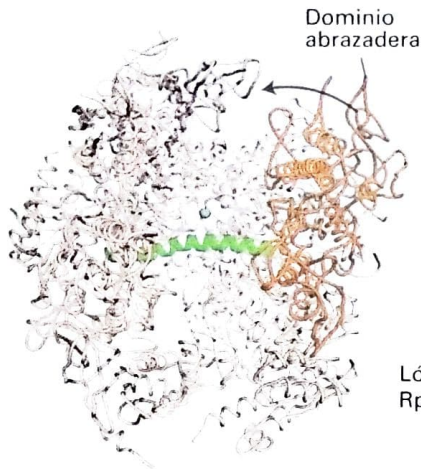
El dominio abrazadera de RPB1 es designado así debido a que ha sido observado en dos posiciones diferentes en cristales de la enzima libre (Fig. 7-12a) y un complejo que imita la forma de elongación de la enzima (Fig. 7-12b, c). Este dominio rota sobre una bisagra que probablemente se abre cuando el DNA corriente abajo (hebra molde color azul oscuro, hebra no molde color turquesa) se inserta dentro de esta región de la polimerasa y luego se balancea en forma cerrada cuando la enzima está en su modo de elongación. El RNA que forma apareamiento de bases con la hebra molde es rojo en la Figura 7-12b y c. Se postula que cuando la región híbrida RNA-DNA de 8-9 pares de bases cerca del sitio activo (Fig. 7-12c) es unida entre RBP1 y RBP2 y el RNA naciente llena el canal de salida, la abrazadera se traba en su posición cerrada, anclando la polimerasa al DNA doble hebra corriente abajo. También, un factor de elongación de la transcripción llamado DSIF, que se describe más adelante, se asocia con la polimerasa en la elongación, manteniendo la abrazadera en su conformación cerrada. Como resultado, la polimerasa es extremadamente procesadora, lo que significa que continúa polimerizando

La subunidad más grande en la RNA polimerasa II tiene una repetición carboxilo terminal esencial

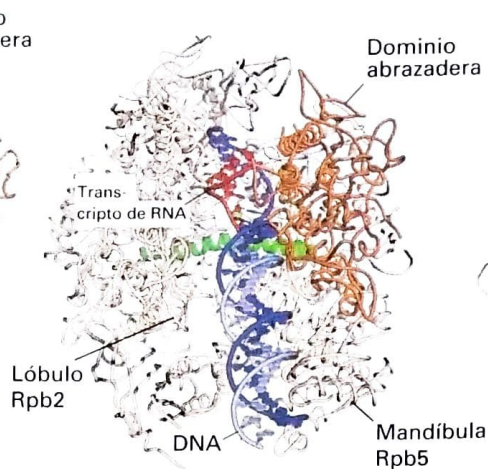
El extremo carboxilo de la subunidad más grande de la RNA polimerasa II (RPB1) contiene un segmento de siete aminoácidos que se repite en forma casi precisa múltiples veces. Ni la RNA polimerasa I ni la III contienen estas unidades repetitivas. Esta repetición de heptapéptido, con una secuencia consenso de Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser, se conoce como el *dominio carboxilo terminal (CTD, carboxyl-terminal domain)* (Fig. 7-10b, que se extiende desde la flecha roja). La RNA polimerasa II de la levadura contiene 26 o más repeticiones, las enzimas de los vertebrados tienen 52 repeticiones y un número intermedio de repeticiones se producen en la RNA polimerasa II de casi todos los otros eucariontes. El CTD es crucial para la viabilidad y al menos 10 copias de la repetición deben estar presentes para que la levadura sobreviva.

Los experimentos in vitro con promotores modelo primero demostraron que las moléculas de RNA polimerasa II que inician la

(a) RNA polimerasa II libre



(b) RNA polimerasa II transcribiendo



(c) Vista lateral

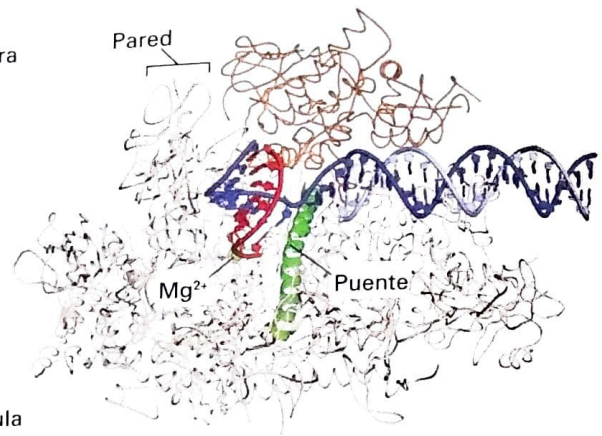


FIGURA 7-12 El dominio abrazadera de RPB1. Las estructuras de la RNA polimerasa II (a) libre y (b) transcribiendo difieren principalmente en la posición de un dominio abrazadera en RPB1 (anaranjado), que se balancea sobre la hendidura entre las fauces de la polimerasa durante la formación del complejo de transcripción, y atrapa la hebra molde de DNA y el transcrito. La unión del dominio abrazadera al híbrido de DNA de 8-9 pares de bases puede ayudar al cierre del par de abrazaderas en el que participa RNA, y estabiliza el complejo de elongación. En este modelo de un complejo de elongación, el RNA se muestra en rojo, la hebra de DNA molde en azul oscuro y la hebra de DNA no molde corriente abajo en turquesa. (c) La abrazadera se cierra sobre el DNA entrante corriente abajo. Este modelo se muestra con porciones de RPB2 que forman un lado de la hendidura eliminada, de manera tal que los ácidos nucleicos se puedan visualizar mejor. El ion Mg^{2+} que participa en la catálisis de

la formación del enlace fosfodiéster se muestra en verde. Pared es el dominio de RPB2 que fuerza al DNA molde a entrar a las fauces de la polimerasa para curvarlo antes de que abandone la polimerasa. El puente de hélice α que se muestra en verde se extiende a través de la hendidura en la polimerasa (véase Fig. 7-10b) y se postula que se dobla y se estira a medida que la polimerasa se traslada una base hacia abajo de la hebra molde. Se piensa que la hebra no molde forma una región simple hebra flexible por encima de la hendidura (no se muestra) que se extiende a partir de tres bases corriente abajo del apareamiento de bases molde hasta la base 3' del RNA en crecimiento y extiende la hebra molde a medida que sale de la polimerasa, donde se hibrida con la hebra molde para generar la burbuja de transcripción. [Adaptado de A. L. Gnatt y cols., 2001, *Science* **292**:1876]

transcripción tienen un CTD no fosforilado. Una vez que la polimerasa inicia la transcripción y comienza a moverse alejándose del promotor, se fosforilan muchos de los residuos serina y algunos tirosina en el CTD. El análisis de los cromosomas politénicos a partir de las glándulas salivales de *Drosophila* preparadas justo antes de la muda de la larva, un tiempo de transcripción activa, indica que el CTD también se fosforila

durante la transcripción in vivo. Las grandes “amplificaciones” cromosómicas inducidas en este momento del desarrollo son regiones donde el genoma se está transcribiendo en forma activa. La tinción con anticuerpos específicos para el CTD fosforilado o desfosforilado demostró que la RNA polimerasa II asociada con las regiones amplificadas con alta tasa de transcripción contienen un CTD fosforilado (Fig. 7-13).

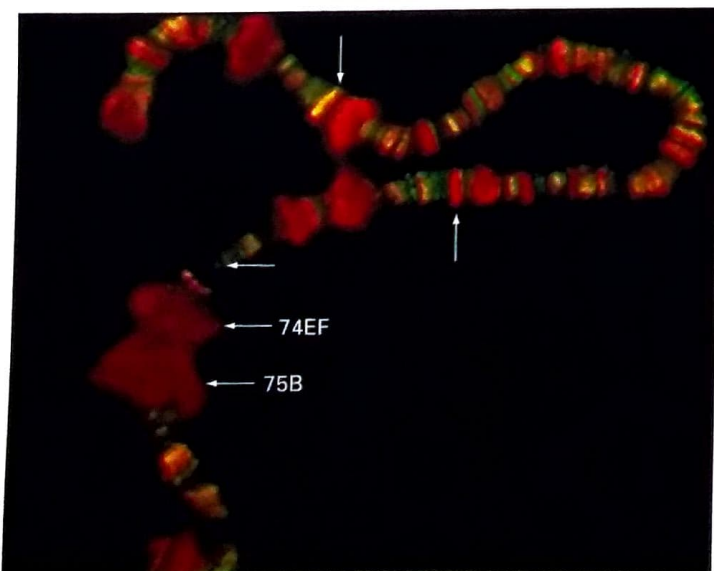


FIGURA EXPERIMENTAL 7-13 La tinción con anticuerpos demuestra que el dominio carboxilo terminal (CTD) de la RNA polimerasa II es fosforilado durante la transcripción in vivo. Los cromosomas politénicos de glándulas salivales se prepararon a partir de larvas de *Drosophila* justo antes de la muda. La preparación se trató con un anticuerpo de conejo específico para el CTD fosforilado y con anticuerpo de cabra específico para CTD no fosforilado. La preparación luego se tiñó con un anticuerpo anticabra marcado con fluoresceína (verde) y con un anticuerpo anticonejo marcado con rodamina (rojo). Así, las moléculas de polimerasa con un CTD no fosforilado se tiñen de verde y aquellas con un CTD fosforilado se tiñen de rojo. La hormona de muda ecdisona induce tasas de transcripción muy altas en las regiones engrosadas o abultadas marcadas como 74EF y 75B; nótese que solo está presente en estas regiones CTD fosforilado. También son visibles regiones abultadas más pequeñas transcritas a altas tasas. También se indican los sitios no abultados que se tiñen de rojo (flecha hacia arriba) o verde (flecha horizontal), como lo es un sitio que se tiñen tanto de rojo como de verde, produciendo un color amarillo (flecha hacia abajo). [De J. R. Weeks y cols., 1993, *Genes Dev.* **7**:2329; cortesía de J. R. Weeks y A. L. Greenleaf]

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 7.2

Panorama general del control génico eucarionte

- El principal propósito del control génico en los organismos multicelulares es la ejecución de decisiones precisas del desarrollo de manera tal que los genes adecuados se expresen en las células correctas durante el desarrollo embriológico y la diferenciación celular.
- El control de la transcripción es el principal medio de regulación de la expresión génica, tanto en los eucariontes como en las bacterias.
- En los genomas eucariontes, los elementos de control de la transcripción del DNA se pueden localizar a muchas kilobases de distancia del promotor que ellos regulan. Diferentes regiones de control pueden controlar la transcripción del mismo gen en diferentes tipos de células.
- Los eucariontes contienen tres tipos de RNA polimerasas nucleares. Las tres contienen dos subunidades centrales grandes y tres más pequeñas con homología a las subunidades β' , β , α y ω de la RNA polimerasa de *E. coli*, así como de diversas subunidades adicionales pequeñas (véase la Fig. 7-11).
- La RNA polimerasa I sintetiza solo pre-rRNA. La RNA polimerasa II sintetiza los mRNA, algunos de los RNA pequeños nucleares que participan en el proceso de corte y empalme del mRNA, los micro-RNA (miRNA) que regulan la traducción de los mRNA complementarios, y los RNA de interferencia pequeños (siRNA) que regulan la estabilidad de los mRNA complementarios. La RNA polimerasa III sintetiza los tRNA, los rRNA 5S y varios otros RNA estables, relativamente cortos (véase el Cuadro 7-2).
- El dominio carboxilo terminal (CTD) en la subunidad más grande de la RNA polimerasa II se fosforila durante la iniciación de la transcripción y permanece fosforilada a medida que la enzima transcribe el molde.

7.3 Promotores y factores de transcripción generales de la RNA polimerasa II

Los mecanismos que regulan la iniciación y la elongación de la transcripción por parte de la RNA polimerasa II se han estudiado extensamente, debido a que ésta es la polimerasa que transcribe los mRNA. La iniciación y la elongación de la transcripción mediante la RNA polimerasa II son los procesos bioquímicos iniciales necesarios para la expresión de los genes que codifican proteínas y son los pasos de la expresión génica que se regulan con más frecuencia para determinar cuándo y en cuáles células se sintetizan proteínas específicas. Como se mencionó en la sección anterior, la expresión de genes que codifican proteínas eucariontes está regulada por múltiples secuencias de DNA que unen proteínas, las cuales genéricamente se conocen como regiones de control de la transcripción. Éstas incluyen promotores, que determinan dónde comienza la transcripción del molde de DNA, y otros tipos de elementos de control localizados cerca de los sitios de inicio de la transcripción así como secuencias localizadas lejos de los genes que regulan, que controlan el tipo de célula en la cual el gen se transcribe y con qué frecuencia se transcribe. En esta sección, daremos un vistazo a las propiedades de varios elementos de control

que se encuentran en los genes que codifican proteína y en algunas técnicas usadas para identificarlos.

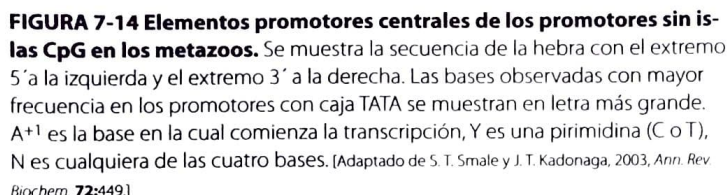
La RNA polimerasa II inicia la transcripción en las secuencias de DNA correspondientes a la caperuza 5' de los mRNA

En los experimentos de transcripción in vitro usando RNA polimerasa II purificada se preparó un extracto de proteínas de los núcleos de células cultivadas, y los moldes de DNA que contienen secuencias que codifican los extremos 5' de los mRNA de una cierta cantidad de genes expresados abundantemente revelaron que los transcriptos producidos siempre contenían una estructura de caperuza en sus extremos 5', idéntica con la presente en el extremo 5' de los mRNA ya procesados expresados a partir del gen (véase la Fig. 4-14). En estos experimentos, la caperuza 5' se añadió al extremo 5' del RNA naciente mediante enzimas en el extracto nuclear, que solo podían añadir una caperuza a un RNA que tiene un 5' trifosfato o difosfato. Debido a que el extremo 5' generado por la escisión de un RNA más largo podría tener un 5' monofosfato, a éste no se le podría añadir una caperuza. En consecuencia, los investigadores concluyeron que los nucleótidos con caperuza generados en las reacciones de transcripción in vitro deben haber sido los nucleótidos con los cuales se inició la transcripción. El análisis de secuencias reveló que, para un gen dado, la secuencia en el extremo 5' de los transcriptos de RNA producidos in vitro es la misma que en el extremo 5' de los mRNA aislados a partir de las células, lo que confirma que los nucleótidos con caperuza de los mRNA eucariontes coinciden con el sitio de inicio de la transcripción. En la actualidad, el sitio de inicio de la transcripción para un mRNA recientemente caracterizado en general se determina simplemente mediante la identificación de la secuencia de DNA que codifica los nucleótidos con caperuza 5' del mRNA codificado.

La caja TATA, los iniciadores y las islas CpG funcionan como promotores en el DNA eucarionte

Diversas secuencias de DNA diferentes pueden funcionar como promotores para la RNA polimerasa II y dirigen la polimerasa hacia donde debe iniciar la transcripción de un RNA complementario a la hebra molde de un DNA doble hebra. Éstas incluyen **cajas TATA, iniciadores e islas CpG**.

Cajas TATA Los primeros genes en ser secuenciados y estudiados por medio de sistemas de transcripción in vitro fueron los genes virales y los genes celulares que codifican proteína que son muy activos desde el punto de vista transcripcional, ya sea en momentos particulares del ciclo celular o en tipos celulares diferenciados específicos. En todos estos genes con alta tasa de transcripción, una secuencia conservada llamada **caja TATA** se encontró a ≈ 26 -31 pares de bases corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción (Fig. 7-14). Los estudios de mutagénesis demostraron que el cambio de una sola base en esta secuencia nucleotídica disminuye drásticamente la transcripción in vitro por parte de la RNA polimerasa II de los genes adyacentes a una caja TATA. Si se elimina el apareamiento de bases entre la caja TATA y el sitio de inicio de la transcripción normal, la transcripción del molde alterado, acortado comienza en un sitio nuevo ≈ 25 pares de bases corriente abajo de la caja TATA. En consecuencia, la caja TATA actúa de modo similar a un promotor de *E. coli* en lo que se refiere a



Secuencias iniciadoras En lugar de una caja TATA, algunos genes eucariontes contienen un elemento promotor alternativo denominado un *iniciador*. La mayoría de los elementos iniciadores naturales tienen una citosina (C) en la posición -1 y un residuo adenina (A) en el sitio de inicio de la transcripción (+1). La mutagénesis dirigida de los genes de mamífero con un promotor que contiene un iniciador reveló que la secuencia nucleotídica inmediatamente alrededor del sitio de inicio determina la fuerza de tales promotores. A diferencia de las secuencias de caja TATA conservada, sin embargo, solo se ha definido una secuencia iniciadora extremadamente degenerada:

donde A⁺¹ es la base en la cual se inicia la transcripción, Y es una pirimidina (C o T), N es cualquiera de las cuatro bases y T/A es T o A en la posición +3. Como se verá después de describir los factores de transcripción generales necesarios para la iniciación por parte de la RNA polimerasa II, otras secuencias de DNA específicas designadas BRE y DPE pueden ser unidas por estas proteínas e influenciar en la fuerza del promotor (Fig. 7-14).

En los mamíferos, la mayoría de las C seguidas por una G que no están asociadas con promotores de las CpG están metiladas en la posición 5 del anillo de pirimidina (5-metil C, representado como C^{Me}, véase la Fig. 2-17). Las secuencias CG se cree que están subrepresentadas en los genomas de mamíferos debido a que la desaminación espontánea de la 5-metil C genera timidina. En la escala de tiempo evolutivo de los mamíferos, se cree que esto ha llevado a la conversión de la mayoría de las CG en TG mediante mecanismos de reparación del DNA. En consecuencia, la frecuencia de CG en el genoma humano es solo del 21% de la frecuencia esperada si las C estuviesen seguidas de forma aleatoria por una G. Sin embargo, las C en los promotores con islas CpG están desmetiladas. Por lo tanto, cuando se desaminan espontáneamente, se convierten en U, una base que es reconocida por las enzimas de reparación del DNA que la vuelven a convertir en una C. Como resultado, la frecuencia de secuencias CG en promotores con islas CpG está cercana a la esperada si C estuviese seguida por cualquiera de los otros tres nucleótidos aleatoriamente.

Las secuencias ricas en CG están unidas por octámeros de histona más débilmente que las secuencias deficientes en CG debido a que se necesita más energía para curvarlas en bucles de diámetro pequeño necesarios para envolverse alrededor del octámero de histonas para formar un nucleosoma (Fig. 6-29). En consecuencia, las islas CpG coinciden con las regiones del DNA libres de nucleosomas. Queda mucho por aprender acerca de los mecanismos moleculares que controlan la transcripción a partir de promotores islas CpG, pero una hipótesis actual es que los factores de transcripción generales que se analizan en la siguiente sección se pueden unir a ellas porque las islas CpG están excluidas de los nucleosomas.

La transcripción divergente a partir de los promotores con islas CpG Otra característica notable de las islas CpG es que la transcripción se inicia en ambas direcciones, incluso a pesar de que solo la transcripción de la hebra codificante produce un mRNA. Mediante un mecanismo que todavía espera ser elucidado, la mayoría de las moléculas de RNA polimerasa II transcriben en la dirección “incorrecta”, es decir, transcriben la hebra no codificante, se detiene o termina ≈ 1 kb a partir del sitio de inicio de la transcripción. Esto se descubrió al tener en cuenta la estabilidad del complejo de elongación, presumiblemente conferido por el dominio abrazadera de la RNA polimerasa II cuando el híbrido RNA-DNA se une cerca del sitio activo (Fig. 7-12b, c).

Se aislaron núcleos de células humanas cultivadas y se incubaron en una solución amortiguadora conteniendo una concentración salina y de detergente suave que elimina las RNA polimerasas, excepto aquellas en el proceso de elongación debido a su asociación estable con el DNA molde. Luego, se añadieron los nucleótidos trifosfatos con UTP sustituidos por bromo-UTP que contenían uracilo con un átomo de Br en la posición 5 en el anillo de pirimidina (Fig. 2-17). Los núcleos luego fueron incubados a 37 °C lo suficiente como para que ≈ 100 nucleótidos sean polimerizados por las moléculas de RNA polimerasa II (Pol II) que estuvieron en el proceso de elongación de la transcripción en el momento en que se aislaron los núcleos. Después se aisló el RNA y el RNA conteniendo bromo-U se inmunoprecipitó con anticuerpos específicos para RNA marcado con bromo-U. Luego se secuenciaron 33 nucleótidos en los extremos 5' de los RNA mediante secuenciación masiva en paralelo de DNA de los transcritos inversos y las secuencias se mapearon en el genoma humano.

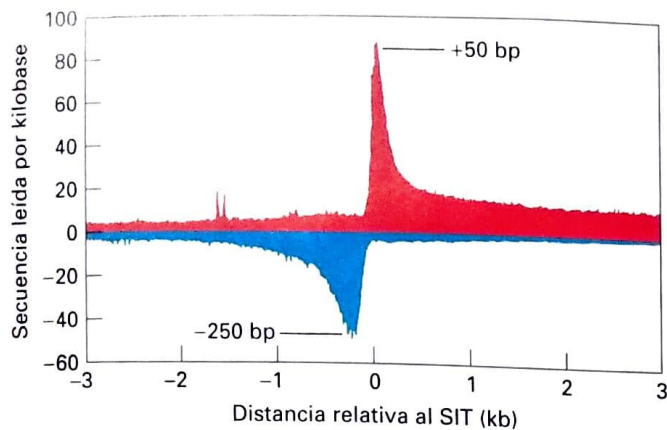


FIGURA EXPERIMENTAL 7-15 Análisis de las moléculas de RNA polimerasa II en elongación en fibroblastos humanos. Se aislaron núcleos de fibroblastos cultivados y se cultivaron en una sustancia amortiguadora con un detergente no iónico que evita que la RNA polimerasa II inicie la transcripción. Los núcleos tratados se incubaron con ATP, CTP, GTP y Br-UTP durante 5 minutos a 30 °C, un tiempo suficiente como para incorporar ≈ 100 nucleótidos. Luego se aisló el RNA y se lo fragmentó en ≈ 100 nucleótidos por incubación controlada a pH alto. Oligonucleótidos de RNA específicos se ligaron a los extremos 5' y 3' de los fragmentos de RNA, que luego fueron sometidos a transcripción inversa. El DNA resultante se amplificó mediante reacción en cadena de la polimerasa y se lo sometió a secuenciación masiva en paralelo de DNA. Las secuencias determinadas se alinearon con los sitios de inicio de la transcripción (SIT) de todos los genes humanos conocidos y se representó el número de secuencias leídas por kilobase de DNA secuenciado total para intervalos de 10 pares de bases de transcritos positivos o con sentido (rojo) y para transcritos antisentido (azul). Para más detalles, véase el texto. [De L. J. Core, J. J. Waterfall y J. T. Lis, 2008, *Science* **322**:1845.]

La Figura 7-15 muestra un gráfico del número de secuencias leídas por kilobase de RNA total marcado con Br-U en relación con los principales sitios de inicio de la transcripción (SIT) de todos los genes humanos que codifican proteínas que se conocen en la actualidad. Los resultados demuestran que aproximadamente la misma cantidad de moléculas de RNA polimerasa transcriben la mayoría de los promotores (principalmente promotores con islas CpG) en ambos sentidos de dirección (rojo, representado por arriba para indicar la transcripción en el sentido habitual) y la dirección antisentido (azul, representada hacia abajo para representar la transcripción en la dirección opuesta, antisentido). Se observó un pico del transcripto positivo (sentido) a $\approx +50$ en relación con el principal sitio de inicio de la transcripción (SIT), lo cual indica que la Pol II realiza una pausa en la región entre +50 y +250 antes de continuar con la elongación. También se observó un pico entre -250 y -500 en relación con el principal sitio de inicio de la transcripción de Pol II en la dirección antisentido, lo cual revela que la molécula de RNA polimerasa II realiza una pausa en el otro extremo de las regiones libres de nucleosomas en los promotores con islas CpG. Ténganse en cuenta que la cantidad de secuencias que se lee, y por lo tanto el número de polimerasas que elongan, es menor para las polimerasas que transcriben en la dirección antisentido más allá de 1 kb del sitio de inicio de la transcripción, en comparación con las polimerasas que transcriben más allá de 1 kb del sitio de inicio en la dirección codificante o positiva. El o los mecanismos moleculares que explican esta diferencia es un área de investigación activa en la actualidad. Nótese que también se observó un número bajo de secuencias leídas al transcribir en la dirección “incorrecta” corriente arriba de los

principales sitios de inicio de la transcripción (las secuencias rojas se leen hacia la izquierda de 0 y las secuencias azules se leen hacia la derecha de 0), lo cual indica que existe un nivel bajo de transcripción a partir de sitios aparentemente al azar a lo largo de todo el genoma. Estos descubrimientos recientes de la transcripción divergente a partir de promotores con islas CpG y el nivel bajo de transcripción de la mayoría de los genomas eucariontes han sido una gran sorpresa para la mayoría de los investigadores.

Inmunoprecipitación de la cromatina La técnica de inmunoprecipitación de la cromatina esquematizada en la Figura 7-16a proporciona información adicional que apoya la evidencia de transcripción divergente a partir de promotores con islas CpG en los mamíferos. Los datos de estos análisis se indican como el número de veces que una secuencia específica de esta región del genoma fue identificada por millón de secuencias totales analizadas (Fig. 7-16b). A los genes que se transcribieron de forma divergente, como el gen *Hsd17b12* que codifica una enzima involucrada en el metabolismo intermediario, se les detectaron dos picos de DNA inmunoprecipitado, correspondientes a la Pol II transcribiendo en las direcciones de sentido y antisentido. Sin embargo, Pol II sólo se detectó > 1 kb a partir del sitio de inicio en la dirección de sentido. El número de secuencias contadas por millón en esta región del genoma fue muy bajo porque el gen se transcribió en una frecuencia baja. Sin embargo, el número de secuencias contadas por millón en las regiones de comienzo para ambos sentidos de transcripción fue mucho más alto, lo que refleja el hecho de que las moléculas Pol II habían iniciado la transcripción en ambas direcciones respecto de este promotor, pero se interrumpieron antes de transcribir > 500 pares de bases desde el sitio de iniciación en cada dirección. En contraste, el gen *Rpl6* que transcribe una proteína de subunidad ribosómica grande que fue abundantemente transcrita en estas células fue transcrito casi en exclusividad en la dirección de sentido. El número de secuencias contadas por millón > 1 kb corriente abajo a partir del sitio de inicio de la transcripción fue mucho más elevado, lo cual refleja la alta tasa de transcripción de este gen.

Los RNA asociados con el sitio de inicio de la transcripción (RNA aSIT, cabezas de flechas roja y azul en la parte inferior de la Fig. 7-16b) representan secuencias de RNA cortos aislados a partir de estas células, que se cree que son el resultado de la degradación de los RNA nacientes liberados a partir de las moléculas Pol II que realizaron una pausa que terminan. Nótese que ellos incluyen los transcritos sentido (flecha azul) y antisentido (flecha roja) de los genes que se transcribieron de forma divergente, mientras que solo se encontró RNA aSIT sentido para los genes que se transcribieron de manera unidireccional. La observación de estos RNA aSIT a partir de promotores con islas CpG avala aún más la conclusión de que ellos se transcriben en ambas direcciones.

Los factores de transcripción generales posicionan la RNA polimerasa II en los sitios de inicio y asisten en la iniciación

La iniciación por parte de la RNA polimerasa II requiere diversos factores de iniciación. Estos factores de iniciación posicionan la molécula de Pol II en los sitios de inicio de la transcripción y ayudan a separar las hebras de DNA de manera tal que la hebra molde puede entrar en el sitio activo de la enzima. Estos se denominan *factores de transcripción generales* debido a que son necesarios en la mayoría, si no en todos, los

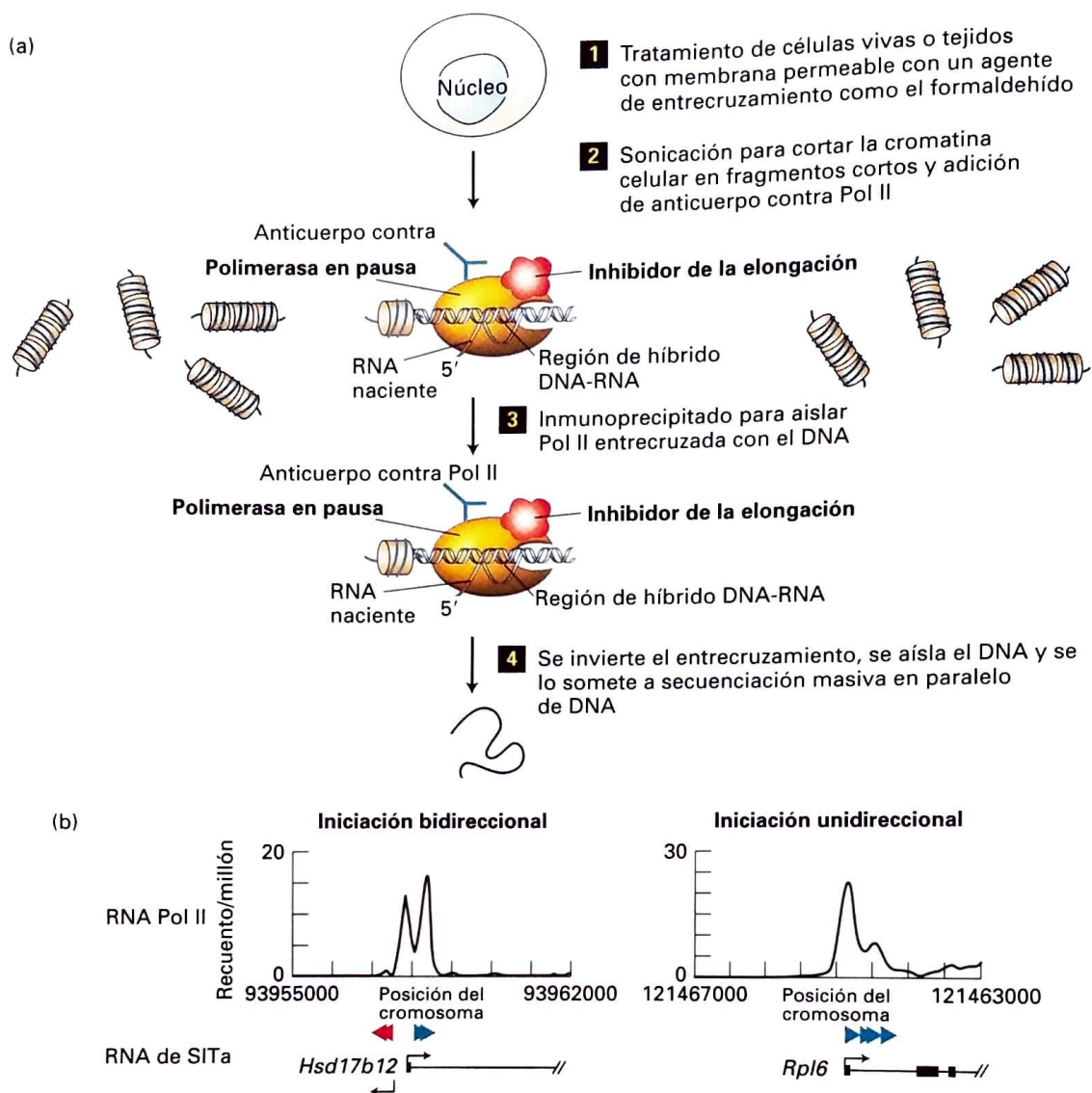


FIGURA EXPERIMENTAL 7-16 Técnica de inmunoprecipitación de la cromatina.

(a) Paso 1: células o tejidos cultivados vivos se incuban en formaldehído al 1% para entrecruzar covalentemente la proteína al DNA y las proteínas entre sí. Paso 2: luego, la preparación es sometida a sonicación para solubilizar y cortar la cromatina en fragmentos de 200 a 500 pares de bases de DNA. Paso 3: se añade un anticuerpo contra una proteína de interés, aquí la RNA polimerasa II, y el DNA unido covalentemente a la proteína de interés se inmunoprecipita. Paso 4: luego se revierte el entrecruzamiento covalente y se aísla el DNA. El DNA aislado se puede analizar por reacción en cadena de la polimerasa con cebadores para una secuencia de interés. Alternativamente, el DNA recuperado total puede ser amplificado, marcado mediante la incorporación de un nucleótido marcado en forma fluorescente e hibridado a una micromatriz (Fig. 5-29) o se lo puede someter a una secuenciación masiva en

paralelo de DNA. (b) Se muestran los resultados de la secuenciación de DNA de la cromatina a partir de células madre embrionarias murinas inmunoprecipitadas con anticuerpo contra la RNA polimerasa II, para un gen que se transcribe en forma divergente (izquierda) y un gen que se transcribe solo en la dirección positiva (derecha). Los datos se representan como el número de veces que se observó una secuencia de DNA en un intervalo de 50 pares de bases por millón de pares de bases secuenciados. La región que codifica el extremo 5' del gen se muestra en la parte inferior, con exones que se presentan como rectángulos e intrones como líneas. Los RNA SITa (puntas de flechas rojas y azules) representan los RNA de ≈20-50 nucleótidos que fueron aislados de las mismas células. Azul indica a los RNA que se transcriben en la dirección positiva o de sentido, y rojo indica a los RNA que se transcriben en la dirección antisentido.

[Parte (a), véase A. Hecht y M. Grunstein, 1999, *Methods Enzymol.* 304:399. Parte (b) adaptado de P. B. Rahl y cols., 2010, *Cell* 141:432.]

promotores transcritos por la RNA polimerasa II. Estas proteínas se designan *TFIIA*, *TFIIB*, etc., y la mayoría son proteínas multiméricas. La más grande es *TFIID*, que consiste en una única proteína de unión a caja TATA (TBP, TATA box binding protein) de 38 kDa y 13 factores asociados con TBP (TAF, TBP-associated factors). Los factores de transcripción generales con actividades similares y secuencias homólogas se

encuentran en todos los eucariontes. El complejo de Pol II y sus factores de transcripción generales unidos a un promotor y listos para iniciar la transcripción se denomina un *complejo de preiniciación*. La Figura 7-17 resume los pasos del ensamblaje del complejo de preiniciación de la transcripción de Pol II in vitro sobre un promotor que contiene una caja TATA. En los estudios que revelaron el orden del factor

FIGURA 7-17 Ensamblaje in vitro del complejo de preiniciación de la RNA polimerasa II. Los factores de transcripción generales indicados y la RNA polimerasa II (Pol II) purificada se unen de manera secuencial al DNA caja TATA para formar un complejo de preiniciación. Luego, la hidrólisis de ATP proporciona energía para desenrollar el DNA en el sitio de inicio mediante una subunidad TFIIF. A medida que Pol II inicia la transcripción en el complejo abierto resultante, la polimerasa se mueve alejándose del promotor y su CTD se fosforila. In vitro, los factores de transcripción generales (excepto TBP) se disocian del complejo promotor-TBP, pero no se conoce aún qué factores permanecen asociados con las regiones promotoras a continuación de cada ronda de iniciación de la transcripción in vivo.

de transcripción general se usó la subunidad TBP de TFIID en lugar del complejo TFIID intacto y la RNA polimerasa II ensamblada debido a que puede ser expresada a una alta concentración en *E. coli* y purificada rápidamente, mientras que TFIID intacto es difícil de purificar a partir de células eucariontes.

La TBP es la primera proteína en unirse al promotor con caja TATA. Todas las TBP eucariontes analizadas tienen dominios C-terminales similares de 180 residuos. Este dominio de TBP se pliega en una estructura con forma de silla de montar; las dos mitades de la molécula presentan una simetría pareja global pero no son idénticas. La TBP interactúa con el surco menor en el DNA, doblando la hélice considerablemente (véase la Fig. 4-5). La superficie de unión al DNA de la TBP es conservada en todos los eucariontes, lo que explica la alta conservación del elemento promotor con caja TATA (véase la Fig. 7-14).

Una vez que la TBP se ha unido a la caja TATA, se une TFIIB. Este factor es una proteína monomérica, ligeramente más pequeña que TBP. El dominio C-terminal de TFIIB hace contacto tanto con la TBP como con el DNA sobre ambos lados de la caja TATA. Durante la iniciación de la transcripción, su dominio N-terminal se inserta en el canal de salida del RNA de la RNA polimerasa II (véase la Fig. 7-10). El dominio N-terminal de TFIIB asiste a Pol II en la separación de las hebras de DNA en el sitio de inicio de la transcripción e interactúa con la hebra molde cerca del sitio activo de Pol II. A continuación de la unión de TFIIB, se une un complejo preformado de TFIIF (un heterodímero de dos subunidades diferentes en mamíferos) y Pol II, posicionando la polimerasa sobre el sitio de inicio. Se deben unir dos factores de transcripción generales más antes que el dúplex de DNA se pueda separar para exponer la hebra molde. El primero en unirse es el TFIIE tetramérico que comprende dos copias de cada una de las subunidades diferentes. TFIIE crea un sitio de anclaje para TFIIH, otro factor multimérico que contiene 10 subunidades diferentes. La unión de TFIIH completa el ensamblaje del complejo de preiniciación de la transcripción in vitro (Fig. 7-17). La Figura 7-18 muestra un modelo actual para la estructura del complejo de preiniciación.

La actividad **helicasa** de una de las subunidades TFIIH usa energía de la hidrólisis de ATP para ayudar a desenrollar el dúplex de DNA en el sitio de inicio, permitiendo a la Pol II formar un complejo *abierto* en el cual el dúplex que rodea el sitio de inicio está separado y la hebra molde está unida al sitio activo de la polimerasa. La Figura 7-19 muestra modelos moleculares basados en cristalografía de rayos X del complejo de TBP (púrpura), TFIIB (rojo) y Pol II (dorado) asociado

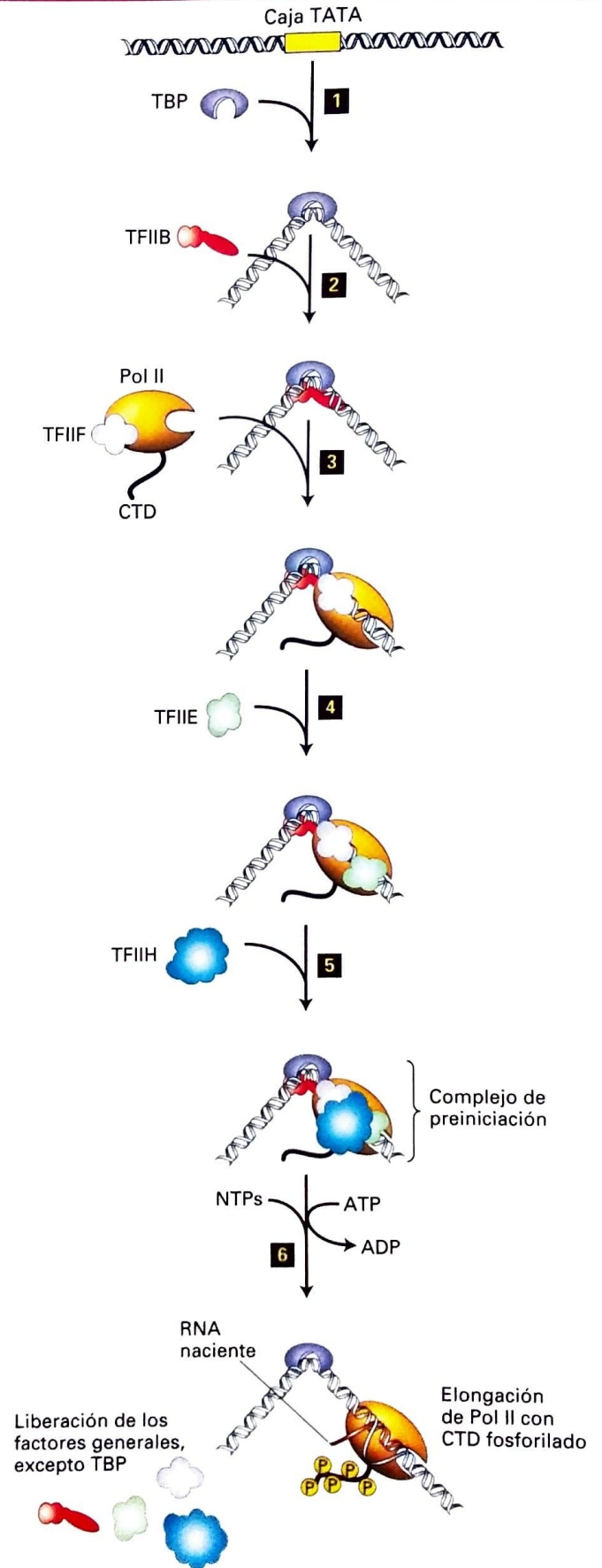
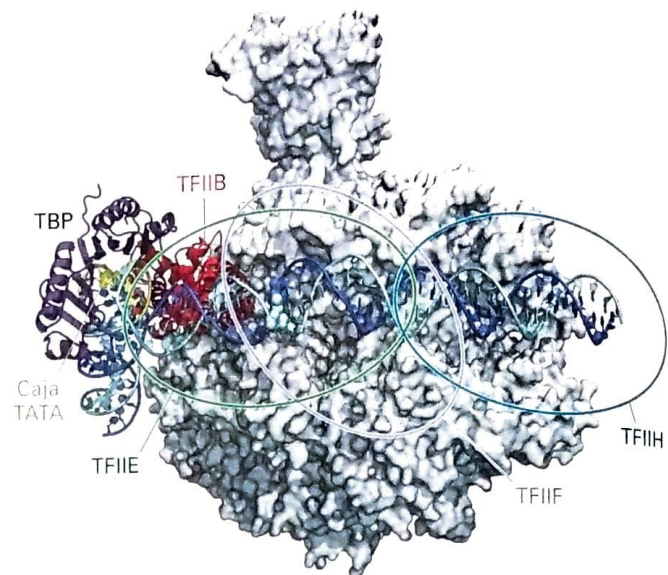


FIGURA 7-18 Modelo para la estructura de un complejo de preiniciación de la RNA polimerasa II. Se muestra un modelo espacial de la RNA polimerasa II de levadura con la dirección de transcripción hacia la derecha. La hebra molde de DNA se muestra en azul y la hebra no molde en turquesa. El sitio de inicio de la transcripción se muestra como un modelo espacial de par de bases turquesa y azul. TBP y TFIIB se muestran como huellas de gusano púrpura y roja del armazón polipeptídico. No se han determinado las estructuras de alta resolución de TFIIE, F y H. Sus posiciones aproximadas que se encuentran en el DNA en el complejo de preiniciación se muestran mediante elipses para TFIIE (verde), TFIIF (violeta) y TFIIH (celeste). [Adaptado de G. Miller y S. Hahn, 2006, *Nat. Struct. Biol.* **13**:603.]



con el DNA promotor antes de que las hebras cerca del sitio de inicio de la transcripción se separen (complejo cerrado, Fig. 7-19a) y después de que las hebras se separan y la hebra molde entra en el complejo Pol II-TFIIB, lo que coloca el sitio de inicio de la transcripción (+1) en el sitio activo (complejo abierto, Fig. 7-19b). Un ion Mg^{2+} unido en el sitio activo de la Pol II asiste en la catálisis de la síntesis del enlace fosfodiéster. Si todos los ribonucleósidos trifosfatos están presentes, Pol II comienza a transcribir la hebra molde.

A medida que la polimerasa transcribe alejándose de la región promotora, el dominio N-terminal del TFIIB se libera del canal de salida del RNA a medida que el extremo 5' del RNA naciente entra en él. Una subunidad de TFIIH fosforila el CTD de la Pol II múltiples veces en la serina 5

(subrayada) de la repetición Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser que comprende el CTD. Como se analizará en el Capítulo 8, el CTD que es fosforilado múltiples veces en la serina 5 es un sitio de atracción para las enzimas que forman la estructura de la caperuza (Fig. 4-14) en el extremo 5' de los

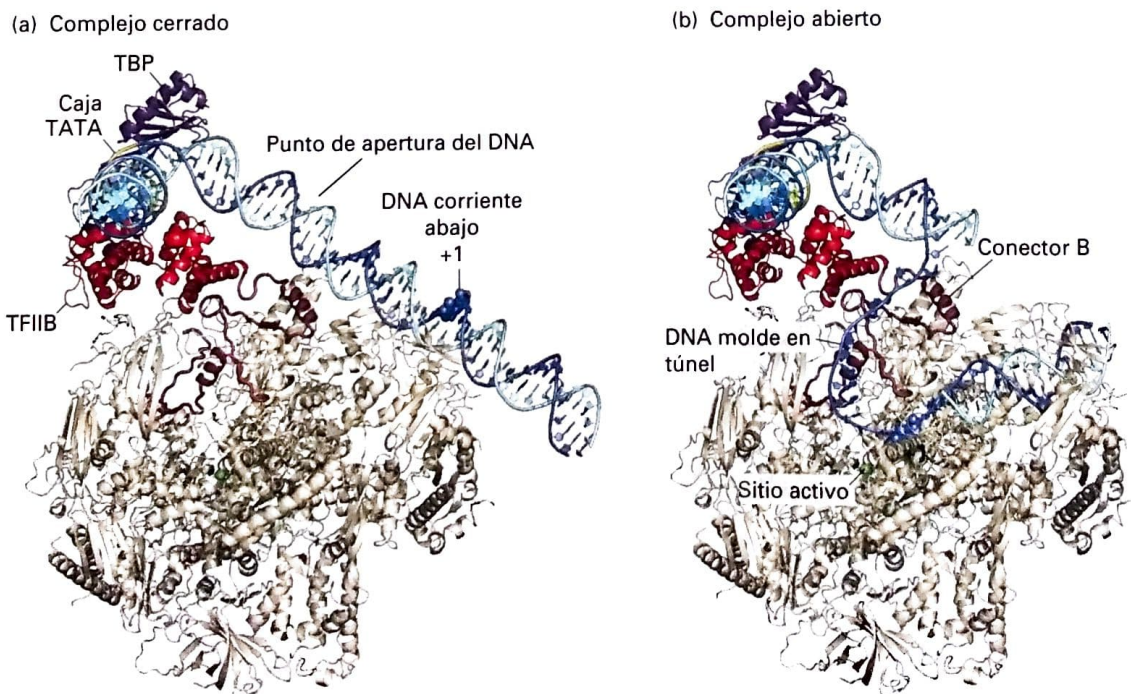


FIGURA 7-19 Modelos para los complejos cerrado y abierto del DNA promotor que forman complejo con TBP, TFIIB y Pol II sobre la base de la cristalografía de rayos X. Pol II se muestra en color tostado, TBP en púrpura, TFIIB en rojo, la hebra de DNA molde en azul y la hebra de DNA no molde en turquesa. La base que codifica el sitio de inicio de la transcripción (+1) se muestra como modelo espacial. La región conectora B

de TFIIB interactúa con DNA en el complejo cerrado (a), donde las hebras son separadas inicialmente (punto de apertura del DNA). El ion Mg^{2+} en el sitio activo se muestra como una esfera verde. La hebra no molde de la burbuja de transcripción en el complejo abierto (b) no se visualiza en las estructuras de cristal de los modelos del complejo abierto debido a sus conformaciones alternativas en diferentes complejos. [Adaptado de D. Kostrewa y cols., 2009, *Nature* **462**:323.]

RNA transcriptos por la RNA polimerasa II. En el ensayo de transcripción *in vitro* mínimo que contiene solo estos factores de transcripción generales y RNA polimerasa II purificada, la TBP permanece unida a la caja TATA a medida que la polimerasa transcribe alejándose de la región promotora, pero los otros factores de transcripción generales se disocian.



Notablemente, las primeras subunidades del TFIID en ser clonadas a partir de los seres humanos fueron identificadas debido a mutaciones en ellas que causan defectos en la reparación del DNA dañado. En los individuos normales, cuando una RNA polimerasa que está transcribiendo se atasca en una región de DNA molde dañado, un subcomplejo compuesto de varias subunidades de TFIID, incluida la subunidad helicasa mencionada anteriormente, reconoce la polimerasa atascada y luego se asocia con otras proteínas que funcionan con el TFIID en la reparación de la región de DNA dañada. En los pacientes con formas mutantes de estas subunidades TFIID, tales reparaciones del DNA dañado en los genes activos transcripcionalmente son defectuosas. En consecuencia, los individuos afectados tienen extrema sensibilidad cutánea a la luz solar (una causa común de daño al DNA es la luz ultravioleta) y muestran una incidencia elevada de cáncer. En consecuencia, estas subunidades de TFIID tienen dos funciones en la célula, una en el proceso de iniciación de la transcripción y una segunda función en la reparación del DNA. Según la gravedad del defecto en la función de TFIID, estos individuos pueden sufrir enfermedades como xerodermia pigmentosa y síndrome de Cockayne (Cap. 24). ■

La iniciación de la transcripción *in vivo* por la RNA polimerasa II requiere proteínas adicionales

Aunque los factores de transcripción generales analizados anteriormente permiten que la RNA polimerasa inicie la transcripción *in vitro*, otro factor de la transcripción, TFIID, es necesario para la iniciación de la Pol II *in vivo*. TFIID purificado forma un complejo con TBP y el DNA de la caja TATA. La cristalografía de rayos X de este complejo muestra que TFIID interactúa con el lado de la TBP que está corriente arriba de la dirección de transcripción sobre los promotores que contienen una caja TATA. En los metazoos (animales multicelulares), TFIID y TFIID, con sus múltiples subunidades TAF, se unen primero al DNA de la caja TATA y luego los otros factores de transcripción generales se unen subsiguientemente como se indica en la Figura 7-17.

Las subunidades TAF del TFIID actúan en la iniciación de la transcripción a partir de promotores que carecen de caja TATA. Por ejemplo, algunas subunidades TAF contactan el elemento iniciador en promotores donde ocurre, lo que probablemente explica cómo tales secuencias pueden reemplazar una caja TATA. Subunidades TAF adicionales de TFIID pueden unirse a una secuencia consenso A/G-G-A/T-C/T-G/A/C centrada a ≈ 30 pares de bases corriente abajo a partir del sitio de inicio de la transcripción de muchos genes que carecen de promotor con caja TATA. Debido a su posición, esta secuencia reguladora es llamada *elemento promotor corriente abajo* (DPE, *downstream promoter element*) (Fig. 7-14). El DPE facilita la transcripción de los genes sin caja TATA (TATA-less) que lo contienen mediante un incremento de la unión a TFIID. Además, una hélice α de TFIIB se une al surco mayor del DNA corriente arriba de la caja TATA (véase la Fig. 7-19), y los promotores más fuertes contienen la secuencia óptima para esta interacción, el BRE que se muestra en la Figura 7-14.

Los ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (Fig. 7-16) utilizan anticuerpos contra TBP que muestran que se unen en esta re-

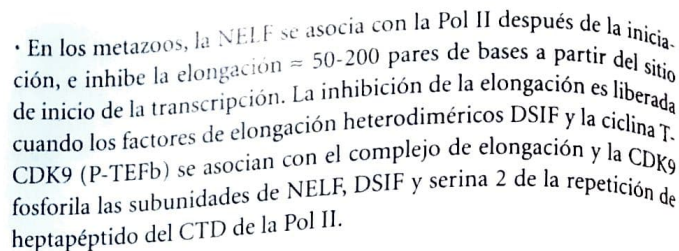
gión entre los sitios de inicio de la transcripción en sentido y en antisentido en los promotores con islas CpG. En consecuencia, probablemente se requieran los mismos factores de transcripción generales para la iniciación a partir de los promotores con islas CpG más débiles como los promotores que contienen una caja TATA. La ausencia de los elementos promotores resumidos en la Figura 7-14 puede explicar la transcripción divergente a partir de múltiples sitios de inicio de la transcripción observados en estos promotores, puesto que no hay pistas en la secuencia de DNA que orienten al complejo de preiniciación. El TFIID y los otros factores de transcripción generales pueden elegir entre sitios de unión débiles casi equivalentes y alternativos en esta clase de promotores, lo cual explica potencialmente la baja frecuencia de iniciación de la transcripción así como los sitios de iniciación de la transcripción alternativos en direcciones divergentes que, en general, se suelen observar a partir de promotores con islas CpG.

Los factores de elongación regulan las etapas iniciales de la transcripción en la región proximal al promotor

En los metazoos, en la mayoría de los promotores, la Pol II hace una pausa después de transcribir ≈ 20 -50 nucleótidos, debido a la unión de la proteína de cinco subunidades llamada NELF (factor negativo de elongación [*negative elongation factor*]). Esto es seguido por la unión de un factor de elongación de dos subunidades llamado DSIF (factor inducido por sensibilidad DRB [*DRB sensitivity-inducing factor*]), denominado así puesto que un análogo de ATP llamado DRB inhibe aún más la elongación de la transcripción en su presencia. La inhibición de la elongación de Pol II que resulta de la unión de NELF es mitigada cuando DSIF, NELF y la serina 2 de la repetición CTD de la Pol II (Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser) son fosforilados por una proteína-quinasa con dos subunidades, CDK9-ciclina T, también llamada P-TEFb, que se asocia con el complejo Pol II, NELF, DSIF. Los mismos factores de elongación regulan la transcripción a partir de promotores con islas CpG. Estos factores que regulan la elongación en la región proximal al promotor proporcionan un mecanismo para controlar la transcripción génica además de regular la iniciación de la transcripción. Esta estrategia global para la regulación de la transcripción, tanto en el paso de iniciación como en el de elongación en la región proximal al promotor, es similar a la regulación del operón *Trp* en *E. coli* (Fig. 7-6), aunque los mecanismos moleculares involucrados son diferentes.



La transcripción del HIV (virus de la inmunodeficiencia humana), la causa del sida, depende de la activación de CDK9-ciclina T por parte de una pequeña proteína vírica llamada **Tat**. Las células infectadas con mutantes *tat⁻* producen transcriptos virales cortos de ≈ 50 nucleótidos de longitud. Por el contrario, las células infectadas por HIV de tipo silvestre sintetizan transcriptos virales largos que se extienden a lo largo del genoma proviral integrado (véanse las Figs. 4-49 y 6-13). Por lo tanto, la proteína Tat funciona como un *factor antiterminación*, lo cual permite que la RNA polimerasa II lea a través de un bloque transcripcional. (Tat inicialmente se sintetiza mediante transcriptos raros que fallan en terminar cuando el promotor del HIV se transcribe a una alta tasa en los linfocitos T "activados", un tipo de glóbulo blanco; véase el Cap. 23). Tat es una proteína de unión a RNA específica de secuencia. Se une a la copia de RNA de una secuencia llamada TAR, que forma una estructura de tallo-bucle cerca del extremo 5' del transcrip-



el transcrito HIV contiene secuencias reconocidas por Tat y la proteína-cinasa CDK9 cerca de su sustrato, el CTD de la RNA polimerasa II. La fosforilación del CTD en la serina 2 de la repetición heptada del CTD de la Pol II es necesaria para la elongación de la transcripción. Las proteínas celulares DSIF (también llamada Sp4/5) y el complejo NELF también están involucrados en la regulación de la elongación de Pol II, como se analiza en el texto. [Véase P. Wei y cols., 1998, *Cell* **92**:451; T. Wada y cols., 1998, *Genes Dev.* **12**:357, e Y. Yamaguchi y cols., 1999, *Cell* **97**:41.]

7.4 Secuencias reguladoras en los genes que codifican proteínas y las proteínas mediante las cuales funcionan

Como se describió en la sección anterior, la expresión de los genes eucariontes que codifican proteínas está regulada por las secuencias de DNA de unión a las proteínas, denominadas genéricamente como regiones de control de la transcripción. Éstas incluyen promotores y otros tipos de elementos de control localizados cerca de los sitios de transcripción, así como secuencias localizadas lejos de los genes que regulan. En esta sección examinaremos en forma más minuciosa las propiedades de varios elementos de control que se encuentran en los genes eucariontes que codifican proteína y las proteínas que se unen a ellos.

Los elementos proximales del promotor ayudan a regular los genes eucariontes

Con el fin de identificar las regiones de control de la transcripción se utilizaron las técnicas de DNA recombinante para mutar en forma sistemática las secuencias de nucleótidos de varios genes eucariontes. Por ejemplo, las *mutaciones rastreadoras de ligadores* (*linker scanning mutations*) pueden identificar las secuencias dentro de una región que funciona en el control de la transcripción. En esta técnica, se evalúa un grupo de construcciones con mutaciones solapadas contiguas en sus efectos sobre la expresión de un gen informador o en la producción de un mRNA específico (Fig. 7-21a). Este tipo de análisis identificó los **elementos proximales al promotor** del gen de la timidina cinasa (*tk*) del virus del herpes simple tipo I (HSV-I). Los resultados demostraron que la región de DNA corriente arriba del gen *tk* del HSV contiene tres secuencias de control de la transcripción separadas: una caja TATA en el intervalo de -32 a -16 y otros dos elementos de control más alejados corriente arriba (Fig. 7-21b). Los experimentos que utilizan mutantes que contienen cambios de un único par de bases en los elementos de control proximal al promotor revelaron que suelen tener de ≈ 6 -10 pares de bases de longitud. Los resultados recientes indican que estos se encuentran tanto corriente arriba como corriente abajo del sitio de inicio de la transcripción para los genes humanos en igual frecuencia. Mientras que, en rigor, el término *promotor* se refiere a la secuencia de DNA que determina dónde una polimerasa inicia la transcripción, el término a menudo se usa para referirse tanto a un promotor como a sus elementos de control proximales al promotor.

Para evaluar las restricciones del espaciamiento en los elementos de control en la región promotora *tk* del HSV identificadas por análisis de las mutaciones rastreadoras de ligadores, los investigadores prepararon y evaluaron las construcciones conteniendo pequeñas deleciones e inserciones entre los elementos. Los cambios en el espaciamiento entre el promotor y los elementos de control proximal al promotor de 20

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 7.3

Promotores y factores de transcripción generales de la RNA polimerasa II

- La RNA polimerasa II inicia la transcripción de genes en el nucleótido en el molde de DNA que corresponde al nucleótido 5' que forma la caperuza en el mRNA codificado.
- La transcripción de los genes que codifican proteínas por la Pol II se puede iniciar in vitro por la unión secuencial de los siguientes factores en el orden indicado: TBP, que se une al DNA de la caja TATA; TFIIB; un complejo de Pol II y TFIIF; TFIIE; y finalmente, TFIIH (véase la Fig. 7-17).
- La actividad helicasa de una subunidad TFIIH contribuye a separar las hebras molde en el sitio de inicio en la mayoría de los promotores, un proceso que requiere la hidrólisis de ATP. A medida que la Pol II comienza a transcribir alejándose del sitio de inicio de la transcripción, su CTD es fosforilado en la serina 5 del heptapéptido del CTD por otra subunidad del TFIIH.
- La iniciación de la transcripción in vitro por parte de la Pol II también requiere TFIIA y, en algunos metazoos, un complejo proteico de TFIID completo, que incluye sus múltiples subunidades TAF como también la subunidad TBP.

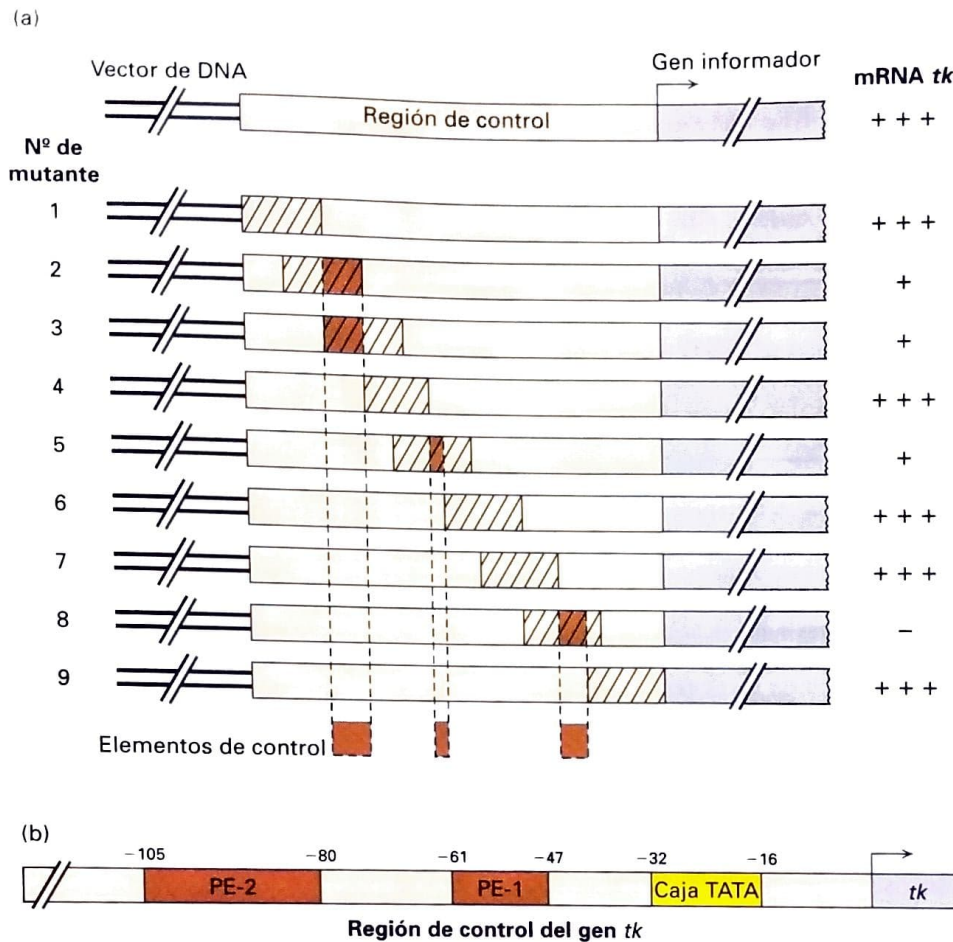


FIGURA EXPERIMENTAL 7-21 Las mutaciones rastreadoras de ligadores (linker scanning mutations) identifican los elementos de control de la transcripción. (a) Una región del DNA eucarionte (tostado) que sustenta un alto nivel de expresión de un gen informador (violeta) se clona en un vector plasmídico como se representa en la parte superior. Desde un extremo de la región bajo análisis al otro, se introducen las mutaciones rastreadoras de ligadores (RL) que se solapan (con rayas). Estas mutaciones son el resultado de la mezcla de secuencias nucleotídicas en un segmento corto de DNA. Después de transfectar los plásmidos mutantes por separado a células cultivadas, se analiza la actividad del producto gen-informador. En el ejemplo que se muestra

aquí, la secuencia desde -120 hasta +1 del gen timidina cinasa del virus de herpes simple, las mutaciones RL 1, 4, 6, 7 y 9 tienen poco o ningún efecto en la expresión del gen informador, lo cual indica que las regiones alteradas en estos mutantes no contienen elementos de control. La expresión del gen informador se reduce significativamente en los mutantes 2, 3, 5 y 8, lo cual indica que los elementos de control (marrón) se encuentran en los intervalos que se muestran en la parte inferior. (b) El análisis de estas mutaciones RL identificó una caja TATA y dos elementos proximales al promotor (PE-1 y PE-2). [Parte (b), véase S. L. McKnight y R. Kingsbury, 1982, *Science* **217**:316.]

nucleótidos o menos tuvieron poco efecto. Sin embargo, las inserciones de 30 a 50 pares de bases entre los elementos proximales al promotor de *tk* del HSV-I y la caja TATA fueron equivalentes a eliminar el elemento. Los análisis similares de otros promotores eucariontes también indicaron que, en general, se tolera una flexibilidad considerable en el espaciamiento entre los elementos proximales al promotor, pero las separaciones de varias decenas de pares de bases pueden disminuir la transcripción.

Los potenciadores distantes suelen estimular la transcripción por la RNA polimerasa II

Como se describió anteriormente, la transcripción a partir de muchos promotores eucariontes puede estimularse mediante elementos de control localizados miles de pares de bases alejados del sitio de inicio. Tales elementos de control de la transcripción a larga distancia, deno-

minados potenciadores, son comunes en los genomas eucariontes pero bastante raros en los genomas bacterianos. Los procedimientos como la mutagénesis rastreadora de ligadores indican que los potenciadores, en general del orden de ≈ 200 pares de bases, al igual que los elementos proximales del promotor, están compuestos por diversos elementos de secuencia funcional de $\approx 6-10$ pares de bases. Como se analizó antes, cada uno de estos elementos reguladores es un sitio de unión para un factor de transcripción de unión al DNA específico de secuencia.

El análisis de muchos potenciadores celulares eucariontes diferentes ha demostrado que, en los metazoos, pueden presentarse con igual probabilidad corriente arriba de un promotor como corriente abajo de un promotor dentro de un intrón, o incluso corriente abajo del exón final de un gen, como en el caso del gen *Sall1* (véase la Fig. 7-8a). Muchos potenciadores son específicos del tipo celular. Por ejemplo, se caracterizó un potenciador que controla la expresión de *Pax6* en la retina en el intrón entre los exones 4 y 5 (véase la Fig. 7-7a), mientras que un potenciador que controla la

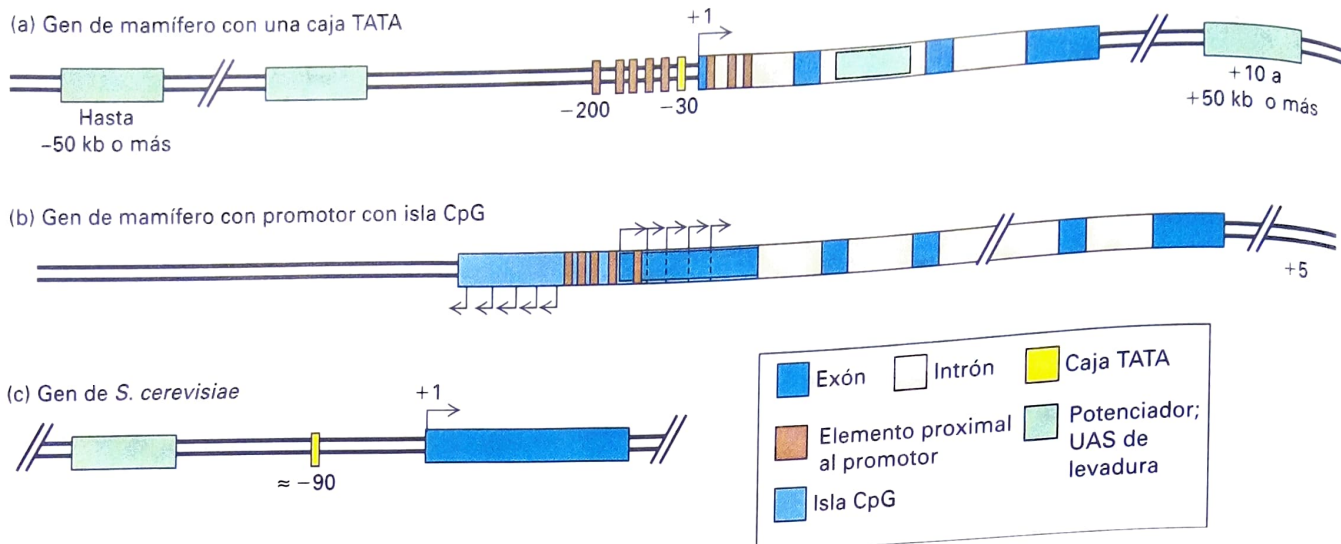


FIGURA 7-22 Organización general de los elementos de control que regulan la expresión génica en eucariotes multicelulares y levaduras.

(a) Los genes de mamíferos con un promotor con caja TATA están regulados por elementos proximales al promotor y potenciadores. Los elementos proximales al promotor que se muestran en la Figura 7-14 posicionan la RNA polimerasa II para comenzar la transcripción en el sitio de inicio e influyen en la velocidad de la transcripción. Los potenciadores pueden estar corriente arriba o corriente abajo y tan alejados como cientos de kilobases desde el sitio de inicio de la transcripción. En algunos casos, los potenciadores se encuentran dentro de los intrones. Los elementos proximales al promotor se encuentran corriente arriba y corriente abajo de los sitios de inicio de la transcripción en igual frecuencia

en los genes de mamífero. (b) Promotores con islas CpG de mamífero. La transcripción se inicia en diversos sitios tanto en dirección sentido como antisentido a partir de los extremos de la región rica en CpG. Los transcritos antisentido a partir de los extremos de la región rica en CpG son elongados y procesados a los mRNA mediante corte y empalme del RNA. Éstos expresan los mRNA con exones 5' alternativos determinados por el sitio de inicio de la transcripción. Los promotores con islas CpG contienen elementos de control proximales al promotor. En la actualidad, no está claro si éstos también son regulados por potenciadores distantes. (c) La mayoría de los genes de *S. cerevisiae* contienen solo una región reguladora, llamada una *secuencia de activación corriente arriba* (UAS), y una caja TATA, que está ≈ 90 pares de bases corriente arriba desde el sitio de inicio.

expresión de *Pax6* en las células secretoras de hormona del páncreas está localizado en una región de ≈ 200 pares de bases corriente arriba del exón 0 (de allí el nombre debido a que se descubrió después de haber nombrado al "exón 1"). En el importante organismo modelo *Saccharomyces cerevisiae* (levadura), los genes están espaciados estrechamente (Fig. 6-4b) y pocos genes contienen intrones. En este organismo, los potenciadores suelen encontrarse dentro de los ≈ 200 pares de bases corriente arriba de los promotores de los genes que ellos regulan y se los denomina con el término *secuencias activadoras corriente arriba* (UAS, *up-stream activating sequence*).

La mayoría de los genes eucariotes son regulados por múltiples elementos de control de la transcripción

Inicialmente, se pensó que los potenciadores y los elementos proximales al promotor eran diferentes tipos de elementos de control de la transcripción. Sin embargo, a medida que se fueron analizando más potenciadores y elementos proximales al promotor, la distinción entre ellos se tornó más clara. Por ejemplo, ambos tipos de elementos en general pueden estimular la transcripción incluso cuando se los invierte, y ambos tipos suelen ser específicos del tipo de célula. En la actualidad, el consenso general es que un espectro de elementos de control regula la transcripción mediante la RNA polimerasa II. En un extremo están los potenciadores, que pueden estimular la transcripción a partir de un promotor alejado decenas de miles de pares de bases. En el otro extremo están los elementos proximales al promotor, como los elementos corriente arriba que controlan al gen *tk* del HSV, que pierde su influencia cuando se lo mueve unos 30-50 pares de bases adicionales más allá

del promotor. Los investigadores han identificado una gran cantidad de elementos de control de la transcripción que pueden estimular la transcripción desde distancias entre estos dos extremos.

La Figura 7-22a resume las localizaciones de las secuencias de control de la transcripción para un gen de mamífero hipotético con un promotor que contiene una caja TATA. El sitio de inicio en el cual se inicia la transcripción codifica el primer nucleótido (5') del primer exón de un mRNA, el nucleótido que tiene caperuza. Además de la caja TATA a ≈ -31 a -26 , los elementos proximales al promotor, que son relativamente cortos ($\approx 6-10$ pares de bases), se localizan dentro de los primeros ≈ 200 pares de bases ya sea corriente arriba o corriente abajo del sitio de inicio. Los potenciadores, por el contrario, suelen tener alrededor de 50-200 pares de bases de longitud y están compuestos por múltiples elementos de $\approx 6-10$ pares de bases. Los potenciadores pueden localizarse hasta 50 kilobases o más corriente arriba o corriente abajo del sitio de inicio o dentro de un intrón. Al igual que para el gen *Pax6*, muchos genes de mamífero están controlados por más de una región potenciadora que funciona en diferentes tipos de células.

La Figura 7-22b resume la región promotora de un gen de mamífero con un promotor con isla CpG. Alrededor del 60-70% de los genes de mamífero se expresan a partir de promotores con islas CpG, en general a niveles mucho menores que los genes con promotores con caja TATA. Se utilizan muchos sitios de inicio de la transcripción alternativos, generando los mRNA con extremos 5' alternativos para el primer exón derivado de cada sitio de inicio. La transcripción se produce en ambas direcciones, pero las moléculas Pol II que transcriben en la dirección positiva (sentido) elongan hasta > 1 kb mucho más eficientemente que los transcritos en la dirección antisentido.

El genoma de *S. cerevisiae* contiene elementos reguladores llamados **secuencias activadoras corriente arriba (UAS)**, que funcionan de manera similar a los potenciadores y los elementos proximales al promotor en los eucariontes superiores. La mayoría de los genes contiene sólo una UAS, que en general se encuentra dentro de unos pocos cientos de pares de bases del sitio de inicio. Además, los genes de *S. cerevisiae* contienen una caja TATA ≈ 90 pares de bases corriente arriba del sitio de inicio de la transcripción (Fig. 7-22c).

Los ensayos de huella genética y de retardo en gel detectan las interacciones entre el DNA y las proteínas

Los diversos elementos de control que se encuentran en el DNA eucarionte son sitios de unión para las proteínas reguladoras y suelen denominarse **factores de transcripción**. Las células eucariontes más simples codifican cientos de factores de transcripción y el genoma humano codifica más de 2 000. La transcripción de cada gen en el genoma es regulada de forma independiente por combinaciones de *factores de transcripción específicos* que se unen a sus regiones de control de la transcripción. El número de combinaciones posibles de estos muchos factores de transcripción es astronómico, lo suficiente como para generar controles únicos para cada gen codificado en el genoma.

En las levaduras, en *Drosophila* y en otros eucariontes genéticamente analizables numerosos genes codifican activadores y represores transcripcionales identificados por los análisis clásicos como los que se describieron en el **Capítulo 5**. Sin embargo, en los mamíferos y en otros vertebrados, que son menos susceptibles para el análisis genético, la mayoría de los factores de transcripción se han detectado inicialmente y luego purificado mediante técnicas bioquímicas. En esta técnica se usa un elemento regulador de DNA identificado mediante la clase de análisis mutacionales descritos anteriormente para identificar proteínas *afines* que se unen a él de manera específica. Dos técnicas comunes para la detección de tales proteínas afines son las huellas genéticas con DNasa I y el ensayo de retardo de la movilidad electroforética.

La **huella genética con DNasa I** tiene la ventaja del hecho de que cuando una proteína está unida a una región de DNA, protege esa secuencia de DNA de la digestión por parte de las nucleasas. Como se ilustra en la **Figura 7-23a**, las muestras de un fragmento que está marcado en un extremo son digeridas en condiciones cuidadosamente controladas en la presencia y en la ausencia de una proteína de unión al DNA, luego se las desnaturaliza y se las somete a electroforesis y el gel resultante se somete a autorradiografía. La región protegida por la proteína unida aparece como una brecha, o “huella”, en la disposición de bandas resultantes de la digestión en presencia y en ausencia de proteína. Cuando se realiza el ensayo de huella genética con un fragmento de DNA que contiene un elemento de control conocido, la aparición de una huella indica la presencia de un factor de transcripción que se une a ese elemento de control en la muestra de proteína a ser evaluada. La huella genética también identifica la secuencia de DNA a la cual se une el factor de transcripción.

Por ejemplo, la huella genética del promotor fuerte tardío del adenovirus muestra una región protegida sobre la caja TATA cuando se añade TBP al DNA marcado antes de la digestión con DNasa I (Fig. 7-23b). La DNasa I no digiere todos los enlaces fosfodiéster en un DNA dúplex a igual velocidad. En consecuencia, en ausencia de proteína añadida (líneas 1, 6 y 9), se observa un patrón de bandas particular que

depende de la secuencia de DNA y es el resultado de la escisión de algunos enlaces fosfodiéster y no de otros. Sin embargo, cuando se incuban cantidades crecientes de TBP con el DNA marcado en el extremo antes de la digestión con DNasa I, la TBP se une a la caja TATA y protege la región entre ≈ -35 y -20 de la digestión cuando se añade suficiente TBP a todas las moléculas de DNA marcadas. Por el contrario, cantidades crecientes de TFIID (líneas 7 y 8) protegen tanto la región de la caja TATA de la digestión con la DNasa I, como también regiones cercanas a -7 , $+1$ a $+5$, $+10$ a $+15$ y $+20$, produciendo una “huella genética” diferente de la TBP. Los resultados tales como éste nos dicen que otras subunidades de TFIID (los factores asociados con TBP o los TAF) también se unen al DNA en la región corriente abajo de la caja TATA.

El **ensayo de retraso de la movilidad electroforética (EMSA, electrophoretic mobility shift assay)**, también llamado *retardo en gel* o *ensayo de corrimiento de bandas*, es más útil que el ensayo de huella genética para análisis cuantitativo de las proteínas de unión al DNA. En general, la movilidad electroforética de un fragmento de DNA está reducida cuando forma complejo con proteínas, lo que causa un corrimiento en la localización de la banda del fragmento. Este ensayo se puede usar para detectar un factor de transcripción en fracciones de proteínas incubadas con un fragmento de DNA radiomarcado conteniendo un elemento de control conocido (Fig. 7-24). Cuantos más factores de transcripción se añaden a la reacción de unión, más sonda marcada se corre de la posición del complejo DNA y proteína.

En el aislamiento bioquímico de un factor de transcripción, un extracto de núcleos celulares se somete secuencialmente a diversos tipos de cromatografía en columna (**Cap. 3**). Las fracciones eluidas de las columnas son sometidas a ensayo de huella genética con DNasa I o a EMSA usando fragmentos de DNA que contienen un elemento regulador identificado (véase la Fig. 7-21). Las fracciones que contienen una proteína que se une al elemento regulador en estos ensayos probablemente contienen un factor de transcripción putativo. Una técnica poderosa que suele usarse para el paso final en la purificación de los factores de transcripción es la *cromatografía de afinidad de DNA específica de secuencia*, un tipo particular de cromatografía de afinidad en la cual las hebras de DNA largas que contienen múltiples copias del sitio de unión al factor de transcripción están unidas a la matriz de una columna.

Una vez que se aisló y se purificó un factor de transcripción, se puede determinar y usar una secuencia aminoácida parcial para clonar el gen o el cDNA que lo codifica, como se esquematiza en el **Capítulo 5**. Este gen aislado se puede usar para evaluar la habilidad de la proteína codificada para activar o reprimir la transcripción en un ensayo de transfección in vitro (Fig. 7-25).

Los activadores estimulan la transcripción y están compuestos por distintos dominios funcionales

Los estudios con un activador de la transcripción de levadura llamado GAL4 proporcionan evidencia inicial de la estructura del dominio de los factores de transcripción. El gen que codifica la proteína GAL4, que estimula la expresión de enzimas necesarias para metabolizar la galactosa, fue identificado por análisis de complementación de los mutantes *gal4* que no pueden formar colonias en un medio con agar en el cual la galactosa es la única fuente de carbono y energía (**Cap. 5**). Los estudios de mutagénesis dirigida como los analizados anteriormente identificaron las UAS para los genes activados por GAL4. Cada una de estas UAS se encontró que contiene una o más copias de una secuencia

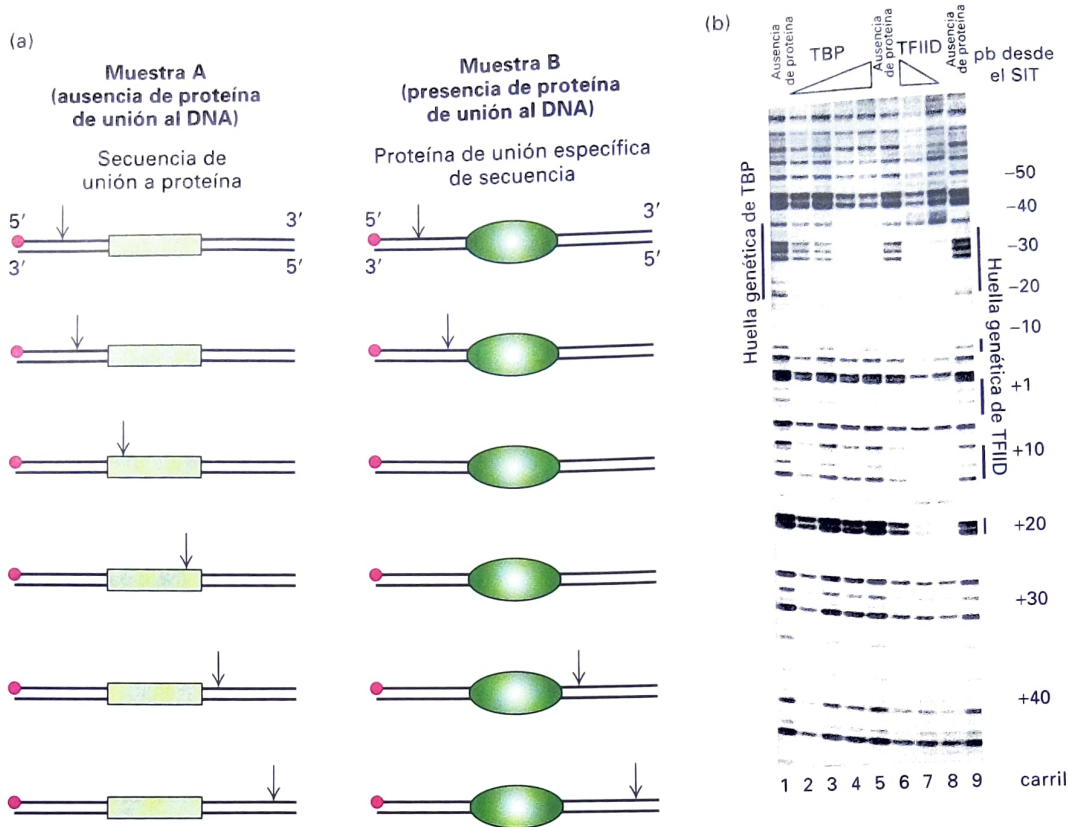
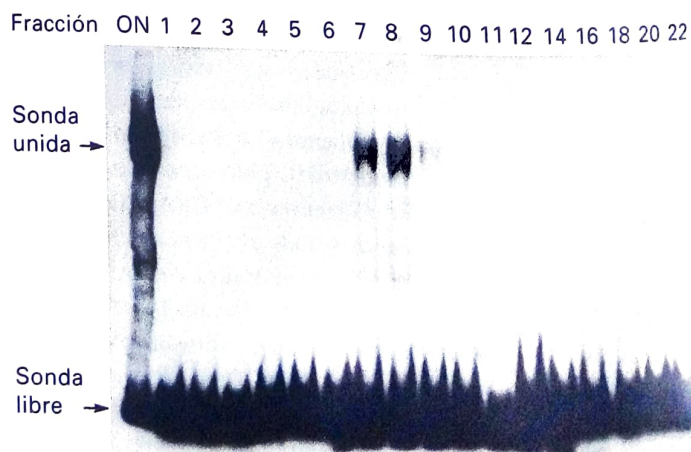


FIGURA EXPERIMENTAL 7-23 La huella genética con DNasa I revela la región de una secuencia de DNA donde se une un factor de transcripción. (a) Un fragmento de DNA conocido que contiene un elemento de control está marcado en un extremo con ^{32}P (punto rojo). Las porciones de la muestra de DNA marcado luego son digeridas con DNasa I en presencia y ausencia de muestras de proteínas que contienen una proteína de unión a DNA de secuencia específica. La DNasa I hidroliza los enlaces fosfodiéster del DNA entre el oxígeno 3' en la desoxirribosa de un nucleótido y el fosfato 5' del siguiente nucleótido. Se utiliza una concentración baja de DNasa I, de manera tal que, en promedio, cada molécula de DNA sea cortada solo una vez (flechas verticales). Si la muestra de proteína no contiene una proteína afin de unión a DNA, el fragmento de DNA es cortado en múltiples posiciones entre los extremos marcados y no marcados del fragmento original, como en la muestra A (izquierda). Si la muestra de proteína contiene una proteína que se une a

una secuencia específica en el DNA marcado, como en la muestra B (derecha), la proteína se une al DNA y protege así una porción del fragmento de la digestión. Después del tratamiento con DNasa, se separa el DNA de la proteína, se lo desnaturaliza para separar las hebras y se lo somete a electroforesis. La autorradiografía del gel resultante detecta solo las hebras marcadas y revela los fragmentos que se extienden desde el extremo marcado hasta el sitio de escisión de la DNasa I. Los fragmentos cortados que contienen las secuencias control aparecen en el gel para la muestra A pero no en la muestra B debido a que la proteína afin bloquea la escisión dentro de la secuencia y, por lo tanto, la producción de los correspondientes fragmentos. (b) Huellas genéticas producidas por las cantidades crecientes de TBP (indicadas por el triángulo) y de TFIIID en el promotor principal tardío fuerte del adenovirus. [Parte (b) de Q. Zhou y cols., 1992, *Genes Dev.* 6:1964.]

FIGURA EXPERIMENTAL 7-24 El ensayo de movilidad electroforética puede usarse para detectar factores de transcripción durante la purificación. En este ejemplo, los factores proteicos separados por cromatografía de columna se analizaron por su capacidad de unirse a una sonda de fragmento de DNA radiomarcado que contiene un elemento regulador conocido. Después de que una alícuota de la muestra de proteína se cargó en la columna (ON) y las sucesivas fracciones de la columna (números) se incubaron con la sonda marcada, las muestras se sometieron a electroforesis bajo condiciones que no interrumpen las interacciones DNA-proteína. La sonda libre no unida a la proteína migra hasta la parte inferior del gel. Una proteína en la preparación aplicada a la columna y en las fracciones 7 y 8 se une a la sonda y forma un complejo DNA-proteína que migró más lentamente que la sonda libre. Por lo tanto, estas fracciones probablemente contenían la proteína reguladora buscada. [De S. Yoshinaga y cols., 1989, *J. Biol. Chem.* 264:10529.]



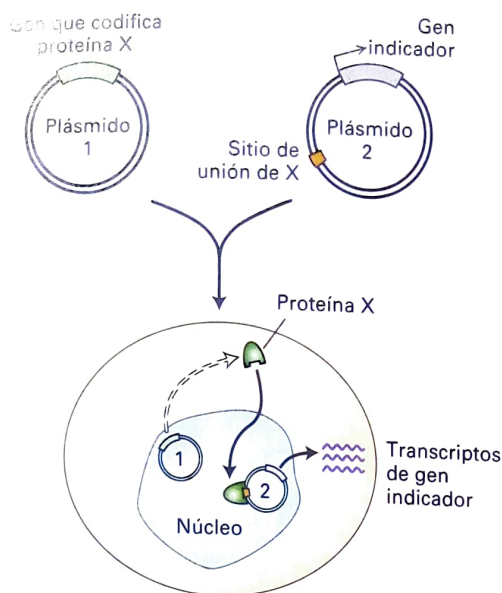


FIGURA EXPERIMENTAL 7-25 En los ensayos de transfección in vivo se mide la actividad transcripcional para evaluar las proteínas que se creen son factores de transcripción. El sistema de ensayos requiere dos plásmidos. Un plásmido contiene el gen que codifica el factor de transcripción putativo (proteína X). El segundo plásmido contiene un gen informador (p. ej., luciferasa) y uno o más sitios de unión para la proteína X. Ambos plásmidos se introducen simultáneamente dentro de las células que carecen del gen que codifica la proteína X. Se mide la producción de los transcritos de RNA del gen informador; alternativamente, se puede medir la actividad de la proteína codificada. Si la transcripción del gen informador es mayor en presencia del plásmido que codifica X que en su ausencia, entonces la proteína es un activador; si la transcripción es menor, entonces es un represor. Mediante el uso de plásmidos que codifican un factor de transcripción reordenado o mutado, se pueden identificar dominios importantes para la proteína.

de 17 pb relacionada llamada UAS_{GAL} . Los ensayos de huella genética con DNasa I con la proteína GAL4 recombinante producida en *E. coli* a partir del gen GAL4 de levadura, demostraron que la proteína GAL4 se une a las secuencias UAS_{GAL} . Cuando una copia de UAS_{GAL} se clonó corriente arriba de una caja TATA seguida por el gen informador de la β -galactosidasa, la expresión de la β -galactosidasa se activó en el medio con galactosa en las células de tipo silvestre pero no en los mutantes *gal4*. Estos resultados muestran que UAS_{GAL} es un elemento de control de la transcripción activado por la proteína GAL4 en medio con galactosa.

Un grupo de experimentos notables con mutantes con delección de *gal4* demostró que el factor de transcripción GAL4 está compuesto por dominios funcionales separados: un **dominio de unión al DNA** N-terminal, que se une a secuencias de DNA específicas, y un **dominio de activación** C-terminal, que interactúa con otras proteínas para estimular la transcripción desde un promotor cercano (Fig. 7-26). Cuando el dominio de unión al DNA N-terminal de GAL4 se fusionó directamente a varias porciones de su región C-terminal, las proteínas truncadas retuvieron su capacidad de estimular la expresión de un gen informador en un ensayo in vivo como el descrito en la Figura 7-25. Por lo tanto, la porción interna de la proteína no es necesaria para el funcionamiento de GAL4 como un factor de transcripción. Experimentos similares con otros factores de transcripción de levadura, GCN4, que regulan genes

necesarios para la síntesis de muchos aminoácidos, indican que contienen un dominio de unión al DNA de ≈ 50 aminoácidos en su extremo C-terminal y un dominio de activación de ≈ 20 aminoácidos cerca de la mitad de su secuencia.

Evidencia adicional para la existencia de diferentes dominios de activación en GAL4 y GCN4 provienen de los experimentos en los cuales sus dominios de activación se fusionaron a un dominio de unión al DNA de una proteína entera de unión al DNA de *E. coli* no relacionada. Cuando estas proteínas de fusión se probaron in vivo, activaron la transcripción de un gen informador conteniendo el sitio afin para la proteína de *E. coli*. Por lo tanto, los factores de transcripción funcionales se pueden construir a partir de combinaciones completamente nuevas de elementos procariontes y eucariontes.

En la actualidad, se están llevando a cabo estudios de tales proteínas con muchos activadores eucariontes. El modelo estructural de los activadores eucariontes que ha emergido a partir de estos estudios es uno modular en el cual uno o más dominios de activación están conectados a un dominio de unión al DNA específico de secuencia por medio de dominios de proteínas flexibles (Fig. 7-27). En algunos casos, los aminoácidos incluidos en el dominio de unión al DNA también contribuyen a la activación transcripcional. Como se analiza en una sección más adelante, los dominios de activación se cree que funcionan mediante la unión a otras proteínas involucradas en la transcripción. La presencia de dominios flexibles que conectan los dominios de unión al DNA a los dominios de activación puede explicar por qué las alteraciones en el espaciamiento entre los elementos de control se toleran tan bien en las regiones de control eucariontes. Incluso cuando las posiciones de los factores de transcripción unidos al DNA se desplazan unos de otros, sus dominios de activación aún pueden ser capaces de interactuar debido a que están adheridos a sus dominios de unión al DNA por medio de las regiones proteicas flexibles.

Los represores inhiben la transcripción y funcionan al revés que los activadores

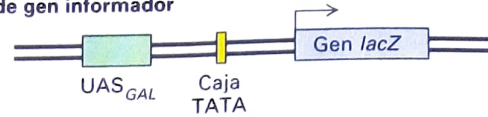
La transcripción eucarionte está regulada tanto por represores como por activadores. Por ejemplo, los genetistas han identificado mutaciones en levaduras que producen la expresión elevada de ciertos genes. Este tipo de expresión desregulada, anormalmente alta se denomina expresión **constitutiva** y es el resultado de la inactivación de un represor que normalmente inhibe la transcripción de estos genes. De modo similar, se han aislado mutantes de *Drosophila* y de *Caenorhabditis elegans* que son defectuosos en el desarrollo embrionario debido a que expresan genes en las células embrionarias donde estos genes suelen estar reprimidos. Las mutaciones en estos mutantes represores inactivos conducen al desarrollo anómalo.

Los sitios de unión a represores en el DNA se han identificado por análisis sistemático de mutaciones rastreadoras de ligadores similar al descrito en la Figura 7-21. En este tipo de análisis, las mutaciones de un sitio de unión a activador llevan a la disminución de la expresión del gen informador ligado, mientras que una mutación de un sitio de unión a represor lleva a un aumento de la expresión de un gen informador. Las proteínas represoras que se unen a tales sitios se pueden purificar y ensayar usando las mismas técnicas bioquímicas descritas anteriormente para las proteínas activadoras.

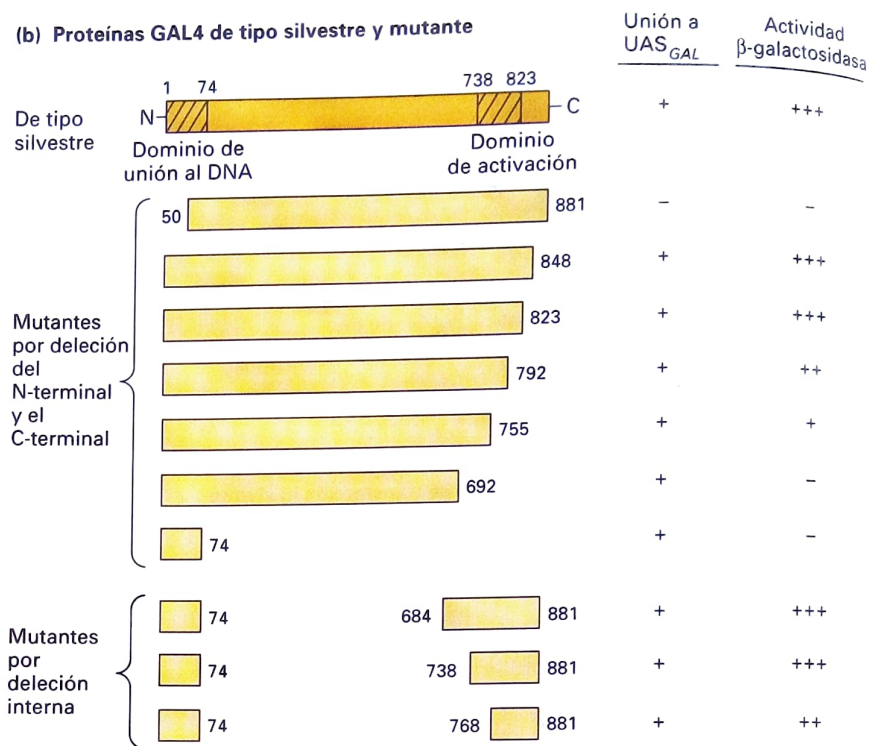
Los represores de la transcripción eucarionte son la inversa funcional de los activadores. Ellos pueden inhibir la transcripción a partir de un gen que normalmente no regulan cuando sus sitios de unión

FIGURA EXPERIMENTAL 7-26 Los mutantes por delección del gen *GAL4* en la levadura con una construcción de *UAS_{GAL}*-gen informador demuestran los dominios funcionales separados en un activador. (a) Diagrama de la construcción de

(a) Construcción de gen informador



(b) Proteínas GAL4 de tipo silvestre y mutante



DNA que contiene un gen informador *lacZ* (que codifica la β -galactosidasa) y una caja TATA ligada a la *UAS_{GAL}*, un elemento regulador que contiene varios sitios de unión a GAL4. La construcción del gen informador y el DNA que codifica GAL4 de tipo silvestre o mutado (delección) se introdujeron de manera simultánea en células de levadura mutante (*gal4*) y se midió la actividad de β -galactosidasa expresada a partir de *lacZ*. La actividad será alta si el DNA GAL4 introducido codifica una proteína funcional. (b) Diagramas esquemáticos de GAL4 de tipo silvestre y varias formas mutantes. Los números pequeños se refieren a las posiciones en la secuencia de tipo silvestre. La delección de 50 aminoácidos desde el extremo N-terminal destruye la capacidad de GAL4 de unirse a la *UAS_{GAL}* y estimular la expresión de la β -galactosidasa desde el gen informador. Las proteínas con delecciones extensas desde el extremo C-terminal aún se unen a la *UAS_{GAL}*. Estos resultados localizan el dominio de unión al DNA en el extremo N-terminal de GAL4. La capacidad para activar la expresión de la β -galactosidasa no se elimina completamente a menos que se elimine alguna región entre los aminoácidos 126 y 189 o más a partir del extremo C-terminal. Así, el dominio de activación se encuentra en la región C-terminal de GAL4. Las proteínas con delecciones internas (*parte superior*) también son capaces de estimular la expresión de la β -galactosidasa, lo cual indica que la región central de GAL4 no es esencial para su función en este ensayo. [Véase J. Ma y M. Ptashne, 1987, *Cell* **48**:847; I. A. Hope y K. Struhl, 1986, *Cell* **46**:885; y R. Brent y M. Ptashne, 1985, *Cell* **43**:729.]

Ejemplos

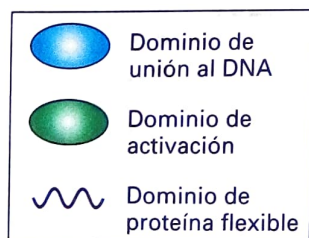
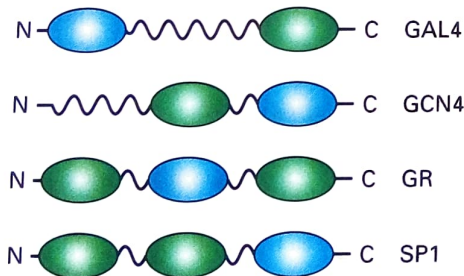


FIGURA 7-27 Diagramas esquemáticos que ilustran la estructura modular de los activadores eucariontes. Los factores de transcripción pueden contener más de un dominio de activación pero raramente contienen más de un dominio de unión al DNA. GAL4 y GCN4 son activadores de la transcripción en la levadura. El receptor glucocorticoide (GR) promueve la transcripción de genes diana cuando ciertas hormonas están unidas al dominio de activación C-terminal. SP1 se une a los elementos promotores ricos en CG en un gran número de genes de mamífero.

afín están ubicados dentro de las decenas de pares de bases hasta muchas kilobases del sitio de inicio del gen. Al igual que los activadores, la mayoría de los represores eucariontes son proteínas modulares que tienen dos dominios funcionales: un dominio de unión al DNA y un **dominio de represión**. De manera similar a los dominios de activación, los dominios de represión continúan funcionando cuando se los fusiona a otro tipo de dominio de unión al DNA. Si los sitios de unión para este segundo dominio de unión al DNA están insertados dentro de unos pocos cientos de pares de bases de un promotor, la expresión de la proteína fusionada inhibe la transcripción desde el promotor. También al igual que los dominios activadores, los dominios de represión funcionan mediante interacción con otras proteínas, como se analiza más adelante en este capítulo.

Los dominios de unión al DNA se pueden clasificar dentro de numerosos tipos estructurales

Los dominios de unión al DNA de los activadores y los represores eucariontes contienen una variedad de motivos estructurales que se unen a secuencias de DNA específicas. La capacidad de las proteínas de unión al DNA de unirse a secuencias de DNA específicas por lo general proviene de las interacciones no covalentes entre átomos en una hélice α en el dominio de unión al DNA y átomos en los bordes de las bases dentro de un surco mayor en el DNA. Las interacciones iónicas entre los residuos de arginina y lisina cargados positivamente y los fosfatos

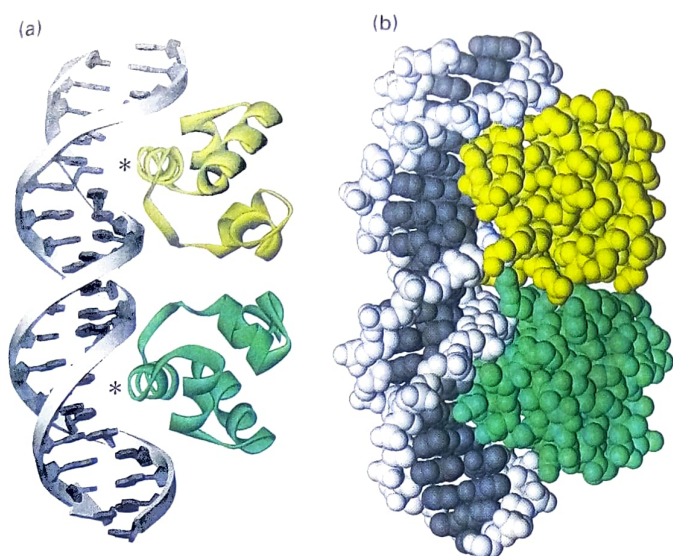


FIGURA 7-28 Interacción del represor 434 de bacteriófago con el DNA. (a) Diagrama de cintas del represor 434 unido a su DNA operador específico. Los monómeros de represor son amarillos y verdes. Las hélices de reconocimiento se indican mediante asteriscos. Un modelo espacial del complejo represor-operador (b) muestra cómo interactúa la proteína íntimamente con un lado de una molécula del DNA de 1,5 vueltas. [Adaptado de A. K. Aggarwal y cols., 1988, *Science* **242**:899.]

cargados negativamente en el esqueleto de azúcar fosfato y, en algunos casos, las interacciones con átomos en un surco menor del DNA también contribuyen a la unión.

Los principios de las interacciones proteína-DNA se descubrieron por primera vez durante el estudio de los represores bacterianos. Muchos represores bacterianos son proteínas diméricas en las que una hélice α a partir de cada monómero se inserta dentro de un surco mayor en la hélice de DNA (Fig. 7-28). Esta hélice α se conoce como la *hélice de reconocimiento* o *hélice de lectura de secuencia*, debido a que la mayoría de las cadenas laterales de aminoácidos que contactan al DNA se extienden a partir de esta hélice. La hélice de reconocimiento que sobresale desde la superficie de los represores bacterianos para entrar al surco mayor del DNA y hacer múltiples interacciones específicas con átomos en el DNA suele apoyarse en la estructura proteica en parte por las interacciones hidrófobas con una segunda hélice α justo N-terminal a él. Este elemento estructural, que está presente en muchos represores bacterianos, se denomina un motivo *hélice-giro-hélice*.

Muchos motivos adicionales que pueden presentar una hélice α al surco mayor del DNA se encuentran en los factores de transcripción eucariontes, que suelen clasificarse de acuerdo con el tipo de dominio de unión al DNA que contienen. Debido a que la mayoría de estos motivos tienen secuencias de aminoácidos consenso características, los factores de transcripción potenciales pueden ser reconocidos entre las secuencias de cDNA a partir de varios tejidos que se han caracterizado en los seres humanos y otras especies. El genoma humano, por ejemplo, codifica $\approx 2\,000$ factores de transcripción.

Aquí introducimos varias clases comunes de proteínas de unión al DNA cuyas estructuras tridimensionales han sido determinadas. En todos los ejemplos y en muchos otros factores de transcripción, al me-

nos una hélice α se inserta en un surco mayor del DNA. Sin embargo, algunos factores de transcripción contienen motivos estructurales alternativos (p. ej., hebras β y bucles, véase NFAT en la Fig. 7-32 como un ejemplo) que interactúan con el DNA.

Proteínas homeodominio Muchos factores de transcripción eucariontes durante el desarrollo contienen un motivo conservado de unión al DNA de 60 residuos, llamado un **homeodominio**, que es similar al motivo hélice-giro-hélice de los represores bacterianos. Estos factores de transcripción se identificaron por primera vez en mutantes de *Drosophila* en los cuales una parte corporal era transformada en otra durante el desarrollo (véase la Fig. 7-1b). La secuencia homeodominio conservada también se encontró en los factores de transcripción de vertebrados, incluidos aquellos que tienen funciones de control maestro similares en el desarrollo humano.

Proteínas dedos de cinc Diversas proteínas eucariontes tienen regiones que se pliegan alrededor de un ion de Zn^{2+} central, y producen un dominio compacto a partir de un segmento relativamente corto de la cadena polipeptídica. Denominado **dedo de cinc**, este motivo estructural se reconoció por primera vez en los dominios de unión al DNA pero ahora se sabe que también se presentan en proteínas que no se unen al DNA. Aquí se describen dos de las diversas clases de motivos dedos de cinc que se han identificado en los factores de transcripción eucariontes.

El *dedo de cinc* C_2H_2 es el motivo de unión al DNA más común codificado en el genoma humano y en los genomas de la mayoría de otros animales multicelulares. También es común en las plantas multicelulares pero no es el tipo dominante de dominio de unión al DNA en las plantas así como en los animales. Este motivo tiene una secuencia consenso de 23 a 26 residuos que contiene dos cisteínas (C) conservadas y dos residuos de histidina (H) conservadas, cuyas cadenas laterales se unen a un ion Zn^{2+} (Fig. 3-9c). El nombre “dedo de cinc” se acuñó debido a que un diagrama bidimensional de la estructura se asemeja a un dedo. Cuando se resolvió la estructura tridimensional, se aclaró que la unión del ion Zn^{2+} por parte de los dos residuos de cisteína y los dos de histidina pliegan la secuencia polipeptídica relativamente corta en un dominio compacto, que puede insertar su hélice α en el surco mayor del DNA. Muchos factores de transcripción contienen múltiples dedos de cinc C_2H_2 , que interactúan con sucesivos grupos de pares de bases, dentro del surco mayor, a medida que la proteína se envuelve alrededor de la doble hélice de DNA (Fig. 7-29a).

Un segundo tipo de estructura de dedo de cinc, designada el *dedo de cinc* C_4 (debido a que tiene sus cuatro cisteínas conservadas en contacto con el Zn^{2+}), se encuentra en ≈ 50 factores de transcripción humanos. Los primeros miembros de esta clase se identificaron como proteínas de unión intracelulares específicas de alta afinidad, o “receptores”, para hormonas esteroides, lo que condujo a que recibieran el nombre de *superfamilia de receptores de esteroides*. Como luego se hallaron receptores intracelulares similares para las hormonas no esteroides, estos factores de transcripción suelen denominarse ahora **receptores nucleares**. El rasgo característico de los dedos de cinc C_4 es la presencia de dos grupos de cuatro cisteínas críticas, una hacia cada extremo del dominio de 55 o 56 residuos de aminoácidos. Aunque el motivo dedo de cinc en un principio se nombró por analogía con el dedo de cinc C_2H_2 , más tarde se encontró que las estructuras tridimensionales de las proteínas que contienen estos

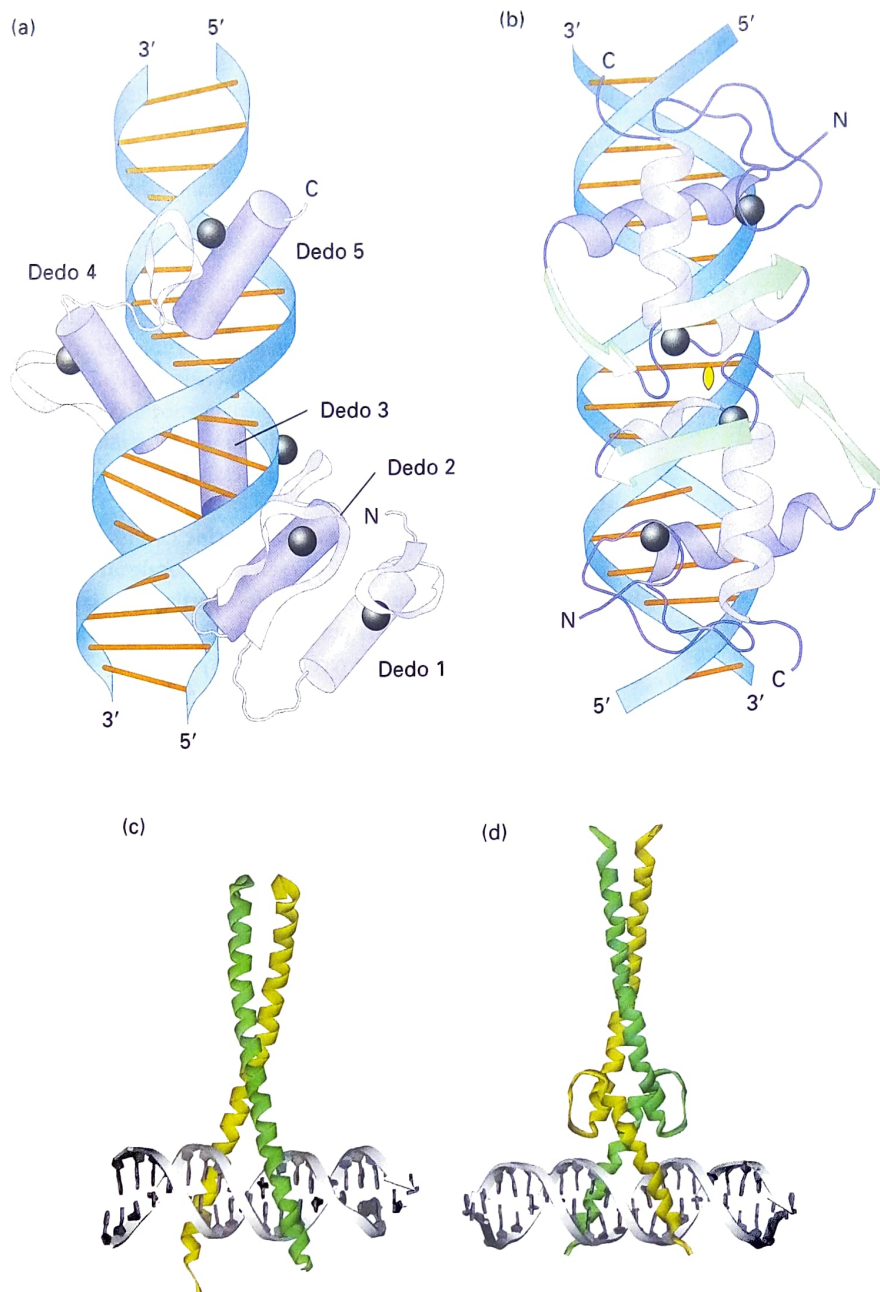


FIGURA 7-29 Dominios de unión al DNA eucarionte que usan una hélice α para interactuar con el surco mayor de secuencias de DNA específicas. (a) El dominio de unión al DNA GL1 es monomérico y contiene cinco dedos de cinc C_2H_2 . Las hélices se muestran como cilindros, los iones de Zn^{2+} como esferas. El dedo 1 no interactúa con el DNA, mientras que los otros cuatro dedos sí lo hacen. (b) El receptor de glucocorticoide es una proteína homodimérica dedo de cinc C_4 . Las hélices α se muestran como cintas purpuras, las hebras β como cintas verdes y los iones Zn^{2+} como esferas. Las dos hélices α (sombreadas más oscuras), una en cada monómero, interactúan con el DNA. Al igual que los homodímeros dedos de cinc C_4 , este factor de transcripción tiene el doble de simetría rotacional; el centro de simetría se

muestra mediante la elipse amarilla. (c) En las proteínas con cremallera de leucina, los residuos básicos en las regiones de hélice α extendida de los monómeros interactúan con el armazón del DNA en los surcos mayores adyacentes. El dominio de dimerización de espiral enrollada está estabilizado por las interacciones hidrófobas entre los monómeros. (d) En las proteínas HBHb, las hélices de unión al DNA en la parte inferior (N-terminal de los monómeros) están separadas por bucles no helicoidales a partir de una región de tipo cremallera de leucina que contiene un dominio de dimerización de espiral enrollada. [Parte (a), véase N. P. Pavletich y C. O. Pabo, 1993, *Science* **261**:1701. Parte (b), véase B. F. Luisi y cols., 1991, *Nature* **352**:497. Parte (c), véase T. E. Ellenberger y cols., 1992, *Cell* **71**:1223. Parte (d), véase A. R. Ferre-D'Amare y cols., 1993, *Nature* **363**:38.]

motivos de unión al DNA eran bastante diferentes. Una diferencia particularmente importante entre ambos es que las proteínas con dedos de cinc C_2H_2 en general contienen tres o más unidades de dedos repetitivos y se unen con monómeros, mientras que las proteínas con dedos de cinc C_4 en general contienen solo dos unidades de dedos y en general se unen al DNA como homodímeros o heterodímeros. Los homodímeros de dominios de unión al DNA dedos de cinc C_4 tienen simetría rotacional doble (Fig. 7-29b). En consecuencia, los receptores nucleares homodiméricos se unen a secuencias de DNA consenso que son repeticiones invertidas.

Proteínas con cremallera de leucina Otro motivo estructural presente en los dominios de unión al DNA de una clase grande de factores de transcripción contiene el aminoácido hidrófobo leucina en cada séptima posición en la secuencia. Estas proteínas se unen al DNA como dímeros, y la mutagénesis de las leucinas mostró que eran necesarias para la dimerización. En consecuencia, el nombre **cremallera de leucina** se acuñó para denotar este motivo estructural.

El dominio de unión al DNA del factor de transcripción GCN4 de levadura mencionado anteriormente es un dominio de cremallera de leucina. Los análisis de cristalografía de rayos X de los complejos entre el DNA y el dominio de unión al DNA GCN4 han mostrado que la proteína dimerica contiene dos hélices α extendidas que “agarran” a la molécula de DNA, de modo similar a un par de tijeras, en dos surcos mayores adyacentes separados por alrededor de una vuelta de la doble hélice (Fig. 7-29c). Las porciones de las hélices que contactan al DNA incluyen los residuos cargados positivamente (básicos) que interactúan con los fosfatos en el armazón de DNA y los residuos adicionales que interactúan con bases específicas en el surco mayor.

GCN4 forma dímeros a través de interacciones hidrófobas entre las regiones C-terminales de las hélices α , formando una estructura **espiral enrollada**. Esta estructura es común en proteínas que contienen hélices α anfipáticas en las cuales los residuos de aminoácidos hidrófobos están regularmente espaciados, separados de forma alternativa por tres a cuatro posiciones de distancia en la secuencia, formando una franja hacia abajo en uno de los lados de la hélice α . Estas franjas hidrófobas constituyen las superficies de interacción entre los monómeros de hélice α en un dímero de espiral enrollada (véase la Fig. 3-9a).

Aunque los primeros factores de transcripción de la cremallera de leucina en ser analizados contenían residuos de leucina cada siete posiciones en la región de dimerización, posteriormente se identificaron otros aminoácidos hidrófobos en estas posiciones en proteínas adicionales de unión al DNA. Actualmente se usa el término **cremallera básica** (*bZIP*) para referirse a todas las proteínas con estas características estructurales comunes. Muchos factores de transcripción de cremallera básica son heterodímeros de dos diferentes cadenas polipeptídicas, cada una de las cuales contiene un dominio de cremallera.

Proteínas básicas hélice-bucle-hélice (HBHb) El dominio de unión al DNA de otra clases de factores de transcripción diméricos contiene un motivo estructural muy similar al motivo de cremallera básico, excepto que en cada monómero las dos regiones α helicoidales están separadas por un bucle no helicoidal de la cadena polipeptídica (Fig. 7-29d). Denominado un **hélice-bucle-hélice básico** (HBHb), este motivo se predijo a partir de las secuencias de aminoácidos de estas proteínas, que contienen una hélice α N-terminal con residuos

básicos que interactúan con el DNA, una región media con bucle y una región C-terminal con aminoácidos hidrófobos espaciados a intervalos característicos de una hélice α anfipática. Al igual que las proteínas con cremallera básica, diferentes proteínas HBHb pueden formar heterodímeros.

Dominios de activación y represión estructuralmente diversos regulan la transcripción

Los experimentos con proteínas de fusión compuestas por el dominio de unión al DNA GAL4 y segmentos de enrollamiento al azar de proteínas de *E. coli* demostraron que un grupo diverso de secuencias de aminoácidos pueden funcionar como dominios de activación, $\approx 1\%$ de todas las secuencias de *E. coli*, incluso a pesar de que éstas evolucionaron para realizar otras funciones. Muchos factores de transcripción contienen dominios de activación marcados por un porcentaje inusualmente alto de aminoácidos particulares. GAL4, GCN4 y la mayoría de otras levaduras que son ricas en aminoácidos ácidos (ácido aspártico y glutámico). Estos **dominios de activación ácidos** en general son capaces de estimular la transcripción en casi todos los tipos de células eucariontes –células de hongos, animales y plantas–. Los dominios de activación de factores de transcripción de mamífero y de *Drosophila* son ricos en glutamina, y algunos son ricos en prolina; incluso otros son ricos en los aminoácidos serina y treonina, estrechamente relacionados, los cuales tienen grupos hidroxilos. Sin embargo, algunos dominios de activación no son particularmente ricos en algún aminoácido específico.

Estudios biofísicos indican que los dominios de activación tienen conformaciones desestructuradas, aleatorias. Estos dominios estimulan la transcripción cuando están unidos a una proteína **coactivadora**. La interacción con un coactivador provoca que el dominio de activación adopte una conformación α helicoidal estructurada en el complejo dominio de activación y coactivador. Un ejemplo bien estudiado de un factor de transcripción con un dominio de activación ácido es la proteína CREB de mamífero, que es fosforilada en respuesta a concentraciones crecientes de cAMP. Esta fosforilación regulada es necesaria para que CREB se una a su coactivador CBP (proteína de unión a CREB), dando como resultado la transcripción de genes cuyas regiones de control contienen un sitio de unión a CREB (véase la Fig. 15-32). Cuando el dominio de activación de enrollamiento al azar fosforilado de CREB interactúa con CBP, sufre un cambio conformacional para formar dos hélices α unidas por un bucle corto, que se enrolla alrededor del dominio interactuante de CBP (Fig. 7-30a).

Algunos dominios de activación son más grandes y están más estructurados que los dominios de activación ácidos. Por ejemplo, los dominios de unión al ligando de los receptores nucleares funcionan como dominios de activación cuando unen sus ligandos específicos (Fig. 7-30b, c). La unión de ligandos induce un cambio conformacional grande que permite que el dominio de unión al ligando con la hormona unida interactúe con una hélice α corta en los coactivadores de los receptores nucleares; el complejo resultante luego puede activar la transcripción de genes cuyas regiones de control unen el receptor nuclear.

Así, el dominio de activación ácido en CREB y los dominios de activación de unión al ligando en los receptores nucleares representan dos extremos estructurales. El dominio de activación ácido de CREB

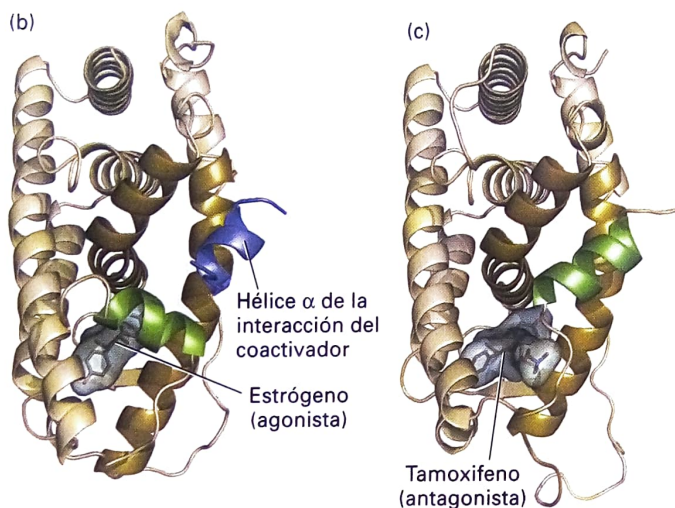
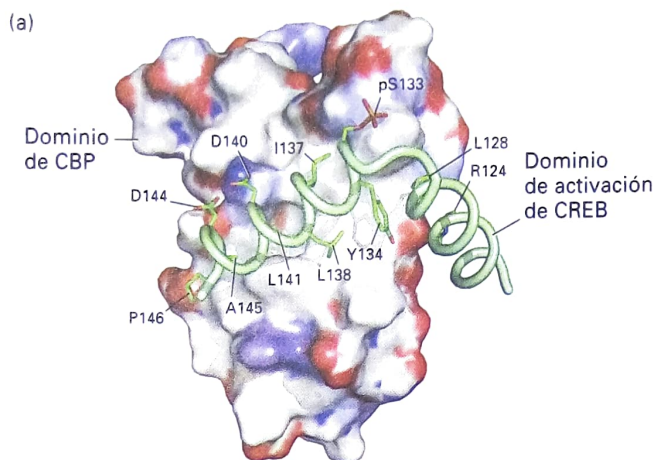


FIGURA 7-30 Los dominios de activación pueden ser espirales enrolladas hasta que interactúan con las proteínas coactivadoras o con dominios plegados de proteína. (a) El dominio de activación de CREB (proteína de unión al elemento de respuesta al AMP cíclico) es activado por la fosforilación de la serina 123. Es una espiral enrollada hasta que interactúa con un dominio del coactivador CBP (mostrado como un modelo espacial con regiones cargadas negativamente en rojo y con regiones cargadas positivamente en azul). Cuando el dominio de activación CREB se une a CBP, se pliega en dos hélices α anfiláticas. Se muestran las cadenas laterales en el dominio de activación que interactúan con la superficie del dominio CBP. (b) El dominio de activación de unión al ligando del receptor de estrógeno es un dominio proteico plegado. Cuando el estrógeno se une al dominio, la hélice α verde interactúa con el ligando y genera un surco hidrófobo en el dominio de unión al ligando (hélices marrón oscuro), que une una hélice α anfilática en una subunidad de coactivador (azul). (c) La conformación del receptor de estrógeno en la ausencia de la hormona está estabilizada por la unión del antagonista del estrógeno tamoxifeno. En esta conformación, la hélice verde del receptor se pliega en una conformación que interactúa con el surco que une el coactivador del receptor activo y bloquea estéricamente la unión de coactivadores. [Parte (a) de I. Radhakrishnan y cols. (1997) *Cell* 91:741, cortesía de Peter Wright. Partes (b) y (c) de A. K. Shiau y cols., 1998, *Cell* 95:927.]

es un enrollamiento al azar que se pliega en dos hélices α cuando se une a la superficie de un dominio globular en un coactivador. Por el contrario, el dominio de activación de unión al ligando del receptor nuclear es un dominio globular estructurado que interactúa con una hélice α corta en un coactivador, que probablemente es un enrollamiento al

azar antes de que se una. Sin embargo, en ambos casos, las interacciones específicas proteína-proteína entre coactivadores y los dominios de activación permiten que los factores de transcripción estimulen la transcripción de genes.

Actualmente, se conoce menos acerca de la estructura de los dominios de represión. Los dominios de unión al ligando de algunos receptores nucleares funcionan como dominios de represión en la ausencia de su ligando de hormona específico. Al igual que los dominios de activación, los dominios de represión pueden ser relativamente cortos y abarcan 15 o menos aminoácidos. Los estudios bioquímicos y genéticos indican que los dominios de represión también median las interacciones proteína-proteína y se unen a las proteínas *coreceptoras*, formando un complejo que inhibe la iniciación de la transcripción por mecanismos que se analizan más adelante en el capítulo.

Las interacciones de factores de transcripción incrementan las opciones de control génico

Dos clases de proteínas de unión al DNA analizadas anteriormente, las proteínas con cremallera básica y las proteínas con HBHb, suelen existir en combinaciones heterodiméricas de monómeros. Otras clases de factores de transcripción no analizados aquí también forman proteínas heterodiméricas. En algunos factores de transcripción heterodiméricos, cada monómero reconoce la misma secuencia. En estas proteínas, la formación de heterodímeros alternativos no aumenta la cantidad de diferentes sitios en los cuales pueden actuar los monómeros, sino que en cambio permite que los dominios de activación asociados con cada monómero se reúnan en combinaciones alternativas que se unen al mismo sitio (Fig. 7-31a). Como se verá más adelante, y en los capítulos subsiguientes, las actividades de los factores de transcripción se pueden regular por múltiples mecanismos. En consecuencia, un único elemento regulador de DNA HBHb o bZIP en la región de control de un gen puede provocar diferentes respuestas transcripcionales dependiendo de qué monómeros bZIP o HBHb que se unen a ese sitio se expresen en una célula particular en un momento dado y cómo se regulan sus actividades.

En algunos factores de transcripción heterodiméricos, sin embargo, cada monómero tiene una especificidad de unión al DNA diferente. Las posibilidades combinatorias resultantes aumentan el número de secuencias de DNA potenciales que una familia de factores de transcripción puede unir. En teoría, tres monómeros de factores diferentes se podrían combinar para formar seis factores homodiméricos y heterodiméricos, como se ilustra en la Figura 7-31b. Cuatro monómeros de factores diferentes podrían formar un total de 10 factores diméricos, cinco monómeros, 16 factores diméricos, y así sucesivamente. Además, los factores inhibidores se sabe que se unen a algunas cremalleras básicas y a monómeros de HBHb, bloqueando así su unión al DNA. Cuando estos factores inhibidores se expresan, reprimen la activación transcripcional mediante los factores con los cuales interactúan (Fig. 7-31c). Las reglas que rigen las interacciones de los miembros de una clase de factor de transcripción heterodimérico son complejas. Esta complejidad combinatoria expande tanto el número de sitios del DNA a partir del cual estos factores pueden activar la transcripción y las formas en que pueden ser regulados.

Similar regulación transcripcional combinatoria se logra por medio de las interacciones de factores de transcripción no relacionados unidos a sitios de unión al DNA estrechamente espaciados. Un ejemplo

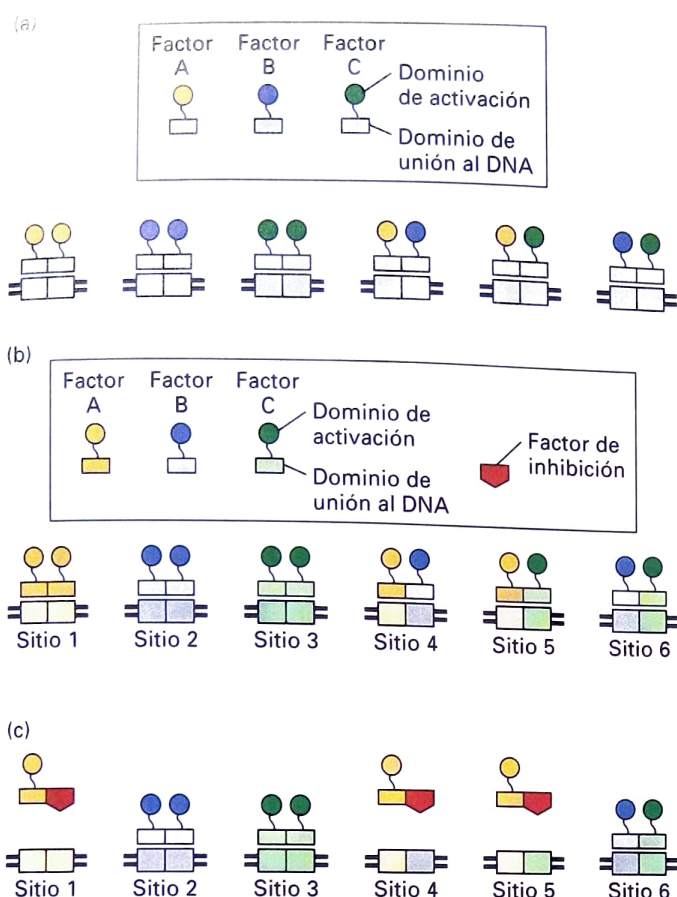


FIGURA 7-31 Posibilidades combinatorias debido a la formación de factores de transcripción heterodiméricos. (a) En algunos factores heterodiméricos, cada monómero reconoce la misma secuencia de DNA. En el ejemplo hipotético mostrado, los factores de transcripción A, B y C pueden todos interactuar unos con otro, creando seis combinaciones alternativas diferentes de dominios de activación que pueden todas unirse al mismo sitio. Cada sitio de unión compuesto está dividido en dos medios sitios y cada factor heterodimérico contiene los dominios de activación de sus dos monómeros constituyentes. (b) Cuando los monómeros de factor de transcripción reconocen secuencias de DNA diferentes, las combinaciones alternativas de los tres factores se unen a seis secuencias de DNA diferentes (sitios 1-6), cada una con una combinación única de dominios de activación. (c) La expresión de un factor inhibidor (rojo) que interactúa solo con el factor A inhibe la unión; por ende, la activación transcripcional en los sitios 1, 4 y 5 está inhibida, pero la activación en los sitios 2, 3 y 6 no está afectada.

es la interacción de dos factores de transcripción, NFAT y AP1, que se unen a sitios vecinos en un elemento proximal al promotor compuesto que regula el gen que codifica la interleucina 2 (*IL-2*). La expresión del gen *IL-2* es crucial para la respuesta inmunitaria, pero la expresión anormal de *IL-2* puede llevar a enfermedades autoinmunitarias como la artritis reumatoide. Ni NFAT ni AP1 se unen a su sitio en la región de control de *IL-2* en ausencia uno de otro. Las afinidades de los factores para estas secuencias de DNA particular son demasiado débiles para los factores individuales para formar un complejo estable con el DNA. Sin embargo, cuando los factores NFAT y AP1 están presentes, las interacciones proteína-proteína entre ellos estabilizan el complejo ternario de DNA compuesto por NFAT, AP1 y DNA (Fig. 7-32a). Tal

unión cooperativa al DNA de varios factores de transcripción da como resultado una complejidad combinatoria del control de la transcripción. En consecuencia, $\approx 2\,000$ factores de transcripción codificados en el genoma humano se pueden unir al DNA por medio de un número mucho más grande de interacciones cooperativas, dando como resultado un control transcripcional único para cada uno de los $\approx 25\,000$ genes humanos. En el caso de *IL-2*, la transcripción se produce solo cuando se activan ambos NFAT, lo que da como resultado su transporte desde el citoplasma hasta el núcleo, y se sintetizan las dos subunidades de AP1.

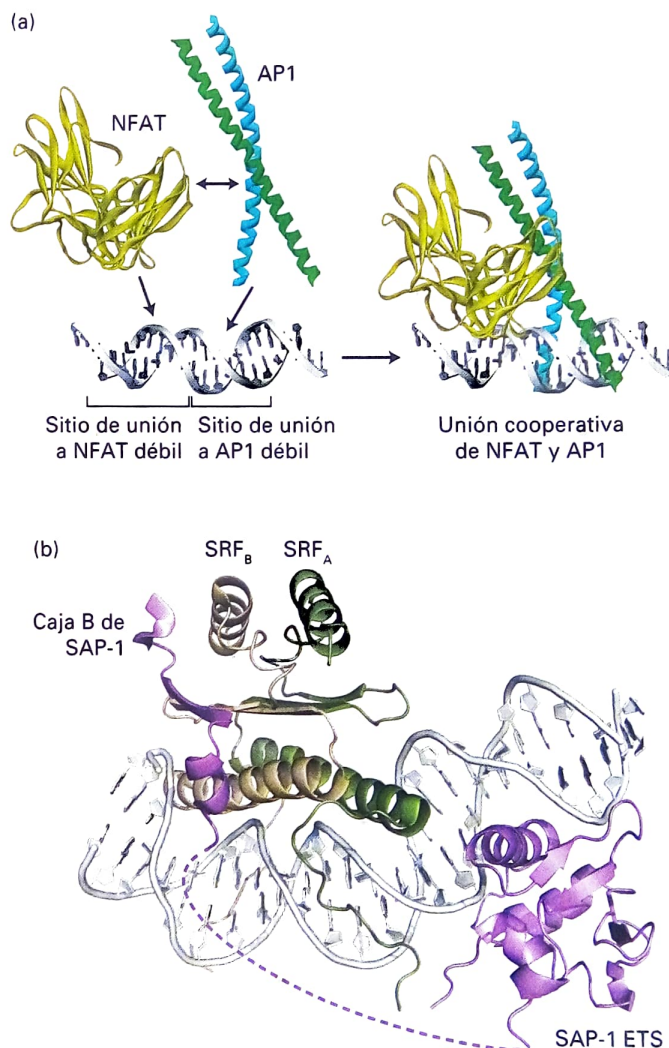


FIGURA 7-32 Unión cooperativa de dos factores de transcripción no relacionados a sitios vecinos en un elemento de control compuesto. (a) Por sí mismos, los factores de transcripción monomérico NFAT y heterodimérico AP1 tienen baja afinidad por sus respectivos sitios de unión en la región proximal al promotor *IL-2*. Las interacciones proteína-proteína entre NFAT y AP1 suman a la estabilidad global del complejo DNA-NFAT-AP1, de manera tal que las dos proteínas se unen al sitio compuesto de manera cooperativa. (b) La unión cooperativa del DNA por el SRF dimérico y el SAP-1 monomérico puede suceder cuando sus sitios de unión están separados por 5 a ≈ 30 pb y cuando el sitio de unión a SAP-1 está invertido debido al dominio caja B de SAP-1 por una región conectora flexible de la cadena polipeptídica de SAP1 (línea de puntos). [(a) Véase L. Chen y cols., 1998, *Nature* **392**:42; (b) véase M. Hassler y T. J. Richmond, 2001, *EMBO J.* **20**:3018.]

Estos acontecimientos están controlados por vías de transducción de la señal distintas (Caps. 15 y 16) y permiten el control riguroso de la expresión de IL-2.

La unión cooperativa de NFAT y AP1 se produce solo cuando sus sitios de unión débiles están posicionados lo bastante cerca entre sí en el DNA. Los sitios deben localizarse a una distancia precisa uno de otro para la unión eficaz. Los requerimientos para la unión cooperativa no son estrictos en el caso de algunos otros factores de transcripción y regiones de control. Por ejemplo, la región de control de EGR-1 contiene un sitio de unión compuesto al cual se unen en forma cooperativa los factores de transcripción SRF y SAP1 (véase la Fig. 7-32b). Debido a que SAP1 tiene un dominio largo y flexible que interactúa con SRF, las dos proteínas pueden unirse de manera cooperativa cuando sus sitios individuales en el DNA están separados por cualquier distancia hasta ≈ 30 pares de bases o están invertidos uno en relación con el otro.

Complejos multiproteicos se forman sobre los potenciadores

Como se mencionó anteriormente, los potenciadores suelen tener una longitud que varía entre 50 y 200 pares de bases e incluyen sitios de unión para diversos factores de transcripción. El análisis de los potenciadores de ≈ 50 pb que regulan la transcripción del interferón β , una proteína importante en defensa contra infecciones virales en los vertebrados, proporciona un buen ejemplo de uno de los pocos hasta el momento de la estructura de los dominios de unión al DNA que se unen a los diversos sitios de unión a factores de transcripción que comprenden un potenciador (Fig. 7-33). El término **potencisoma** se acuñó para describir esos grandes complejo proteína-DNA que se ensamblan a partir de los factores de transcripción a medida que éstos se unen en sus múltiples sitios de unión en un potenciador.

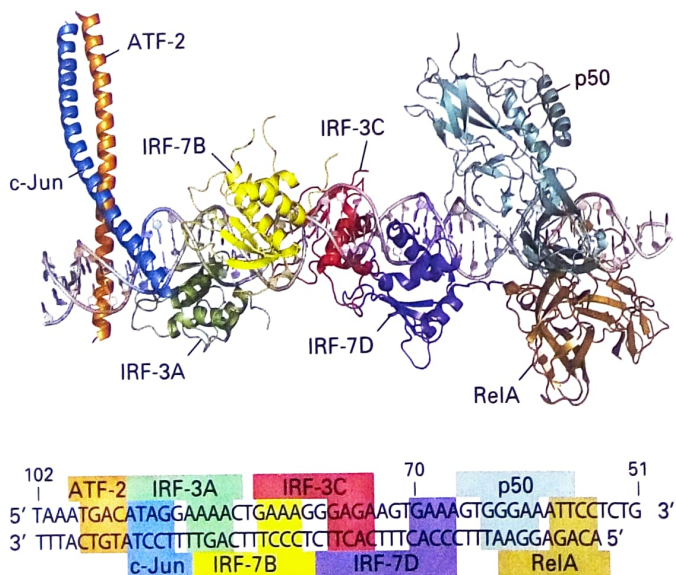


FIGURA 7-33 Modelo del potencisoma que se forma en el potenciador del interferón β . Dos factores heterodiméricos, Jun/ATF-2 y p50/RelA (NF- κ B), y dos copias de cada uno de los factores de transcripción monoméricos IRF-3 e IRF-7 se unen a los seis sitios de unión superpuestos en este potenciador.

[Adaptado de D. Penne, T. Manniatis y S. Harrison, 2007, *Cell* 129:1111.]

Debido a la presencia de regiones flexibles que conectan los dominios de unión al DNA y los dominios de activación y represión en los factores de transcripción (véase la Fig. 7-27) y a la capacidad de las proteínas que interactúan de unirse a sitios distantes para producir vueltas en el DNA entre sus sitios de unión (Fig. 7-4), es admisible una considerable libertad de acción en el espaciado entre los elementos reguladores en las regiones de control de la transcripción. Esta tolerancia para el espaciado entre los sitios de unión para los factores de transcripción regulados y para los sitios de unión a promotores de los factores de transcripción generales y Pol II probablemente haya contribuido a la rápida evolución del control génico en eucariontes. La transposición de las secuencias de DNA y la recombinación entre las secuencias repetidas a lo largo del tiempo evolutivo probablemente crearon nuevas combinaciones de elementos de control que se sometieron a la selección natural y se mantuvieron si probaron ser beneficiosas. La amplitud en el espaciado entre los elementos reguladores probablemente permitió que muchas combinaciones funcionales más hayan sido sometidas a experimentación evolutiva que lo que podría haber sido el caso si las restricciones en el espaciado entre los elementos reguladores fuesen estrictas, como lo es para la mayoría de los genes en las bacterias.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 7.4

Secuencias reguladoras en los genes que codifican proteínas y las proteínas mediante las cuales funcionan

- La expresión de los genes que codifican las proteínas eucariontes en general es regulada por medio de múltiples regiones de control de unión a proteína que se localizan cerca o lejos del sitio de inicio de la transcripción (Fig. 7-22).
- Los promotores dirigen la unión de la RNA polimerasa II al DNA, determinan el sitio de iniciación de la transcripción e influyen en la velocidad de transcripción.
- Se han identificado tres tipos principales de secuencias promotoras en el DNA eucarionte. La caja TATA prevalece en los genes con alta tasa de transcripción. Los promotores iniciadores se encuentran en algunos genes y las islas CpG, los promotores para el 60-70% de los genes que codifican proteínas en los vertebrados, son características de los genes con bajas tasas de transcripción.
- Los elementos proximales al promotor se producen dentro de las ≈ 200 pares de bases de un sitio de inicio. Varios de tales elementos, que contienen $\approx 6-10$ pares de bases, pueden ayudar a regular un gen particular.
- Los potenciadores, que contienen varios elementos de control cortos, pueden ubicarse entre 200 y 10 000 pares de bases corriente arriba o corriente abajo de un promotor, dentro de un intrón, o corriente abajo del exón final del gen.
- Los elementos proximales a los promotores y los potenciadores suelen ser específicos del tipo celular, y funcionan solo en tipos celulares específicamente diferenciados.
- Los factores de transcripción, que estimulan o reprimen la transcripción, se unen a elementos reguladores proximales a promotores y potenciadores en el DNA eucarionte.

- Los activadores y los represores de la transcripción en general son proteínas modulares que contienen un único dominio de unión al DNA y uno o unos pocos dominios de activación (para los activadores) o dominios de represión (para los represores). Los diferentes dominios, con frecuencia están unidos por medio de regiones polipeptídicas flexibles (véase la Fig. 7-27).

- Entre los motivos estructurales más comunes que se encuentran en los dominios de unión al DNA de los factores de transcripción eucariotes se encuentran los dedos de cinc C_2H_2 , homeodominio, hélice-bucle-hélice (HBHb) y cremallera básica (cremallera de leucina). Todos estos y muchos otros motivos de unión al DNA contienen uno o más hélices α que interactúan con los surcos mayores en sus sitios afines en el DNA.

- Los dominios de activación y represión en los factores de transcripción exhiben una variedad de secuencias de aminoácidos y estructuras tridimensionales. En general, estos dominios funcionales interactúan con coactivadores y correpresores, los cuales son críticos para la capacidad de los factores de transcripción de modular la expresión del gen.

- Las regiones de control de la transcripción de la mayoría de los genes contienen los sitios de unión para múltiples factores de transcripción. La transcripción de tales genes varía dependiendo del particular repertorio de los factores de transcripción que son expresados y activados en una célula y en un momento particular.

- La complejidad combinatoria en el control de la transcripción resulta de las combinaciones alternativas de los monómeros que forman los factores de transcripción heterodiméricos (véase la Fig. 7-31) y de la unión cooperativa de los factores de transcripción a los sitios de control compuestos (véase la Fig. 7-32).

- La unión de múltiples activadores a sitios cercanos en un potenciador forma un complejo multiproteína llamado un potenciador (véase la Fig. 7-33).

7.5 Mecanismos moleculares de represión y activación de la transcripción

Los represores y activadores que se unen a sitios específicos en el DNA y regulan la transcripción de los genes que codifican proteínas asociadas lo hacen mediante tres mecanismos generales. Primero, estas proteínas reguladoras actúan en concierto con otras proteínas que modulan la estructura de la cromatina, inhibiendo o estimulando la capacidad de los factores de transcripción generales para unirse a los promotores. Recordar del Capítulo 6 que el DNA en las células eucariotes no está libre sino que está asociado con una masa de proteínas casi igual en forma de cromatina. La unidad estructural básica de la **cromatina** es el **nucleosoma**, compuesto por ≈ 147 pares de bases de DNA enrolladas fuertemente alrededor de un centro con forma de disco de proteínas **histonas**. Los residuos dentro de la región N-terminal de cada histona y las regiones C-terminales de las histonas H2A y H2B, llamadas *colas de histonas*, se extienden desde la superficie del nucleosoma y pueden modificarse reversiblemente (véase la Fig. 6-31b). Tales modificaciones influyen en la condensación relativa de la cromatina y por lo tanto en su accesibilidad para las proteínas necesarias para la iniciación de la transcripción. Además de su función en dicho control de la transcripción

mediante la cromatina, los activadores y los represores interactúan con un complejo multiproteína grande llamado el *mediador del complejo de transcripción*, o simplemente **mediador**. Este complejo a su vez se une a la Pol II y directamente regula el ensamblaje de los complejos de preiniciación de la transcripción. Además, algunos dominios de activación interactúan con las subunidades TFIID-TAF u otros componentes del complejo de preiniciación, las interacciones que contribuyen al ensamblado del complejo de preiniciación. Finalmente, los dominios de activación también pueden interactuar con el factor de elongación P-TEFb (CDK9-ciclina T) y otros factores hasta el momento desconocidos para estimular la elongación de la Pol II lejos de la región promotora.

En esta sección, revisaremos el conocimiento actual de cómo los represores y activadores controlan la estructura de la cromatina y el ensamblado del complejo de preiniciación. En la siguiente sección del capítulo analizaremos cómo las concentraciones y las actividades de los activadores y represores son controladas por ellos mismos, de manera tal que la expresión génica esté en sintonía de manera precisa con las necesidades de la célula y del organismo.

Formación de genes de silenciamiento de la heterocromatina

Durante muchos años, ha quedado claro que los genes inactivos en las células eucariotes suelen estar asociadas con la **heterocromatina**, las regiones de la cromatina que están más altamente condensadas y se tiñen más oscuro con colorantes de DNA que la **euromatina**, donde se localiza la mayoría de los genes (véase la Fig. 6-33a). Las regiones de los cromosomas cerca de los centrómeros y los telómeros y las regiones adicionales específicas que varían en los diferentes tipos de células se organizan en la heterocromatina. El DNA en la heterocromatina es menos accesible a las proteínas añadidas externamente que el DNA en la euromatina y, en consecuencia, suele referirse como cromatina “cerrada”. Por ejemplo, en un experimento descrito en el Capítulo 6, se encontró que el DNA de los genes inactivos es más resistente a la digestión por DNasa I que el DNA de los genes transcritos (véase la Fig. 6-32).

El estudio de las regiones del DNA en *S. cerevisiae* que se comportan como la heterocromatina de los eucariotes superiores proporciona una visión temprana en la *represión mediada por la cromatina* de la transcripción. Esta levadura puede crecer ya sea como células haploides o diploides. Las células haploides presentan uno de los dos tipos de apareamiento posibles, llamados **a** y α . Las células de los diferentes tipos de apareamiento pueden “aparearse”, o fusionarse, para generar una célula diploide. Cuando una célula haploide se divide por gemación, la célula “madre” más grande alterna su tipo de apareamiento. Los análisis genéticos y moleculares revelaron que los tres loci genéticos en el cromosoma III de la levadura controlan el tipo de apareamiento de las células de levadura (Fig. 7-34). Solo el locus de tipo de apareamiento central, llamado **MAT**, se transcribe en forma activa y expresa factores de transcripción, ($a1$, o $\alpha1$ y $\alpha2$) que regulan los genes que controlan el tipo de apareamiento. En una célula dada, una secuencia de DNA ya sea **a** o α se localiza en el **MAT**. Los dos loci adicionales, llamados **HML** y **HMR**, cerca del telómero izquierdo y derecho, respectivamente, contienen copias “silenciosas” (que no se transcriben) de los genes ya sea **a** o α . Estas secuencias se transfieren de manera alternativa a partir de **HML α** o **HMLa** al loci **MAT** por un tipo de recombinación no recíproca entre cromátidas hermanas durante la división celular. Cuando el locus **MAT** contiene la secuencia de DNA del **HML α** , las células se comportan como

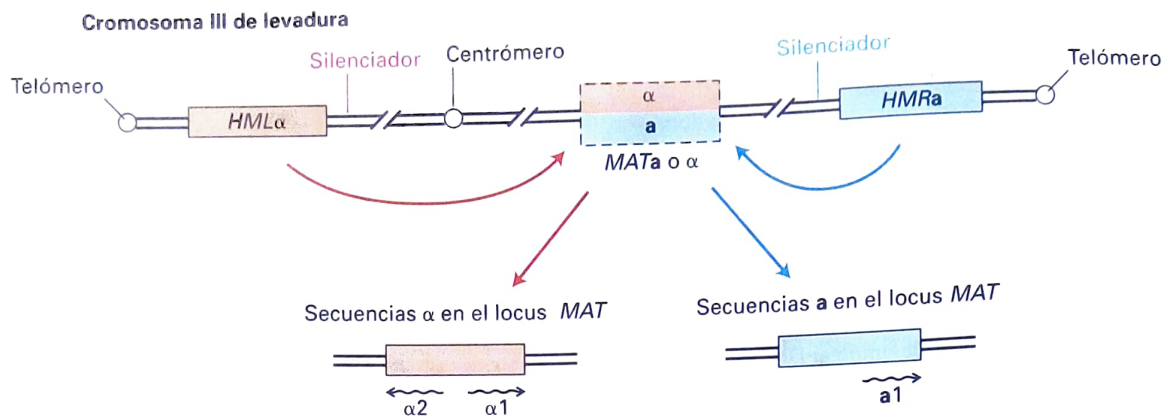


FIGURA 7-34 Reordenamiento en los loci del tipo de apareamiento en el cromosoma III de la levadura *S. cerevisiae*. Los genes del tipo de apareamiento (ya sea *a* o *α*, según la cepa) silenciosos (no se expresan) se localizan en el locus *HML*. El gen del tipo de apareamiento opuesto está presente en el locus *HMR* silencioso. Cuando las secuencias *a* o *α* están presentes en el locus *MAT*, pueden transcribirse a los mRNA cuyas proteínas

codificadas especifican el fenotipo del tipo de apareamiento de la célula. Las secuencias silenciadoras cerca de *HML* y *HMR* unen proteínas que son cruciales para la represión de estos loci silenciosos. Las células haploides pueden cambiar sus tipos de apareamiento en un proceso que transfiere la secuencia de DNA desde *HML* o *HMR* hasta el locus *MAT* transcripcionalmente activo.

células *α*. Cuando el locus *MAT* contiene la secuencia de DNA del *HMRa*, las células se comportan como células *a*.

Nuestro interés aquí es cómo se reprime la transcripción de los loci del tipo de apareamiento silencioso en *HML* y *HMR*. Si los genes en los loci se expresan, como en los mutantes de levadura con defectos en el mecanismo de represión, se expresan tanto las proteínas *a* como *α*, causando que las células se comporten como células diploides, que no se pueden aparear. Los promotores y las UAS que controlan la transcripción de los genes *a* y *α* se encuentran cerca del centro de la secuencia de DNA que es transferido y son idénticas si las secuencias se encuentran en el locus *MAT* o en uno de los loci silenciosos. Esto indica que la función de los factores de transcripción que interactúan con estas secuencias debe de alguna manera ser bloqueada en *HML* y *HMR* pero no en el loci *MAT*. Esta represión de los loci silenciosos depende de las **secuencias silenciadoras** localizadas cerca de la región al DNA transferido a *HML* y *HMR* (Fig. 7-34). Si se elimina el silenciador, el locus adyacente se transcribe. Notablemente, cualquier gen colocado cerca de la secuencia silenciadora del tipo de apareamiento de la levadura mediante técnicas de DNA recombinante es reprimido, o “silenciado”, incluso un gen tRNA transcrito por la RNA polimerasa III, que usa un conjunto diferente de factores de transcripción generales de los que usa la RNA polimerasa II, como se analiza después.

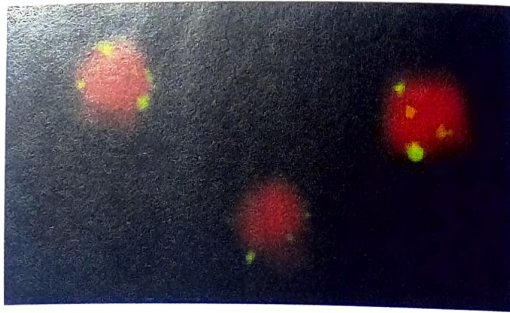
Varias líneas de evidencia indican que la represión de los loci *HML* y *HMR* es el resultado de la estructura condensada de la cromatina que bloquea desde el punto de vista estérico a los factores de transcripción y evita que interactúen con el DNA. En un experimento revelador, el gen que codifica una enzima de *E. coli* que metila los residuos de adenina en las secuencias GATC se introdujo en las células de levadura bajo el control de un promotor de levadura de manera tal que la enzima se expresó. Los investigadores encontraron que las secuencias GATC dentro del locus *MAT* y la mayoría de otras regiones del genoma en estas células estaban metiladas, pero no aquellas dentro de los loci *HML* y *HMR*. Estos resultados indican que el DNA de los loci silenciosos se encuentra inaccesible a la metilasa de *E. coli* y presumiblemente a las proteínas en general, incluidos los factores de transcripción y la RNA polimerasa. De manera similar, los experimentos realizados con varios mutantes de

histona de levaduras indicaron que las interacciones específicas involucran las colas de histonas de H3 y H4 son necesarias para la formación de una estructura de cromatina completamente reprimida. Otros estudios han demostrado que los telómeros de cada cromosoma de levadura también se comporta como las secuencias silenciadoras. Por ejemplo, cuando un gen se coloca a unas pocas kilobases de cualquier telómero de levadura, se reprime su expresión. Además, esta represión es aliviada por las mismas mutaciones en las colas de histonas H3 y H4 que interfieren con represiones en los loci del tipo de apareamiento silencioso.

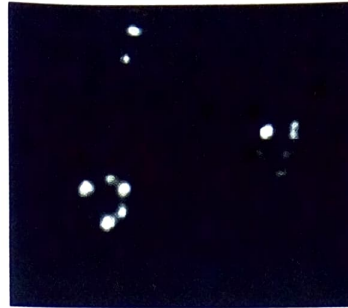
Los estudios genéticos llevan a la identificación de varias proteínas, RAP1 y tres proteínas SIR, que son necesarias para la represión de los loci de tipo de apareamiento silencioso y los telómeros en la levadura. Se encontró que RAP1 se une dentro de las secuencias silenciadoras de DNA asociadas con *HML* y *HMR* y a una secuencia que se repite múltiples veces en cada telómero de cromosomas de levadura. Estudios bioquímicos adicionales demostraron que la proteína SIR2 es una *histona desacetilasa*; elimina los grupos acetilo de las lisinas de las colas de histona. También, las proteínas RAP1 y SIR2, 3 y 4 se unen entre sí, y SIR3 y SIR4 se unen a colas N-terminales de las histonas H3 y H4 que se mantienen en un estado en gran parte desacetilado mediante la actividad desacetilasa de SIR2. Los diversos experimentos que usan microscopía confocal fluorescente de células de levadura, ya sea teñidas con anticuerpos marcados con fluorescencia a cualquiera de las proteínas SIR o RAP1 o hibridadas a una sonda de DNA marcada específica para el telómero, revelaron que estas proteínas forman grandes estructuras nucleoproteicas teloméricas condensadas que se asemejan a la heterocromatina que se encuentra en los eucariontes superiores (Fig. 7-35a, b, c).

La Figura 7-35d describe un modelo de la cromatina que media el silenciamiento en telómeros de levadura sobre la base de éstos y otros estudios. La formación de la heterocromatina en los telómeros está nucleada por múltiples proteínas RAP1 unidas a secuencias repetidas en una región libre de nucleosoma al final del extremo de un telómero. Una red de interacciones proteína-proteína que involucran al telómero unido a RAP1, tres proteínas SIR (2, 3 y 4) y las histonas hipocetiladas

(a) Núcleos y telómeros



(b) Telómeros



(c) Proteína SIR3

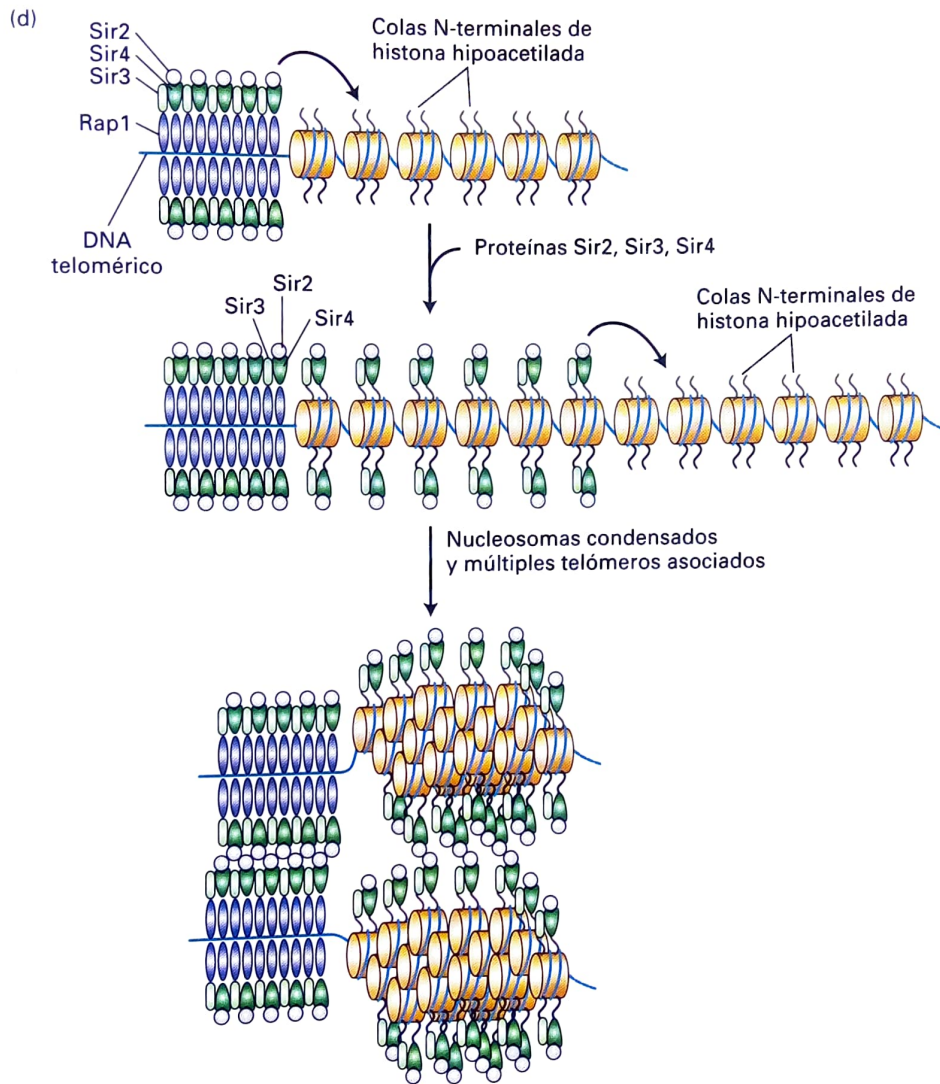


FIGURA EXPERIMENTAL 7-35 Anticuerpos y sondas de DNA colocalizan la proteína SIR3 con la heterocromatina telomérica en núcleos de levadura.

(a) Microfotografía confocal de 0,3 mm de espesor a través de tres células de levadura diploide, cada una conteniendo 68 telómeros. Los telómeros se marcaron mediante hibridación con una sonda fluorescente específica de telómero (amarilla). El DNA se tiñó de rojo para revelar los núcleos. Los 68 telómeros se reúnen en una cantidad de regiones mucho menor cerca de la periferia del núcleo. (b, c) Las microfotografías confocales de las células de levadura con una sonda de hibridación específica de telómero (b) y un anticuerpo marcado con fluorescencia específico para SIR3 (c). Nótese que SIR3 se localiza en la presencia de heterocromatina telomérica reprimida. Experimentos similares con RAP1, SIR2 y SIR4 demostraron que estas proteínas también se colocalizan con la heterocromatina telomérica reprimida. (d) Modelo esquemático del mecanismo de silenciamiento en

telómeros de levadura. (Arriba a la izquierda) Múltiples copias de RAP1 se unen a una secuencia repetida simple en cada región telomérica que carece de nucleosomas. SIR3 y SIR4 se unen a RAP1 y SIR2 se une a SIR4. SIR2 es una histona desacetilasa que desacetila las colas de las histonas vecinas del sitio de unión a RAP1 repetido. (Medio) Las colas de histonas hipoacetiladas también son sitios de unión de SIR3 y SIR4, que a su vez unen SIR2 adicional, desacetilando histonas vecinas. La repetición de este proceso da como resultado la diseminación de la región de las histonas hipoacetiladas con SIR2, SIR3 y SIR4 asociadas. (Abajo) Las interacciones entre los complejos de SIR2, SIR3 y SIR4 causan que la cromatina se condense y diversos telómeros se asocien, como se muestra en a-c. La estructura de cromatina de orden superior generada bloquea estéricamente a otras proteínas de la interacción con el DNA subyacente. [Partes (a)-(c) de M. Gotta y cols., 1996, *J. Cell Biol.* **134**:1349; cortesía de M. Gotta, T. Laroche y S. M. Gasser. Parte (d) adaptado de M. Grunstein, 1997, *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**:383.]

das H3 y H4 crean un complejo nucleoproteico de orden superior que incluye telómeros y en los cuales el DNA es en gran parte inaccesible a las proteínas externas. Una proteína adicional, SIR1, también es necesaria para silenciar los loci del tipo de apareamiento. Se une a las regiones silenciadoras asociadas con *HML* y *HMR* junto con RAP1 y otras proteínas para iniciar el ensamblado de un complejo multiproteico de silenciamiento similar que abarca a *HML* y *HMR*.

Una característica importante de este modelo es la dependencia de la represión de la *hipoacetilación* de las colas de histona. Esto se demostró en los experimentos con mutantes de levadura que expresan histonas en las cuales las lisinas en los extremos N-terminal de histonas se sustituyeron con argininas o glutaminas o glicinas. La arginina está positivamente cargada al igual que la lisina pero no puede ser acetilada. La glutamina, por otro lado, es neutral y estimula la carga neutral de la lisina acetilada, y la glicina, sin cadena lateral, también imita la ausencia de una lisina cargada positivamente. La represión en los telómeros y en los loci del tipo de apareamiento fue defectuosa en los mutantes con sustituciones de glutamina y glicina pero no en mutantes con sustituciones de arginina. Además, la acetilación de las lisinas de H3 y H4 interfiere con la unión por parte de SIR3 y SIR4 y, por consiguiente, evita la represión en los loci de silenciamiento y los telómeros. Finalmente, los experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina (Fig. 7-16a) usando anticuerpos específicos para las lisinas acetiladas en posiciones particulares en las colas N-terminal de histona (Fig. 6-31a) confirmaron que las histonas en las regiones reprimidas cerca de los telómeros y en los loci de apareamiento silencioso están hipoacetiladas, pero se tornan hiperacetiladas en los mutantes *sir* cuando los genes en estas regiones no están reprimidos.

Los represores pueden dirigir la desacetilación en genes específicos

La importancia de la *desacetilación de histonas* en la represión de genes mediada por la cromatina fue posteriormente avalada por estudios de los represores de eucariontes que regulan genes en las posiciones cromosómicas internas. Estas proteínas se sabe que actúan en parte al causar la desacetilación de las colas de histona en los nucleosomas que se unen a la caja TATA y la región proximal al promotor de los genes que estos reprimen. Los estudios in vitro han demostrado que cuando el DNA de los promotores está ensamblado en un nucleosoma con histonas desacetiladas, los factores de transcripción generales no pueden unirse a la caja TATA y a la región de iniciación. En las histonas desacetiladas, las lisinas N-terminales están cargadas positivamente y pueden interactuar con los fosfatos del DNA. Las colas de histonas desacetiladas también interactúan con los octámeros de histonas vecinas y otras proteínas asociadas con la cromatina, lo que favorece el plegamiento de la cromatina en estructuras de orden superior condensadas cuyas conformaciones precisas no se comprenden bien. El efecto neto es que los factores de transcripción generales no pueden ensamblarse en un complejo de preiniciación en un promotor asociado con las histonas hipoacetiladas. Por el contrario, la unión de los factores de transcripción generales está mucho menos reprimida por las histonas con colas hiperacetiladas en las cuales las lisinas positivamente cargadas están neutralizadas y se eliminan las interacciones electrostáticas.

Las conexiones entre la desacetilación de histonas y la represión de la transcripción en promotores de levadura específicas se hizo

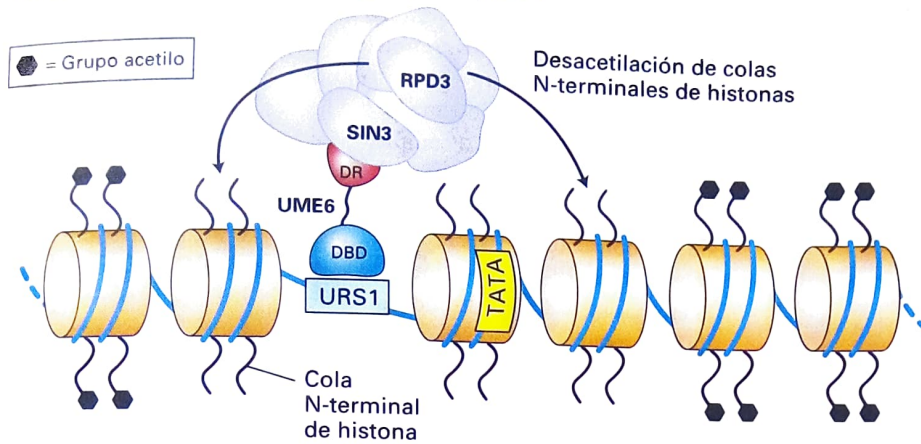
más clara cuando se encontró que el cDNA que codifica una *histona desacetilasa* humana tenía una homología alta con el gen *RPD3* de levadura, que se sabe necesario para la represión normal de una cantidad de genes de levadura. Trabajos posteriores demostraron que la proteína RPD3 tiene actividad histona desacetilasa. La capacidad de la RPD3 para desacetilar histonas en un número de promotores depende de otras dos proteínas: UME6, un represor que se une a su secuencia reguladora específica corriente arriba (URS1), y SIN3, que es parte de un complejo multiproteico grande que también contiene RPD3. SIN3 también se une al dominio de represión de UME6, posicionando así a la histona desacetilasa RPD3 en el complejo, de manera tal que pueda interactuar con los nucleosomas asociados con proteínas cercanas y eliminar los grupos acetilos de las lisinas de las colas de histonas. Experimentos adicionales, usando la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina esquematizada en la Figura 7-16a y los anticuerpos contra histonas con lisinas acetiladas demostraron que en levaduras de tipo silvestre, uno o dos nucleosomas en la vecindad inmediata de los sitios de unión de UME6 están hipoacetilados. Estas regiones de DNA incluyen los promotores de los genes reprimidos por UME6. En los mutantes por delección de *sin3* y *rdp3*, estos promotores no solo estaban desreprimidos, sino que los nucleosomas cerca de los sitios de unión de UME6 estaban hiperacetilados.

Todos estos hallazgos avalan en gran medida el modelo de desacetilación dirigido por represor demostrado en la Figura 7-36a. El complejo SIN3-RPD3 funciona como un correpresor. Los complejos de correpresor que contienen histonas desacetilasas también se han encontrado asociados con muchos represores de las células de mamífero. Algunos de estos complejos contienen el homólogo de mamífero de SIN3 (mSin3), que interactúa con el dominio de represión de los represores, como en la levadura. Otros complejos de histonas desacetilasas identificaron que las células de mamífero parecen contener proteínas de unión al dominio de represión diferentes o adicionales. Estos diversos represores y las combinaciones de los correpresores median la desacetilación de histonas en promotores específicos por un mecanismo similar al de la levadura (véase la Fig. 7-36a). Además de la represión por medio de la formación de las estructuras de cromatina “cerrada”, algunos dominios de represión también inhiben el ensamblado de los complejos de preiniciación en los experimentos in vitro con factores de transcripción generales purificados en ausencia de histonas. Esta actividad probablemente también contribuya a la represión de la transcripción mediante estos dominios de represión in vivo.

Los activadores pueden dirigir la acetilación de histonas en genes específicos

Al igual que los represores funcionan mediante los correpresores que se unen a sus dominios de represión, los dominios de activación de los activadores que se unen al DNA funcionan mediante la unión de complejos multisubunidades de *coactivadores*. Uno de los primeros complejos coactivadores en ser caracterizados fue el complejo SAGA de levadura, que funciona con la proteína activadora GCN4 descrita en la Sección 7.4. Los primeros estudios genéticos indicaron que la actividad completa de los activadores GCN4 requiere de una proteína llamada GCN5. La pista de la función de GCN5 provino de los estudios bioquímicos de una *histona acetilasa* purificada a partir del protozoo *Tetrahymena*, la primera histona acetilasa en ser purificada. Los análisis de secuencia revelaron la homología entre la proteína de

(a) Desacetilación de histona dirigida por represor



(b) Hiperacetilación de histona dirigida por activador

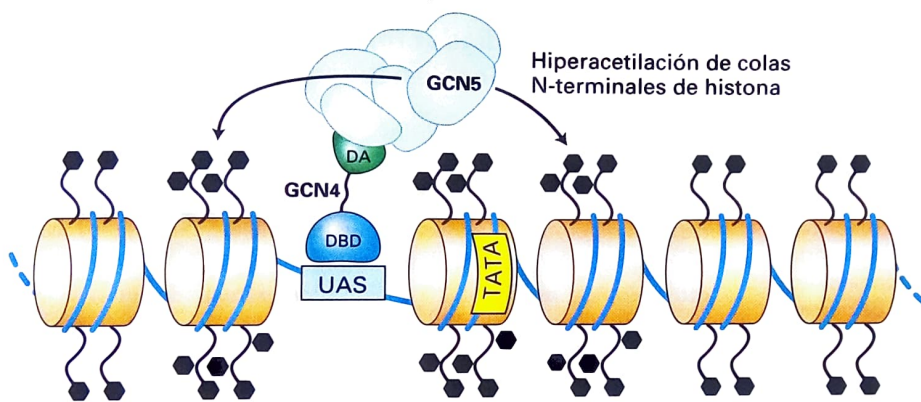


FIGURA 7-36 Mecanismo propuesto de la desacetilación de histonas y la hiperacetilación en el control de la transcripción de la levadura. (a)

Desacetilación de las colas N-terminales de histonas dirigida por represor. El dominio de unión al DNA (DBD) del represor UME6 interactúa con un elemento de control específico corriente arriba de los genes que regula. El dominio de represión (DR) se une a SIN3, una subunidad de un complejo multiproteína que incluye a RPD3, una histona desacetilasa. La desacetilación de las colas N-terminales de histonas en los nucleosomas en la región del sitio de unión a UME6 inhibe la unión de los factores de transcripción generales a la caja TATA, y reprimen así la expresión génica. (b) Hiperacetilación dirigida por activador de las colas N-terminales de histonas. El dominio de unión al DNA del activador GCN4 interactúa con secuencias de activación corriente arriba (UAS) específicas de los genes que regula. El dominio de activación (DA) de GCN4 luego interactúa con un complejo multiproteína histona acetilasa que incluye a la subunidad catalítica GCN5. La hiperacetilación posterior de las colas N-terminales de las histonas en los nucleosomas en la vecindad del sitio de unión a GCN4 facilita el acceso a los factores de transcripción generales necesarios para la iniciación. La represión y la activación de muchos genes en los eucariontes superiores se producen por mecanismos similares.

Tetrahymena y GCN5 de la levadura, que pronto demostró también tener actividad histona acetilasa. Estudios bioquímicos y genéticos adicionales revelaron que GCN5 es una subunidad de un complejo multiproteico coactivador, llamado el complejo SAGA después de identificar genes que codifican algunas subunidades. Otra subunidad de este complejo histona acetilasa se une a los dominios de activación en las múltiples proteínas activadoras de la levadura, incluida GCN4. El modelo que se muestra en la Figura 7-36b es coherente con la observación de que los nucleosomas cercanos a la región promotora de un gen regulado por el activador GCN4 son hiperacetilados específicamente, en comparación con la mayoría de las histonas en las células. Esta hiperacetilación dirigida por activador de los nucleosomas cercanos a la región promotora abre la estructura de la cromatina para facilitar de esta manera la unión de otras proteínas necesarias para la iniciación de la transcripción. La estructura de la cromatina está menos condensada en comparación con la mayoría de la cromatina, como lo indica su sensibilidad a la digestión con nucleasas en los núcleos aislados.

Además de la conducción de la descondensación de la cromatina, la acetilación de lisinas específicas de histonas genera los sitios de unión para las proteínas con *bromodominios* que se unen a ellos. Por ejemplo, una subunidad del factor de transcripción general TFIID contiene dos bromodominios que se unen a los nucleosomas acetilados con alta afinidad. Recuerdese que TFIID se une al promotor para iniciar el en-

samblado de un complejo de preiniciación de la RNA polimerasa II (véase la Fig. 7-17). Los nucleosomas en las regiones promotoras de virtualmente todos los genes activos están hiperacetilados.

Un mecanismo de activación similar funciona en los eucariontes superiores. Las células de mamífero contienen complejos multisubunidades de histonas acetilasa coactivador homólogos al complejo SAGA de la levadura. Éstos también expresan dos proteínas multidomínios de ≈ 300 kDa llamadas *CBP* y *P300*, que funcionan de manera similar. Como se mencionó anteriormente, un dominio de CBP se une al dominio de activación ácido en el factor de transcripción CREB. Otros dominios de CBP interactúan con diferentes dominios de activación en otros activadores. Sin embargo, otro dominio de CBP tiene actividad histona acetilasa y otro dominio CBP se asocia con complejos multisubunidades histona acetilasa adicionales. CREB y muchos otros activadores de mamíferos funcionan en parte por la dirección de CBP y el complejo histona acetilasa asociado con los nucleosomas específicos, donde acetilan las colas de histona, y facilitan la interacción de los factores de transcripción generales con DNA de promotor.

Los factores de remodelación de la cromatina contribuyen a activar o a reprimir la transcripción

Además de los complejos de histona acetilasa, los complejos multiproteína de remodelación de la cromatina también son necesarios para la

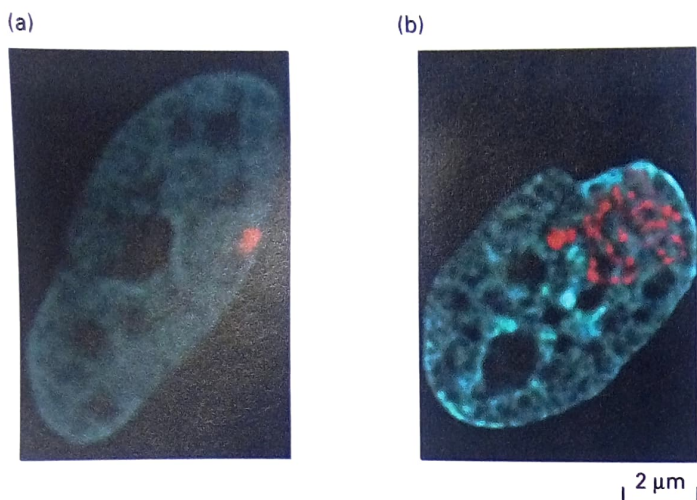


FIGURA 7-37 La expresión de proteínas de fusión demuestra la descondensación en respuesta a un dominio de activación. Mediante ingeniería genética se diseñó una línea celular de hámster cultivada para que contenga múltiples copias de un arreglo en tándem de las secuencias operadoras lac de *E. coli* integradas en un cromosoma en una región de heterocromatina. (a) Cuando un vector de expresión para el represor lac se transfirió a estas células, los represores lac unidos a los sitios operadores se podían visualizar en una región de la cromatina condensada usando un anticuerpo contra el represor lac (rojo). El DNA se visualizó mediante tinción con DAPI (azul), revelando el núcleo. (b) Cuando un vector de expresión para el represor lac fusionado a un dominio de activación fue transfectedo a estas células, la tinción como en (a) reveló que el dominio de activación causa que esta región de la cromatina se descondense y se forme una fibra de cromatina más delgada que ocupa un volumen mucho más grande del núcleo. [Cortesía de Andrew S. Belmont, 1999, *J. Cell Biol.* **145**:1341.]

activación de muchos promotores. El primero de éstos caracterizados fue el complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF de levadura. Una de las subunidades SWI/SNF tiene homología con las DNA helicasas, enzimas que utilizan energía de la hidrólisis de ATP para interrumpir interacciones entre ácidos nucleicos con apareamientos de bases o entre ácidos nucleicos y proteínas. In vitro, se piensa que el complejo SWI/SNF impulsa o presiona el DNA en los nucleosomas de manera tal de que el DNA unido a la superficie del octámero de histona se disocia transitoriamente de la superficie y se trasloca, provocando que los nucleosomas se “deslicen” a lo largo del DNA. El resultado neto de tal remodelación de la cromatina es la de facilitar la unión de los factores de transcripción a secuencias de DNA específicas en la cromatina. Muchos dominios de activación se unen a los complejos de remodelación de la cromatina, y esta unión estimula la transcripción in vitro a partir de los moldes de la cromatina (DNA unido a los nucleosomas). Por lo tanto, el complejo SWI/SNF representa otro tipo de complejo coactivador. El experimento que se muestra en la Figura 7-37 demuestra radicalmente cómo un dominio de activación puede causar la descondensación de una región de la cromatina. Esto resulta de la asociación del dominio de activación con los complejos de histona acetilasa y de remodelación de la cromatina.

Los complejos de remodelación de la cromatina son necesarios para muchos de los procesos que involucran el DNA en las células eucariontes, incluido el control de la transcripción, la replicación del DNA, la recombinación y la reparación del DNA. En las células eucariotas se encuentran diversos tipos de complejos de remodelación de la cromatina, todos con dominios homólogos a la DNA helicasa. Los complejos SWI/SNF y los complejos de remodelación de la cromatina relacionados en los organismos multicelulares contienen subunidades con bromodominios que se unen a las colas de histona acetiladas. En consecuencia, los complejos SWI/SNF permanecen asociados con regiones acetiladas activadas de la cromatina, presumiblemente manteniéndola en una conformación descondensada. Los complejos de remodelación de la cromatina pueden también participar en la represión de la transcripción. Estos complejos de remodelación de la cromatina se unen a los dominios de represión de la transcripción de los represores y contribuyen a la represión, presumiblemente mediante el plegamiento de la cromatina en estructuras condensadas. Queda mucho por aprender acerca de cómo esta clase importante de proteínas altera la estructura de la cromatina para influir en la expresión génica y en otros procesos.

El complejo mediador forma un puente molecular entre los dominios de activación y la Pol II

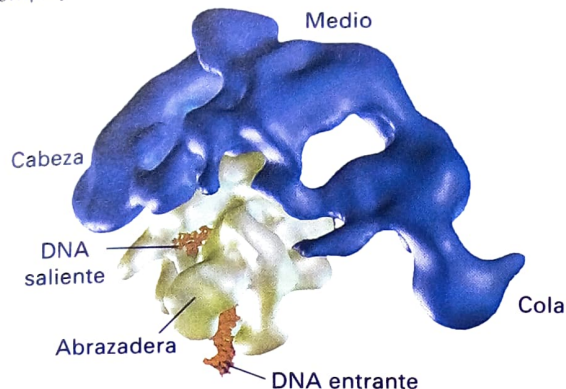
El complejo mediador forma un puente molecular entre los dominios de activación y la Pol II

Una vez que la interacción de los dominios de activación con los complejos de histona acetilasa y los complejos de remodelación de la cromatina convierten la cromatina de una región promotora en una estructura de cromatina “abierta” que permite la unión de los factores generales de transcripción, los dominios de activación interactúan con otro complejo multiproteína coactivador, el **mediador** (Fig. 7-38). La activación de las interacciones dominio-mediador estimulan el ensamblado del complejo de preiniciación en el promotor. Se ha propuesto que los dominios cabeza e intermedio del complejo mediador interactúan directamente con las subunidades RBP3, 4, 7 y 11 de Pol II. Diversas subunidades del mediador se unen a los dominios de activación en varias proteínas activadoras. Por lo tanto, el mediador puede formar un puente molecular entre un activador unido a su sitio afin en el DNA y la Pol II en un promotor.

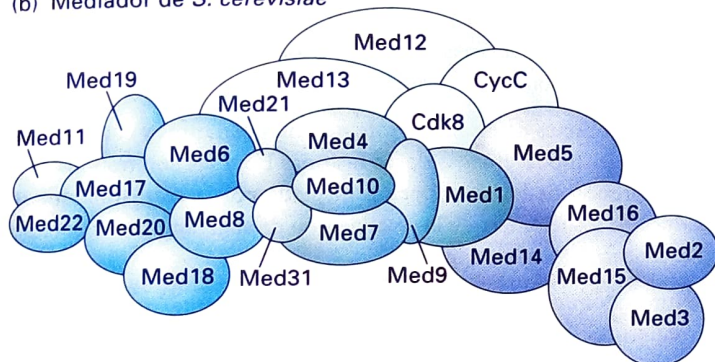
Los experimentos con mutantes de levadura sensibles a la temperatura indican que algunas subunidades del mediador son necesarias para la transcripción de prácticamente todos los genes de la levadura. Estas subunidades muy probablemente contribuyan a mantener la estructura global del complejo mediador o unirse a Pol II y, por lo tanto, son necesarias para la activación por parte de todos los activadores. Por el contrario, otras subunidades del mediador son necesarias para la activación o la represión normal de subgrupos específicos de genes. Los análisis de micromatrices de DNA de expresión génica de la levadura en mutantes con defectos en estas subunidades mediadoras indican que cada una de tales subunidades influye en la transcripción de $\approx 3-10\%$ de todos los genes, en la medida que su delección incrementa o disminuya la expresión de mRNA por un factor de dos o más (véase la Fig. 5-29 para la técnica de micromatrices de DNA). Se cree que estas subunidades mediadoras interactúan con los dominios de activación; por ende, cuando una subunidad es defectuosa, la transcripción de los genes regulados por los activadores que se unen a esa subunidad intensamente disminuida, pero la transcripción de otros genes no se ve afectada. Estudios recientes sugieren que la mayoría de los dominios de activación pueden interactuar con más de una subunidad de mediador.

Los diversos resultados experimentales que indican que las subunidades del mediador se unen a dominios de activación específicos sugieren que múltiples activadores influyen en la transcripción a par-

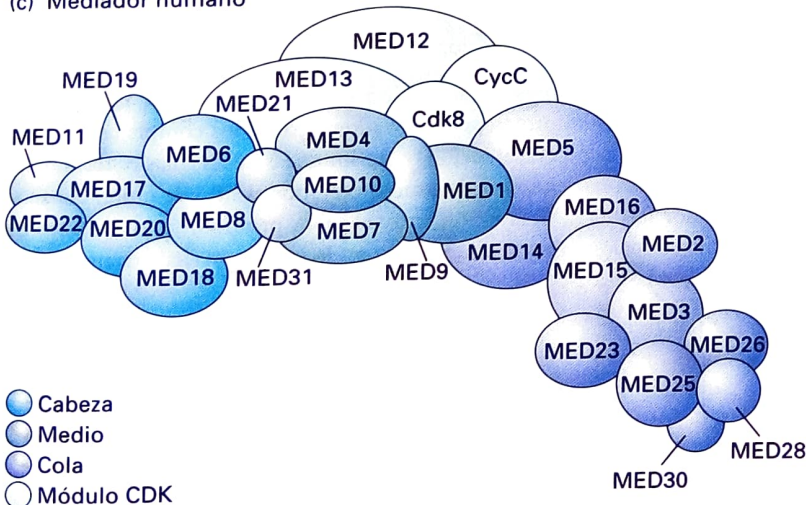
(a) Complejo mediador de Pol II de levadura



(b) Mediador de *S. cerevisiae*



(c) Mediador humano



● Cabeza
● Medio
● Cola
○ Módulo CDK

FIGURA 7-38 Estructura de los complejos mediadores humanos y de levadura.

(a) Imagen reconstruida del mediador de *S. cerevisiae* unida a Pol II. Múltiples imágenes de microscopía electrónica se alinearon y se procesaron por computadora para producir esta imagen promedio en la cual la estructura tridimensional de Pol II (anaranjado claro) se muestra asociada con el complejo mediador de levadura (azul). (b) Representación en diagrama de las subunidades mediadoras de *S. cerevisiae*. Las subunidades que se muestran del mismo color se cree que forman un módulo. Las mutaciones en una subunidad de un módulo pueden inhibir la asociación de otras subunidades en el mismo módulo con el resto del complejo. (c) Representación de las subunidades mediadoras humanas. [Parte (a), de S. Hahn, 2004, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**:394, basada en J. Davis y cols., 2002, *Mol. Cell* **10**:409. Parte (b), de B. Guglielmi y cols., 2004, *Nucl. Acids Res.* **32**:5379. Parte (c), adaptado de S. Malik y R. G. Roeder, 2010, *Nat. Rev. Genet.* **11**:761. Véase H. M. Bourbon, 2008, *Nucl. Acids Res.* **36**:3993.]

tir de un único promotor mediante la interacción con un complejo mediador de manera simultánea (Fig. 7-39). Los activadores unidos a los potenciadores o a los elementos proximales a los promotores pueden interactuar con los mediadores asociados con un promotor debido a que la cromatina, al igual que el DNA, es flexible y puede formar un bucle que junta muy cercanamente las regiones reguladoras y el promotor, como se observó para el activador NtrC de *E. coli* y la RNA polimerasa σ^{54} (véase la Fig. 7-4). Los complejos multiproteína nucleoproteicos que se forman sobre los promotores eucariontes pueden abarcar tanto como 100 polipéptidos con una masa total de ≈ 3 megadaltons (MDa), tan grande como un ribosoma.

Sistema de doble híbrido de levadura

Un poderoso método genético molecular llamado el *sistema de doble híbrido de levadura* explota la flexibilidad en las estructuras de los activadores para identificar genes cuyos productos se unen a proteínas específicas de interés. Debido a la importancia de las interacciones proteína-proteína en prácticamente cada proceso biológico, el sistema de doble híbrido de levadura se utiliza ampliamente en la investigación biológica.

Este método utiliza un vector de levadura para la expresión de un dominio de unión al DNA y una región conectora flexible sin los dominios de activación asociados, como el GAL4 suprimido que contiene

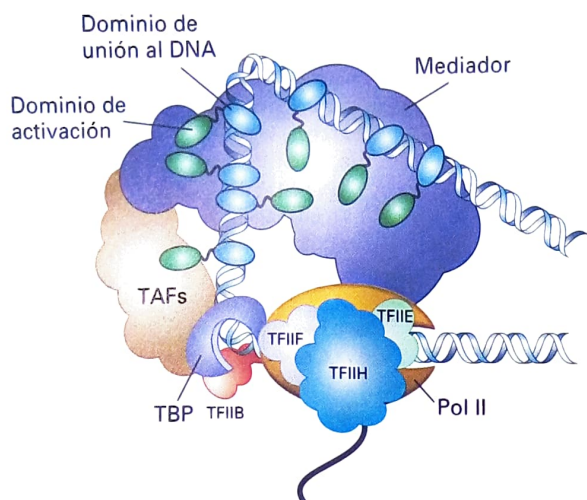


FIGURA 7-39 Modelo de varios activadores unidos al DNA que interactúan con un único complejo mediador. La capacidad de diferentes subunidades del mediador para interactuar con dominios de activación específicos puede contribuir a la integración de señales de diversos activadores en un único promotor. Para más detalles véase el texto.

los aminoácidos 1-692 (véase la Fig. 7-26b). Una secuencia de cDNA que codifica una proteína o un dominio de interés de la proteína, llamado el dominio cebo, se fusiona, manteniendo el marco de lectura, a una región conectora flexible de manera tal que el vector expresará una proteína híbrida compuesta del dominio de unión al DNA, la región conectora, y el *dominio cebo* (Fig. 7-40a, izquierda). Se clona una biblioteca de cDNA en múltiples copias de un segundo vector de levadura que codifica un dominio de activación fuerte y un conector flexible para producir una biblioteca de vectores que expresan múltiples proteínas híbridas, cada una conteniendo un *dominio pez* diferente (Fig. 7-40a, derecha).

El vector cebo y la genoteca de vectores pez se transfectan luego a células de levadura genéticamente modificadas, en las cuales la única copia de un gen necesario para la síntesis de histidina (*HIS*) está bajo control de una UAS con sitios de unión para el dominio de unión al DNA de la proteína cebo híbrida. La transcripción del gen *HIS* requiere la activación por parte de las proteínas unidas a la UAS. Las células transformadas que expresan al híbrido cebo y un híbrido pez *interactuante* serán capaces de activar la transcripción del gen *HIS* (Fig. 7-40b). Este sistema funciona debido a la flexibilidad en el espaciamiento entre los dominios de unión al DNA y los dominios de activación de los activadores eucariontes.

Se utiliza un proceso de selección de dos pasos (Fig. 7-40c). El vector cebo también expresa un gen *TRP* de tipo silvestre y el vector híbrido expresa un gen *LEU* de tipos silvestre. Las células transfectadas primero se cultivan en un medio que carece de triptófano y leucina pero que contiene histidina. Solo las células que han incorporado el vector cebo y uno de los plásmidos pez sobrevivirán en este medio. Luego, las células que sobreviven son cultivadas en un medio que carece de histidina. Aquellas células que expresan un híbrido pez que no se une al híbrido cebo transcriben el gen *HIS* y, en consecuencia, no formarán una colonia en un medio que carece de histidina. Las pocas células que expresan un híbrido pez de unión a cebo crecerán y formarán colonias en la ausencia de histidina. La recuperación de los vectores pez a partir

de estas colonias producirá cDNA que codifican dominios de proteína que interactúan con el dominio cebo.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 7.5

Mecanismos moleculares de represión y activación de la transcripción

- Los activadores y los represores de la transcripción eucarionte ejercen sus efectos en gran medida al unirse a las multisubunidades de los coactivadores y correpresores que influyen el ensamblaje de los complejos de preiniciación de la transcripción Pol II, ya sea al modular la estructura de la cromatina (efecto indirecto) o al interactuar con Pol II y los factores de transcripción generales (efecto directo).
- El DNA en las regiones condensadas de la cromatina (heterocromatina) es relativamente inaccesible a los factores de transcripción y otras proteínas, por lo tanto la expresión génica está reprimida.
- Las interacciones de diversas proteínas unas con otras y con las colas N-terminales hipoacetiladas de las histonas H3 y H4 son responsables de la represión de la transcripción mediada por la cromatina que se produce en los télómeros y los loci de tipo de apareamiento silencioso en *S. cerevisiae* (véase la Fig. 7-35).
- Algunos dominios de represión funcionan mediante interacción con correpresores que son complejos de histonas desacetilasas. La desacetilación subsecuente de las colas N-terminales de las histonas en los nucleosomas cercanos al sitio de unión del represor inhibe la interacción entre el DNA promotor y los factores de transcripción generales, reprimiendo así la iniciación de la transcripción (véase la Fig. 7-36a).
- Algunos dominios de activación funcionan mediante la unión de complejos multiproteicos coactivadores como los complejos histonas acetilasas. La hiperacetilación posterior de las colas N-terminales de las histonas en los nucleosomas cercanos al sitio de unión del activador facilita la interacción entre el DNA promotor y los factores de transcripción generales, activando así la iniciación de la transcripción (véase la Fig. 7-36b).
- Los factores SWI/SNF de remodelación de la cromatina constituyen otro tipo de coactivador. Estos complejos multisubunidades pueden disociar transitoriamente el DNA del núcleo de histonas en una reacción dependiente de ATP y pueden también descondensar regiones de la cromatina, lo que promueve la unión de las proteínas de unión al DNA necesarias para que se produzca la iniciación en algunos promotores.
- El mediador, otro tipo de coactivador, es un complejo de ≈ 30 subunidades que forma un puente molecular entre los dominios de activación y la RNA polimerasa II mediante unión directa a la polimerasa y a los dominios de activación. Mediante la unión a diferentes activadores simultáneamente, el mediador probablemente contribuya a integrar los efectos de múltiples activadores sobre un promotor único (véase la Fig. 7-39).
- Los activadores unidos a un potenciador distante pueden interactuar con los factores de transcripción unidos a un promotor debido a que el DNA es flexible y el DNA interviniente puede formar un bucle grande.
- El ensamblaje altamente cooperativo del complejo de preiniciación in vivo en general requiere diversos activadores. Una célula debe producir

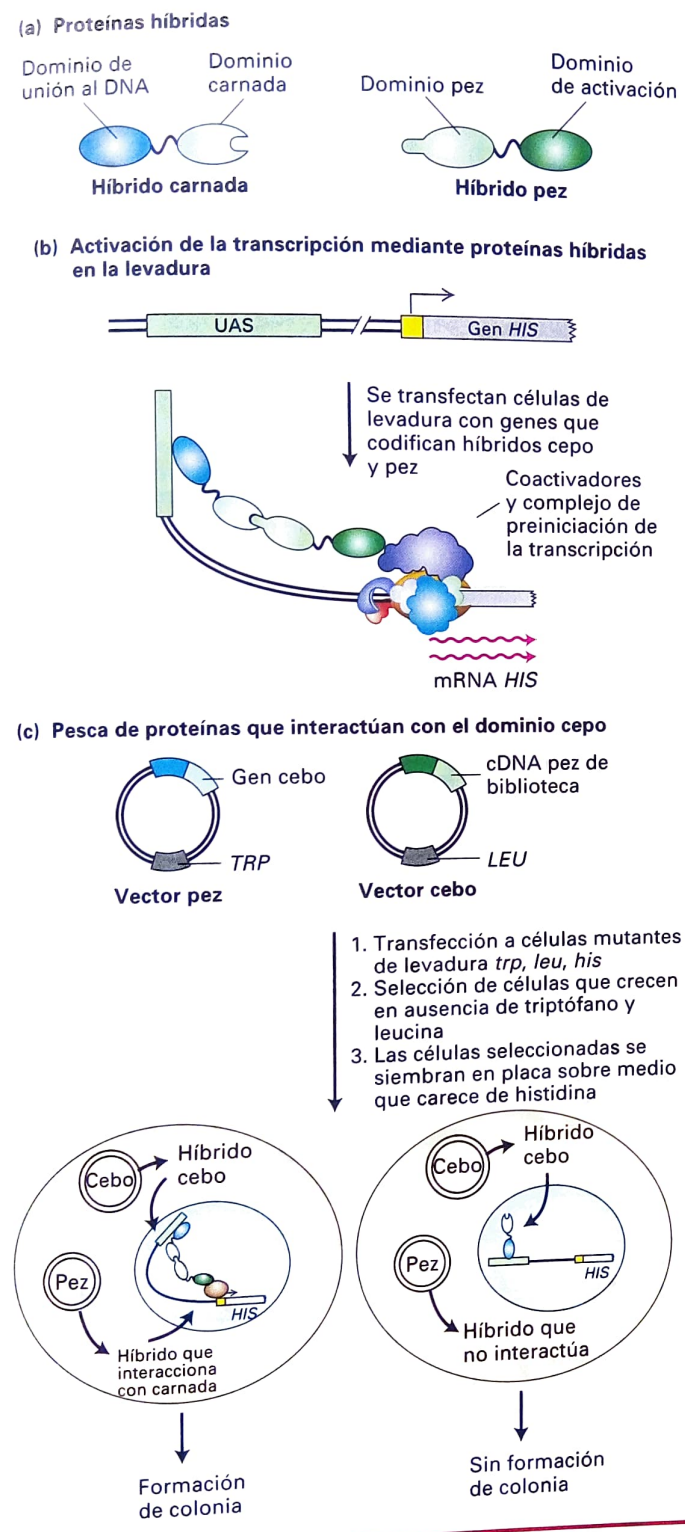


FIGURA EXPERIMENTAL 7-40 El sistema de doble híbrido de levadura proporciona una forma de efectuar una detección sistemática en una biblioteca de cDNA en busca de clones que codifican proteínas que interactúan con una proteína específica de interés. (a) Se construyen dos vectores que contienen genes que codifican proteínas híbridas (químéricas). En un vector (*izquierda*), la secuencia codificante para el dominio de unión al DNA de un factor de transición se fusiona a las secuencias para una proteína conocida, referida como dominio “cebo” (celeste). El segundo vector (*derecha*) expresa un dominio de activación fusionado a un dominio “pez” (verde) que interactúa con el dominio cebo. (b) Si las células de levadura se transforman con vectores que expresan ambos híbridos, las porciones cebo y pez de las proteínas químéricas interactúan para producir un activador transcripcional funcional. En este ejemplo, el activador estimula la transcripción de un gen *HIS*. Uno de los extremos de este complejo proteico se une a la secuencia de activación corriente arriba (UAS) del gen *HIS3*; el otro extremo, que consiste en el dominio de activación, estimula el ensamblaje del complejo de preiniciación de la transcripción en el promotor (amarillo). (c) Para realizar la búsqueda de clones que codifican proteínas que interactúan con una proteína cebo particular de interés en una biblioteca de cDNA, la biblioteca se clona en el vector que codifica el dominio de activación, de manera tal que se expresen las proteínas híbridas. El vector cebo y los vectores pez contienen genes seleccionables de tipo silvestre (p. ej., un gen *TRP* o *LEU*). Las únicas células transformadas que sobreviven al esquema de selección indicado son aquellas que expresan el híbrido cebo y un híbrido pez que interactúa con él. Para más detalles véase el texto. [Véase S. Fields y O. Song, 1989 *Nature* **340**:245.]

7.6 Regulación de la actividad de los factores de transcripción

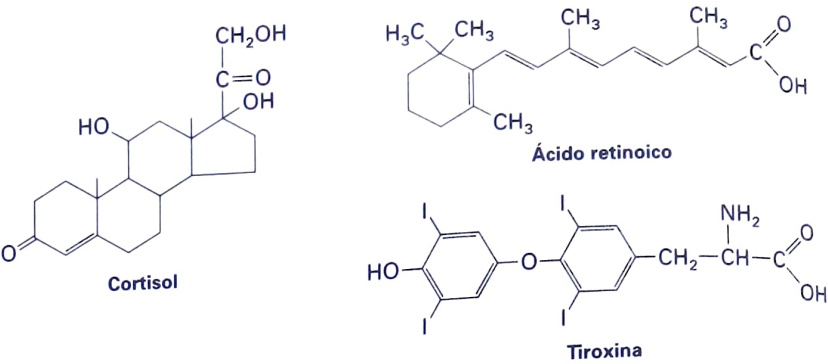
En el análisis anterior hemos visto cómo combinaciones de activadores y represores que se unen a secuencias reguladoras específicas de DNA controlan la transcripción de genes eucariontes. Si un gen específico o no en un organismo particular se expresa en una célula particular en un momento dado es en gran parte una consecuencia de las concentraciones y las actividades de los factores de transcripción que interactúan con las secuencias reguladoras de ese gen. (Las excepciones se deben a la “memoria transcripcional” de las funciones de los activadores y los represores expresados en las células embrionarias a partir de las cuales la célula ha descendido como resultado de mecanismos *epigenéticos* analizados en la siguiente sección). Cuáles factores de transcripción son expresados en un tipo celular particular, y las cantidades producidas, están determinadas por múltiples interacciones reguladoras entre genes de factores de transcripción que se producen durante el desarrollo y la diferenciación de un tipo de célula particular.

Además de controlar la expresión de miles de factores de transcripción específicos, las células también regulan las actividades de muchos de los factores de transcripción expresados en un tipo de célula particular. Por ejemplo, los factores de transcripción suelen estar regulados en respuesta a señales extracelulares. Las interacciones entre los dominios extracelulares de las proteínas receptoras transmembrana sobre la superficie de la célula y ligandos proteicos específicos para estos receptores activan los dominios de proteína asociados con los dominios intracelulares de estas proteínas transmembranas, y traducen la señal recibida en el exterior de la célula a una señal en el interior de ésta que eventualmente alcanza los factores de transcripción en el núcleo.

el conjunto específico de los activadores necesarios para la transcripción de un gen particular con el fin de expresar ese gen.

- El sistema de doble híbrido de levadura es ampliamente utilizado para detectar los cDNA que codifican dominios de proteínas que se unen a una proteína específica de interés (véase la Fig. 7-40).

FIGURA 7-41 Ejemplos de hormonas que se unen a los receptores nucleares. Estas hormonas y lípidos solubles relacionados se difunden a través de las membranas plasmática y nuclear y se unen a los receptores localizados en el citosol o en el núcleo. El complejo receptor-ligando funciona como un activador de la transcripción.



En el **Capítulo 16** se describirán los principales tipos de receptores de superficie celular y las vías de señalización intracelular que regulan la actividad de los factores de transcripción.

En esta sección, se analiza el segundo grupo principal de señales extracelulares, las hormonas liposolubles, pequeñas, que incluyen muchas hormonas esteroides diferentes, retinoides y hormonas tiroideas, que pueden difundirse a través de las membranas plasmáticas y nucleares e interactuar directamente con los factores de transcripción que éstos controlan (Fig. 7-41). Como se mencionó anteriormente, los receptores intracelulares para la mayoría de estas hormonas liposolubles, que constituyen la *superfamilia de receptores nucleares*, funcionan como activadores de la transcripción cuando se unen a sus ligandos.

Todos los receptores nucleares comparten una estructura de domino común

La secuenciación de los cDNA derivados de los mRNA que codifican diversos receptores reveló una conservación notable en sus secuencias aminoácidas y tres regiones funcionales (Fig. 7-42). Todos los recep-

tores nucleares tienen una región N-terminal única de longitud variable (100-500 aminoácidos). Las porciones de esta región funcionan como dominios de activación en la mayoría de los receptores nucleares. El dominio de unión al DNA mapea cerca del centro de la secuencia primaria y tiene una repetición del motivo de dedo de cinc C4 (Fig. 7-29b). Los dominios de unión a hormona, localizados cerca del extremo C-terminal, contienen un dominio de activación dependiente de hormona (véase la Fig. 7-30b, c). En algunos receptores nucleares, el dominio de unión a hormona funciona como un dominio de represión en la ausencia de ligando.

Los elementos de respuesta al receptor nuclear contienen repeticiones directas o invertidas

Se han determinados las secuencias nucleotídicas características de los sitios de DNA, llamadas *elementos de respuesta*, que unen diversos receptores nucleares. Las secuencias consenso de los elementos de respuesta para los receptores de glucocorticoides y de estrógeno son repeticiones invertidas de 6 pb separadas por tres pares de bases cualquiera

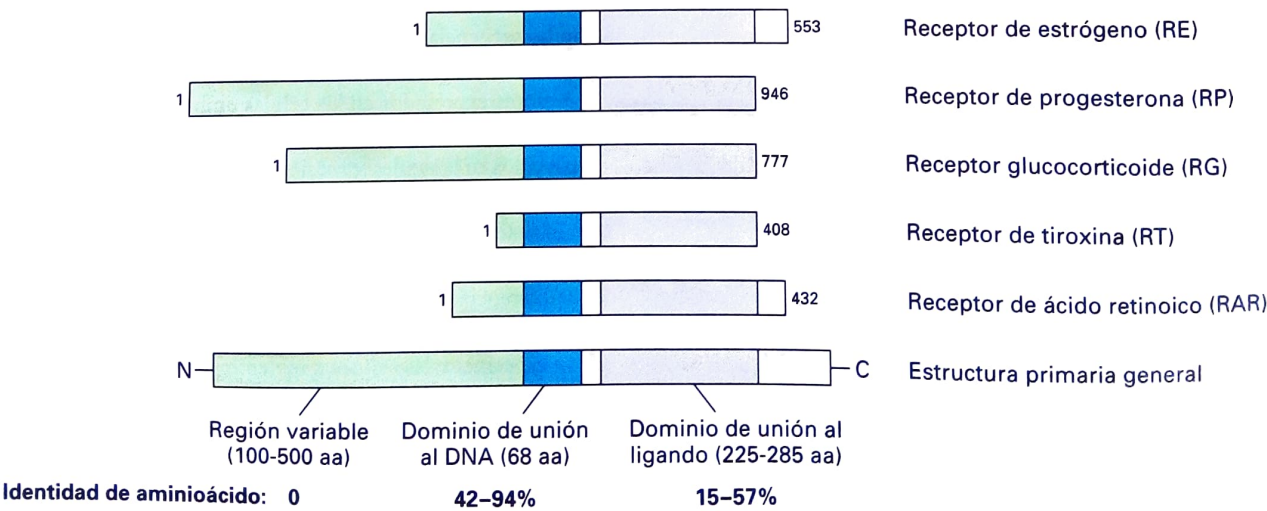


FIGURA 7-42 Diseño general de los factores de transcripción en la superfamilia de los receptores nucleares. El dominio de unión al DNA localizado centralmente presenta considerable homología de secuencia entre los diferentes receptores y contiene dos copias del motivo dedos de cinc C₄

(véase la Fig. 7-29b). El dominio C-terminal de unión a hormona muestra de alguna manera menos homología. Las regiones N-terminales en diversos receptores varían en longitud, tienen secuencias únicas y pueden contener uno o más dominios de activación. [Véase R. M. Evans, 1988, *Science* **240**:889.]

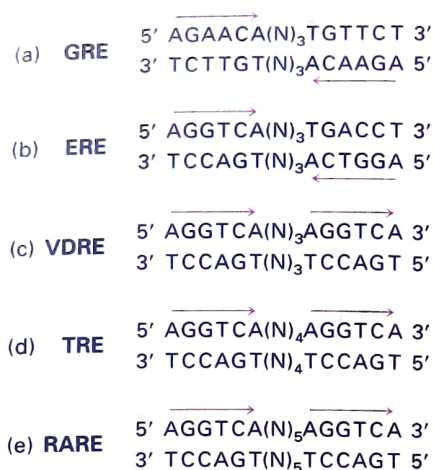


FIGURA 7-43 Secuencias consenso de los elementos de respuesta al DNA que unen tres receptores nucleares. Los elementos de respuesta para el receptor glucocorticoide (GRE) y el receptor de estrógeno (ERE) contienen repeticiones invertidas que unen estas proteínas homodiméricas. Los elementos de respuesta para los receptores heterodiméricos contienen una repetición directa común separada por tres a cinco pares de bases para el receptor de la vitamina D₃ (VDRE), el receptor de la hormona tiroidea (TRE) y el receptor del ácido retinoico (RARE). Las secuencias se indican mediante flechas rojas. [Véase K. Umehono y cols., 1991, *Cell* 65:1255, y A. M. Naar y cols., 1991, *Cell* 65:1267.]

(Fig. 7-43a, b). Este hallazgo sugiere que los receptores de hormonas esteroides cognadas podrían unirse al DNA como dímeros asimétricos, como se demostró después a partir del análisis cristalográfico por rayos X del dominio de unión al DNA dedos de cinc C₄ del receptor de glucocorticoides homodimérico (véase la Fig. 7-29b).

Algunos de los elementos de respuesta de receptores nucleares, como aquellos para los receptores que unen la vitamina D₃, la hormona tiroidea, y el ácido retinoico, son repeticiones directas de la misma secuencia reconocida por el receptor de estrógeno, separada por tres a cinco pares de bases (Fig. 7-43c-e). La especificidad para responder a estas diferentes hormonas mediante la unión a diferentes receptores está determinada por el espaciado de las repeticiones. Los receptores que se unen a tales elementos de respuesta de repeticiones directas lo hacen como heterodímeros con un monómero de receptor nuclear común llamado RXR. El elemento de respuesta de la vitamina D₃, por ejemplo, es unido por el heterodímero RXR-VDR, y el elemento de respuesta del ácido retinoico es unido por RXR-RAR. Los monómeros compuestos de heterodímeros interactúan entre sí de forma tal que los dos dominios de unión al DNA se encuentran en la misma orientación en lugar de en orientación invertida, lo que permite que los heterodímeros RXR se unan a las repeticiones directas de los sitios de unión para cada monómero. Por el contrario, los monómeros en los receptores nucleares homodiméricos (p. ej., GRE y ERE) tienen una orientación invertida.

La unión de la hormona a un receptor nuclear regula su actividad como un factor de transcripción

El mecanismo mediante el cual la unión de la hormona controla la actividad de los receptores nucleares difiere para los receptores heterodiméricos y homodiméricos. Los receptores nucleares heterodiméricos

(p. ej., RXR-VDR, RXR-TR y RXR-RAR) se localizan exclusivamente en el núcleo. En la ausencia de sus ligandos hormonas, reprimen la transcripción cuando se unen a sus sitios afines en el DNA. También lo hacen al dirigir la desacetilación de histonas en los nucleosomas de la cercanía mediante el mecanismo que se describió anteriormente (véase la Fig. 7-36a). En la conformación de ligando unido, los receptores nucleares heterodiméricos que contienen RXR pueden dirigir la hiperacetilación de histonas en los nucleosomas cercanos, revirtiendo así los efectos de la represión del dominio de unión al ligando libre. En presencia de ligando, los dominios de unión al ligando de los receptores nucleares también se unen al mediador y estimulan el ensamblaje del complejo de preiniciación.

A diferencia de los receptores nucleares heterodiméricos, los receptores homodiméricos se encuentran en el citoplasma en ausencia de sus ligandos. La unión de hormona a estos receptores conduce a sus translocaciones al núcleo. La traslocación dependiente de hormona del receptor homodimérico glucocorticoide (GR) se demostró en los experimentos de transfección mostrados en la Figura 7-44. El dominio de unión a hormona GR media por sí solo este transporte. Estudios posteriores demuestran que, en la ausencia de hormona, GR está anclado en el citoplasma en un complejo de proteína grande con proteínas inhibitoras, que incluye Hsp90, una proteína relacionada con Hsp70, la principal chaperona del choque térmico en las células eucariotes. Mientras el receptor está confinado en el citoplasma no puede interactuar con los genes diana y, por lo tanto, no puede activar la transcripción. La unión de la hormona a un receptor nuclear homodimérico libera las proteínas inhibitoras y permite que el receptor entre al núcleo, donde se puede unir a los elementos de respuesta asociados con los genes diana (Fig. 7-44d). Una vez que el receptor con la hormona unida se une a un elemento de respuesta, activa la transcripción al interactuar con los complejos remodeladores de la cromatina y la histona acetilasa y el mediador.

Los metazoos regulan la transición de la Pol II de la iniciación a la elongación

Un descubrimiento inesperado reciente que resultó de la aplicación de la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina es que una gran fracción de genes en los metazoos tiene una Pol II que realiza una pausa de la elongación dentro de los ≈ 200 pares de bases del sitio de inicio de la transcripción (Fig. 7-16). Por lo tanto, la expresión de la proteína codificada está controlada no solo por la iniciación de la transcripción, sino también por la elongación de la transcripción temprana en la unidad de transcripción. Los primeros genes que se descubrieron que eran regulados mediante control de la elongación de la transcripción fueron los genes de choque térmico (p. ej., *hsp70*) que codifican las proteínas chaperoninas que ayudan a las proteínas desnaturalizadas a volver a plegarse y otras proteínas que ayudan a la célula a controlar a las proteínas desnaturalizadas. Cuando se produce el choque térmico, se activa el factor de transcripción de choque térmico (HSTF, *heat-shock transcription factor*). La unión de HSTF activado a sitios específicos en la región próxima al promotor de los genes de choque térmico estimula a la polimerasa en pausa a continuar la elongación de la cadena y estimula la reiniciación rápida mediante moléculas de RNA polimerasa II adicionales, lo cual conduce a muchas iniciaciones de la transcripción por minuto. Este mecanismo de control transcripcional permite una rápida respuesta: estos genes siempre están en pausa en un estado de transcripción suspendida y, por ende, cuando surge una emergencia no

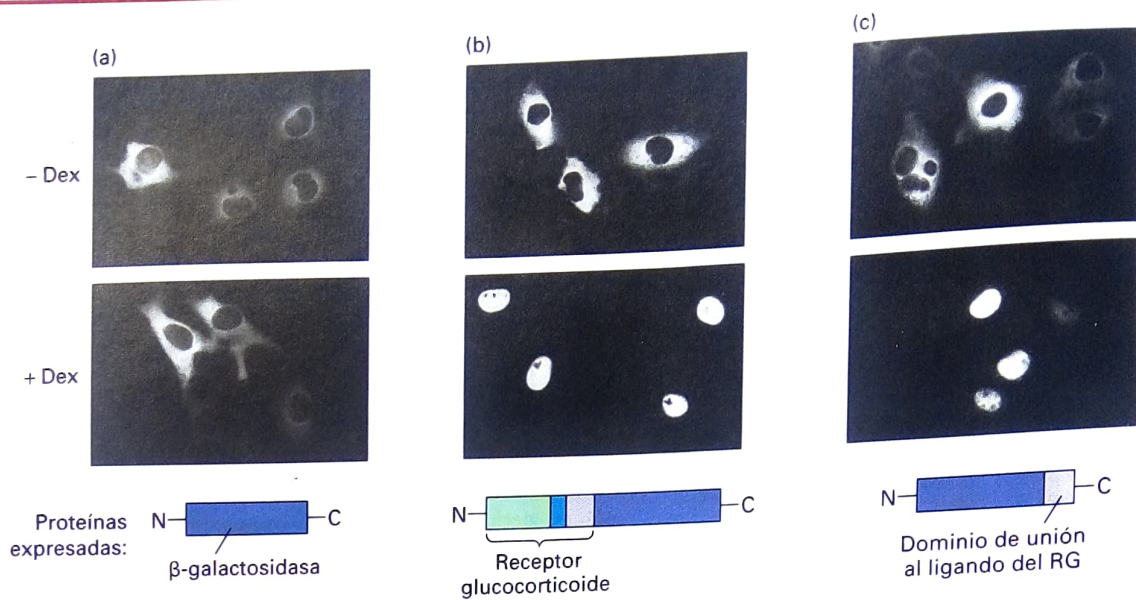
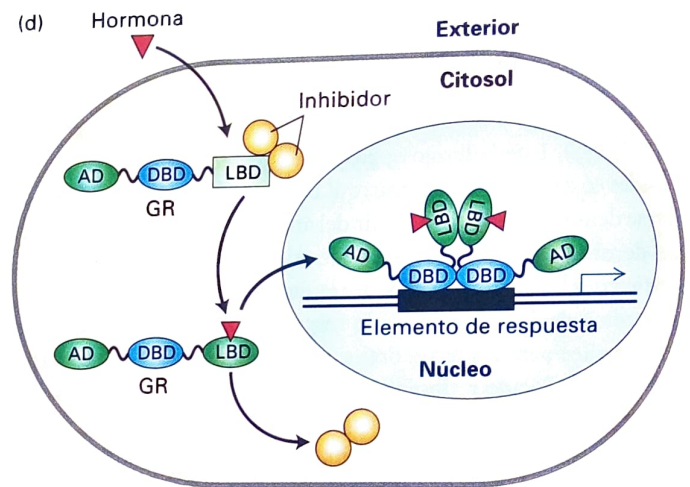


FIGURA EXPERIMENTAL 7-44 Proteínas de fusión de vectores de expresión demuestran que el dominio de unión a la hormona del receptor glucocorticoide (RG) media la translocación al núcleo en presencia de la hormona. Las células animales cultivadas fueron transfectadas con vectores de expresión que codifican las proteínas representadas en la parte inferior. Se utilizó inmunofluorescencia con un anticuerpo marcado específico para la β -galactosidasa para detectar las proteínas expresadas en las células transfectadas. (a) En las células que expresaron solo β -galactosidasa, la enzima se localizó en el citoplasma en presencia y en ausencia de la hormona glucocorticoide dexametasona (Dex). (b) En las células que expresaron una proteína de fusión que consiste en β -galactosidasa y el receptor glucocorticoide (RG) completo, la proteína de fusión estaba presente en el citoplasma en ausencia de hormona pero se transportaba al núcleo en presencia de hormona. (c) Las células que expresaron una proteína de fusión compuesta por β -galactosidasa y solo el dominio de unión al ligando RG (púrpura claro) también presentaron transporte dependiente de hormona de la proteína de fusión al núcleo. (d) Modelo de activación génica dependiente de hormona por un receptor nuclear homodimérico. En ausencia de hormona, el receptor se mantiene en el citoplasma mediante interacciones entre su dominio de unión al ligando (LBD) y proteínas de unión. Cuando la hormona está presente, se difunde a través de la membrana plasmática y se une al dominio de unión al ligando (LBD) y causa un cambio de conformación que libera el receptor de las proteínas inhibidoras. El receptor con el ligando unido luego es transportado al núcleo, donde su dominio de unión al DNA (DBD) se une a los elementos de respuesta, lo que permite al dominio de unión al ligando y un dominio de activación adicional (AD) en el N-terminal estimular la transcripción de los genes dianas. [Partes (a)-(c) de D. Picard y K. R. Yamamoto, 1987, *EMBO J.* 6:3333; cortesía de los autores.]



pluripotenciales capaces de diferenciarse en cualquier tipo celular. Esta capacidad para inducir células diferenciadas a convertirse en células madre pluripotenciales ha suscitado un enorme interés de investigación debido a su potencial para el desarrollo de tratamientos terapéuticos para lesiones traumáticas del sistema nervioso y las enfermedades degenerativas (Cap. 21).

La terminación de la Pol II también está regulada

Una vez que la Pol II ha transcritto ≈ 200 nucleótidos desde el sitio de inicio de la transcripción, la elongación por medio de la mayoría de los genes es altamente procesal, aunque la inmunoprecipitación de la cromatina con anticuerpos contra Pol II indica que la cantidad de Pol II en diversas posiciones en una unidad de transcripción en una población de células varía enormemente (Fig. 7-16b, derecha). Esto indica que la enzima puede elongar a través de algunas regiones mucho más rápidamente que otras. En la mayoría de los casos, Pol II no termina

necesitan tiempo para remodelar y acetilar la cromatina sobre el promotor y ensamblar un complejo de preiniciación de la transcripción.

Otro factor de la transcripción que se demostró regula la transcripción al controlar la elongación de la Pol II en pausa cerca del sitio de inicio de la transcripción es MYC, que funciona en la regulación del desarrollo y la división celular. MYC suele expresarse a elevadas concentraciones en las células cancerosas y es un factor de transcripción clave en la reprogramación de las células somáticas en las células madre

hasta después de que se transcribe una secuencia que dirige la escisión y poliadenilación del RNA en la secuencia que forma el extremo 3' del mRNA codificado. A continuación, la RNA polimerasa II puede terminar en múltiples sitios localizados a una distancia de entre 0,5-2 kb más allá del sitio de adición poli(A). Los experimentos con genes mutantes demuestran que la terminación está acoplada al proceso que escinde y poliadenila el extremo 3' de un transcripto, que se analiza en el siguiente capítulo.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 7.6

Regulación de la actividad de los factores de transcripción

- Las actividades de muchos factores de transcripción están indirectamente reguladas por la unión de proteínas extracelulares y péptidos a los receptores de la superficie celular. Estos receptores activan las vías intracelulares de transducción de señales que regulan factores de transcripción específicos por medio de una variedad de mecanismos que se analizan en el Cap. 16.
- Los receptores nucleares constituyen una superfamilia de factores de transcripción de dedos de cinc C_4 diméricos que unen hormonas liposolubles e interactúan con elementos de respuesta específicos en el DNA (véanse las Figs. 7-41-43).
- La unión de hormona a los receptores nucleares induce cambios conformacionales que modifican sus interacciones con otras proteínas (Figs. 7-30b, c).
- Los receptores nucleares heterodiméricos (p. ej., aquellos para retinoides, vitamina D y hormona tiroidea) se encuentran solo en el núcleo. En ausencia de hormona, éstos reprimen la transcripción de los genes diana con los elementos de respuesta correspondientes. Cuando se unen a sus ligandos, activan la transcripción.
- Los receptores de hormona esteroide son receptores nucleares homodiméricos. En ausencia de hormona, éstos se encuentran atrapados en el citoplasma por proteínas inhibitoras. Cuando se unen a sus ligandos, pueden trasladarse al núcleo y activar la transcripción de los genes diana (véase la Fig. 7-44).

7.7 Regulación epigenética de la transcripción

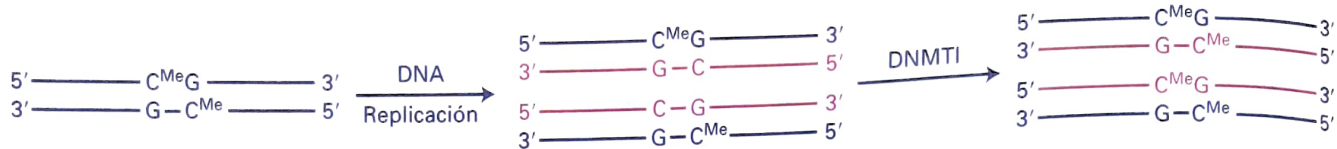
El término **epigenético** se refiere a los cambios heredados en el fenotipo de una célula que no es el resultado de cambios en la secuencia de DNA. Por ejemplo, durante la diferenciación de las células madre de médula ósea en diversos tipos de células sanguíneas diferentes, una célula madre hematopoyética (CMH) se divide en dos células hijas, una de las cuales continúa con las propiedades de CMH con el potencial de diferenciarse en todos los tipos diferentes de células sanguíneas. Sin embargo, la otra célula hija se convierte en una célula madre linfocítica o en una célula madre mielocítica (véase la Fig. 21-18). Las células madre linfocíticas generan células hijas que se diferencian en linfocitos, que llevan a cabo muchas de las funciones involucradas en las respuestas inmunitarias contra patógenos (Cap. 23). Las células madre mielocíticas se dividen en células hijas que están comprometidas a diferenciarse en

eritrocitos, en diferentes clases de glóbulos blancos fagocíticos o en las células que generan plaquetas involucradas en la coagulación de la sangre. Tanto las células madre linfocíticas como mielocíticas tienen la secuencia de DNA idéntica a la de los cigotos generados por fecundación del óvulo por un espermatozoide a partir del cual se desarrollan todas las células, pero tienen su potencial del desarrollo restringido debido a las diferencias epigenéticas entre ellas. Tales cambios epigenéticos son inicialmente la consecuencia de la expresión de factores de transcripción específicos que son los reguladores maestros de la diferenciación celular, y controlan la expresión de otros genes que codifican los factores de transcripción y las proteínas involucradas en la comunicación célula a célula en las complejas redes de control génico que, en la actualidad, son tema de investigación intensa. Los cambios en la expresión génica iniciados por los factores de transcripción, a menudo suelen reforzarse y mantenerse durante las múltiples divisiones celulares por modificaciones postraduccionales de histonas y metilación de DNA en la posición 5 del anillo de pirimidina de la citosina (Fig. 2-17), los cuales se mantienen y propagan a las células hijas cuando las células se dividen. En consecuencia, el término epigenético se utiliza para referirse a tales modificaciones postraduccionales de las histonas y a la modificación 5-metil C del DNA.

Represión epigenética mediante metilación del DNA

Como se mencionó anteriormente, la mayoría de los promotores en los mamíferos se encuentran en la clase de islas CpG. Los promotores con islas CpG activos tienen C en las secuencias CG que están desmetiladas. Los promotores con isla CpG desmetilada suelen estar sin octámeros de histonas, pero los nucleosomas en la vecindad inmediata a los promotores con islas CpG están modificados por la dimetilación o trimetilación en la lisina 4 de la histona H3 y tienen moléculas de Pol II asociadas que se encuentran en pausa durante la transcripción de las hebras de DNA molde en sentido y en antisentido, como se describió al comienzo (Figs. 7-16 y 17). Las investigaciones recientes indican que la metilación de la lisina 4 de la histona H3 se produce en las células murinas debido a que una proteína llamada Cfp1 (proteína 1 dedo de CXXC) se une al DNA desmetilado rico en CpG a través de un dominio dedo de cinc (CXXC) y se asocia con una histona metilasa específica para la lisina 4 de la histona H3 (Setd1). Los complejos de remodelación de la cromatina y el factor de la transcripción general TFIID, que inicia el ensamblaje del complejo de preiniciación de la Pol II (Fig. 7-17), se asocian con nucleosomas que portan el marcador de la lisina 4 trimetilada de la H3, y promueven la iniciación de la transcripción por parte de la Pol II.

Sin embargo, en las células diferenciadas, un bajo porcentaje de los promotores con islas CpG, que depende del tipo celular, tiene las CpG marcadas por 5-metil C. Esta modificación del DNA de las islas CpG desencadena la condensación de la cromatina. Una familia de proteínas que se unen al DNA rico en islas CpG modificadas con 5-metil-C (proteínas de unión a metil CpG, MBD) se asocian con histonas desacetilasas y reprimen los complejos de remodelación de la cromatina que condensan la cromatina, que origina la represión de la transcripción. Estos grupos metilos se añaden de novo por las DNA metiltransferasas llamadas DNMT3a y DNMT3b. Queda mucho por aprender acerca de cómo estas enzimas son dirigidas a islas CpG específicas, pero una vez que han metilado una secuencia de DNA, la metilación es transmitida por medio de la replicación del DNA por la acción de la metiltransferasa de *mantenimiento* ubicuas DNMT1:



(rojo indica hebras hijas). La DNMT1 también mantiene la metilación de las C en las secuencias CpG que estadísticamente están subrepresentadas a lo largo de la mayor parte del genoma. Como se describió antes, la secuencia CG está subrepresentada en la mayoría de las secuencias de los genomas de mamíferos, probablemente debido a que la desaminación espontánea de la 5-metil C genera timidina, lo que lleva a la sustitución de las CpG por TpG durante el período de evolución de los mamíferos, a menos que exista una selección contra la mutación resultante, como probablemente ocurrió cuando mutaron los promotores con islas CpG. Este mecanismo de represión epigenética se investiga con intensidad puesto que los genes supresores de tumores que codifican proteínas que funcionan en la supresión del desarrollo del cáncer suelen estar inactivadas en las células cancerosas por metilación anormal de las CpG de sus regiones promotoras, como se analiza más adelante en el **Capítulo 24**.

La metilación de las histonas en otras lisinas específicas está conectada con los mecanismos epigenéticos de la represión génica

La **Figura 6-31** resume los diferentes tipos de modificaciones postraduccionales que se encuentran en las histonas, incluidas la acetilación de las lisinas y la metilación de las lisinas sobre el átomo de nitrógeno

en el grupo ε amino terminal de las cadenas laterales de lisina (véase la **Fig. 2-14**). Las lisinas se pueden modificar mediante la adición de uno, dos o tres grupos metilos a este átomo de nitrógeno terminal, generando lisinas monometiladas, dimetiladas y trimetiladas, todas las cuales llevan una carga positiva. Los experimentos de pulso y caza radiomarcados demostraron que los grupos acetilo sobre las lisinas de las histonas se recambian rápidamente, mientras que los grupos metilo son mucho más estables. El estado de acetilación en una lisina de histona específica en un nucleosoma particular es el resultado de un equilibrio dinámico entre la acetilación y la desacetilación mediante histonas acetilasas e histonas desacetilasas, respectivamente. La acetilación de histonas en una región localizada de la cromatina predomina cuando los activadores unidos al DNA local unen transitoriamente complejos de histona acetilasa. La desacetilación predomina cuando los represores transitoriamente unen complejos de histona desacetilasa.

A diferencia de los grupos acetilo, los grupos metilo sobre las lisinas de las histonas son mucho más estables y se recambian mucho menos rápido que los grupos acetilo. Los grupos metilo de las lisinas de las histonas se pueden eliminar mediante las *histonas desmetilasas de lisinas*. Pero el recambio resultante de los grupos metilo de las lisinas de las histonas es mucho más lento que el recambio de los grupos acetilo de las lisinas de histonas, lo que las torna apropiadas para las modificaciones postraduccionales para la propagación de la información epigenética.

Cuadro 7-3 Modificaciones postraduccionales de histonas asociadas con genes activos y reprimidos

Modificación	Sitios de modificación	Efecto en la transcripción
Lisina acetilada	H3 (K9, K14, K18, K27, K56) H4 (K5, K8, K13, K16) H2A (K5, K9, K13) H2B (K5, K12, K15, K20)	Activación
Lisina hipoacetilada		Represión
Serina/treonina fosforilada	H3 (T3, S10, S28) H2A (S1, T120) H2B (S14)	Activación
Arginina metilada	H3 (R17, R23) H4 (R3)	Activación
Lisina metilada	H3 (K4) Me3 en región promotora H3 (K4) Me1 en potenciadores H3 (K36, K79) en regiones transcriptas H3 (K9, K27) H4 (K20)	Activación Elongación Represión
Lisina ubiquitinada	H2B (K120 en mamíferos, K123 en <i>S. cerevisiae</i>) H2A (K119 en mamíferos)	Activación Represión

Se han caracterizado varias otras modificaciones postraduccionales en las histonas (Fig. 6-31b). Todas tienen el potencial de regular positiva o negativamente la unión de proteínas que interactúan con la fibra de cromatina para regular la transcripción y otros procesos tales como el plegamiento de cromosomas en estructuras altamente condensadas que se forman durante la mitosis (Figs. 6-39 y 6-40). Ha surgido una imagen de la cromatina en la cual las colas de histonas que se extienden de forma aleatoria a partir de la fibra de cromatina están modificadas postraduccionalmente para generar una de muchas posibles combinaciones de modificaciones que regulan la transcripción y otros procesos mediante la regulación de la unión de gran número de complejos de proteína diferentes. Este control de las interacciones de proteínas con regiones específicas de la cromatina que resultan de las influencias combinadas de varias modificaciones postraduccionales de las histonas se denomina un *código de histona*. Algunas de estas modificaciones, como la acetilación de la lisina de la histona, se revierten rápidamente, mientras que otras, como la metilación de la lisina de la histona, se pueden transmitir por medio de la replicación de la cromatina, lo que genera herencia epigenética además de la herencia de la secuencia de DNA. El Cuadro 7-3 resume la influencia de las modificaciones postraduccionales de residuos de aminoácidos de histonas específicas que se producen en la transcripción.

Metilación de la lisina 9 de la histona H3 en la heterocromatina En la mayoría de los eucariontes, algunos de los complejos correpresores

contienen subunidades histona metiltransferasa que metilan la histona H3 en la lisina 9, generando dimetil y trimetil lisinas. Estas lisinas metiladas son sitios de unión para isoformas de la proteína HP1 que funciona en la condensación de la heterocromatina, como se analizó en el Capítulo 6 (véase la Fig. 6-34). Por ejemplo, el complejo correpresor KAP1 funciona con una clase de más de 200 factores de transcripción de dedos de cinc codificados en el genoma humano. Este complejo correpresor incluye una H3 lisina 9 metiltransferasa que metila los nucleosomas sobre la región promotora de la transcripción y lleva a la unión de HP1 y a la represión de la transcripción. Un transgén integrado en fibroblastos murinos cultivados que estaba reprimido mediante la acción del correpresor KAP1 se asoció con la heterocromatina en la mayoría de las células, mientras que la forma activa del mismo transgén se asoció con la eucromatina (Fig. 7-45). Los ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (véase la Fig. 7-16) demostraron que el gen reprimido estaba asociado con la histona H3 metilada en la lisina 9 y HP1, mientras que el gen activo no.

Es muy importante destacar que la metilación de la lisina de la H3 se mantiene con la replicación del cromosoma en la fase S mediante el mecanismo que se representa en la Figura 7-46. Cuando los cromosomas se replican en la fase S, los nucleosomas asociados con el DNA progenitor se distribuyen de forma aleatoria en las moléculas de DNA hijas. Los octámeros de histona nuevos que no están metilados en la lisina 9 se asocian con los cromosomas hijos nuevos, pero como los nucleosomas progenitores están asociados con ambos cromosomas hijos,

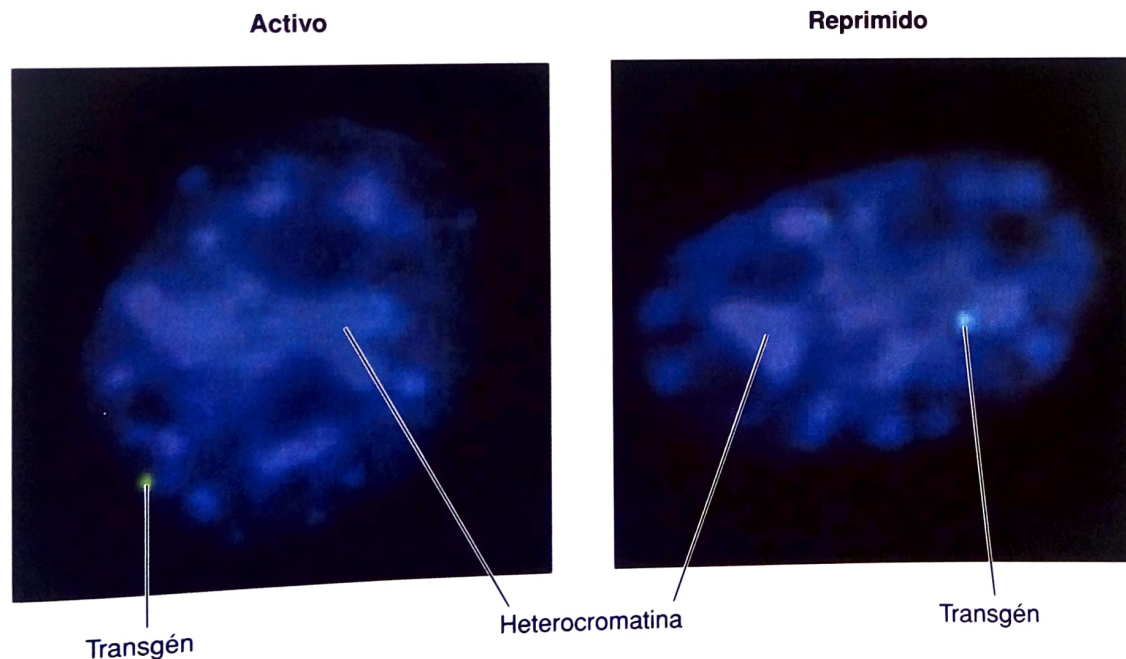


FIGURA 7-45 Asociación de un transgén reprimido con heterocromatina. Los fibroblastos murinos se transformaron de forma estable con un transgén con sitios de unión para un represor genéticamente modificado. El represor fue una fusión entre un dominio de unión al DNA, un dominio de represión que interactúa con el complejo de unión al DNA, un dominio de unión al ligando de un receptor nuclear correpresor KAP1, y el dominio de unión al ligando de un receptor nuclear que permite que la importación nuclear de la proteína de fusión sea controlada experimentalmente (véase la Fig. 7-44). El DNA se tiñó de azul con el colorante DAPI. Las regiones de tinción más brillantes son regiones de heterocromatina, donde la concentración de DNA es más alta que

en la eucromatina. El transgén se detectó por hibridación de una sonda complementaria marcada con fluorescencia (verde). Cuando el represor recombinante se retuvo en el citoplasma, el transgén se transcribió (izquierda) y se asoció con la eucromatina en la mayoría de las células. Cuando se añadió hormona de manera tal que los represores recombinantes entraron al núcleo, el transgén fue reprimido (derecha) y se asoció con la heterocromatina. Los ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (véase la Fig. 7-16) mostraron que el gen reprimido se asoció con la histona H3 metilada en la lisina 9 y HP1, mientras que el gen activo, no. [Cortesía de Frank Rauscher, de Ayyanathan y cols., 2003, *Genes Dev.* 17:1855.]

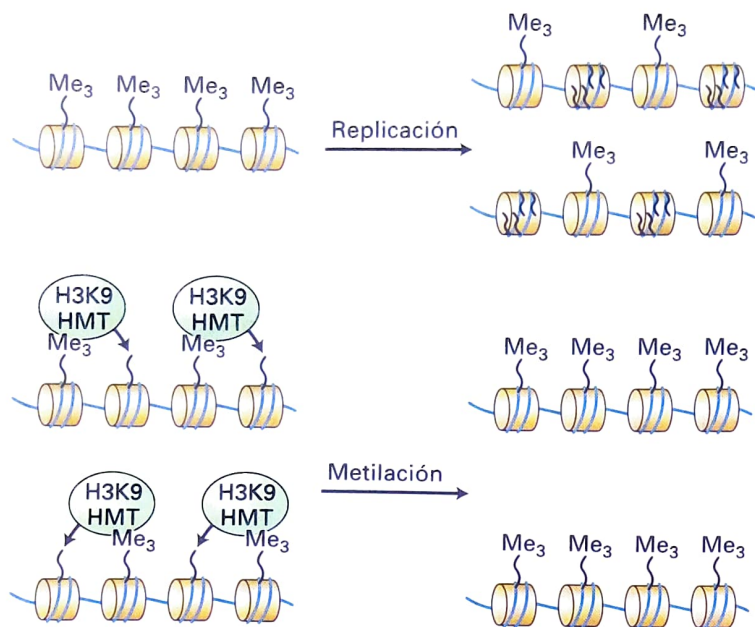


FIGURA 7-46 Mantenimiento de la metilación de la lisina de la histona H3 durante la replicación cromosómica. Cuando el DNA cromosómico se replica, las histonas parentales se asocian de manera aleatoria con las moléculas de DNA hijas, mientras que las histonas desmetiladas sintetizadas durante la fase S abarcan otros nucleosomas en los cromosomas hermanos. La asociación de la histona H3 lisina 9 metiltransferasa (H3K9HMT) con los nucleosomas parentales que contienen el marcador H3 lisina 9 dimetilada o trimetilada, metilan a los nucleosomas no modificados recientemente añadidos. En consecuencia, las metilaciones de la histona H3 lisina 9 se mantienen durante las divisiones celulares repetidas a menos que sean específicamente eliminadas mediante una histona desmetilasa.

aproximadamente la mitad de ellos están metilados en la lisina 9. La asociación de las histona H3 lisina metiltransferasas (directa o indirectamente) con los nucleosomas progenitores metilados conduce a la metilación de los octámeros de histona recién ensamblados. La repetición de este proceso con cada división celular produce el mantenimiento de la metilación de la lisina 9 de la H3 de esta región del cromosoma.

Control epigenético por parte de los complejos Polycomb y Trithorax

Otra clase de marcador epigenético que es esencial para la expresión de los genes en tipos celulares específicos en los animales multicelulares y las plantas involucra a un grupo de proteínas conocidas colectivamente como proteínas Polycomb y un grupo de proteínas que contrastan, conocidas como proteínas Trithorax, después de los fenotipos de las mutaciones en los genes que las codifican en *Drosophila*, donde se descubrieron primero. El mecanismo de represión de Polycomb es esencial para el mantenimiento de la represión de los genes en los tipos específicos de células y en todas las células subsecuentes que se desarrollan a partir de ellas a lo largo de la vida de un organismo. Los genes importantes regulados por las proteínas Polycomb incluyen a los genes *Hox*, que codifican factores de transcripción maestros. Diferentes combinaciones de factores de transcripción *Hox* ayudan a dirigir el desarrollo de tejidos y órganos específicos en un embrión en desarrollo. Temprano en la embriogénesis, la expresión de los genes *Hox* está

controlada por proteínas activadoras y represoras típicas. Sin embargo, la expresión de estos activadores y represores se detiene en un punto temprano de la embriogénesis. La expresión correcta de los genes *Hox* en los descendientes de las células embrionarias tempranas se mantiene entonces a través del resto de la embriogénesis y hasta la vida adulta por las proteínas Polycomb que mantienen la *represión* de genes *Hox* específicos. Las proteínas Trithorax llevan a cabo la función opuesta a las proteínas Polycomb, manteniendo la *expresión* de los genes *Hox* que se expresaron en una célula específica temprano en la embriogénesis y en todos los descendientes posteriores de esa célula. Las proteínas Polycomb y Trithorax controlan miles de genes, incluidos aquellos que regulan el crecimiento y la división celular (es decir, el ciclo celular, como se analiza en el Cap. 19). Los genes Polycomb y Trithorax suelen estar mutados en las células cancerosas, contribuyendo de manera importante a las propiedades anómalas de estas células (Cap. 24).

Notablemente, prácticamente todas las células en el embrión en desarrollo y en el adulto expresan un grupo similar de proteínas Polycomb y Trithorax, y todas las células contienen el mismo grupo de genes *Hox*. Incluso solo los genes *Hox* en las células donde estaban reprimidos en la embriogénesis temprana permanecen reprimidos, aun a pesar de que los mismos genes *Hox* en otras células permanecen activos en presencia de las mismas proteínas Polycomb. En consecuencia, como en el caso de los loci de tipo de apareamiento silencioso de la levadura, la expresión de los genes *Hox* está regulada por un proceso que involucra más que simplemente secuencias de DNA específicas que interactúan con proteínas que se difunden a través del nucleoplasma.

En la Figura 7-47 se describe un modelo actual para la represión por parte de las proteínas Polycomb. La mayoría de las proteínas Polycomb son subunidades de una de dos clases de complejos multiproteicos, complejos tipo PRC1 y complejos PRC2. Se cree que los complejos PRC2 actúan inicialmente por asociación con represores específicos unidos a sus secuencias de DNA afines tempranas en la embriogénesis, o los complejos ribonucleoproteínas que contienen los RNA no codificantes largos, como se analiza en una sección más adelante. Los complejos PRC2 contienen histonas desacetilasas que inhiben la transcripción como se analizó anteriormente. Éstos también contienen una subunidad (E[z] en *Drosophila*, EZH2 en los mamíferos) con un dominio SET, el dominio activo enzimáticamente de diversas histona metiltransferasas. Este dominio SET en los complejos PRC2 metila la histona H3 en la lisina 27, y genera dimetil y trimetil lisinas. El complejo PRC1 se une entonces a los nucleosomas metilados por medio de las subunidades Pc diméricas (CBX en los mamíferos), cada una conteniendo un dominio de unión a metil lisina (llamado *chromodominio*) específico para la lisina 27 de la H3 metilada. Se propone que la unión del dímero Pc a los nucleosomas vecinos condensa la cromatina en una estructura que inhibe la transcripción. Esto está avalado por los estudios de microscopía electrónica que demuestran que los complejos PRC1 provocan que los nucleosomas se asocien in vitro (Fig. 7-47d, e).

Los complejos PRC1 también contienen una ubiquitina ligasa que monoubicuitina las histonas H2A en la lisina 119 en la cola C-terminal de la H2A. Esta modificación de la H2A inhibe la elongación de la Pol II mediante la cromatina al inhibir la asociación de una chaperona de histona necesaria para eliminar los octámeros de histona del DNA a medida que la Pol II transcribe por medio de un nucleosoma y luego los reemplaza a medida que la polimerasa pasa. Se postula que los complejos PRC2 se asocian con los nucleosomas que portan el marcador de la trimetilación de la lisina 27 en la histona H3, manteniendo la

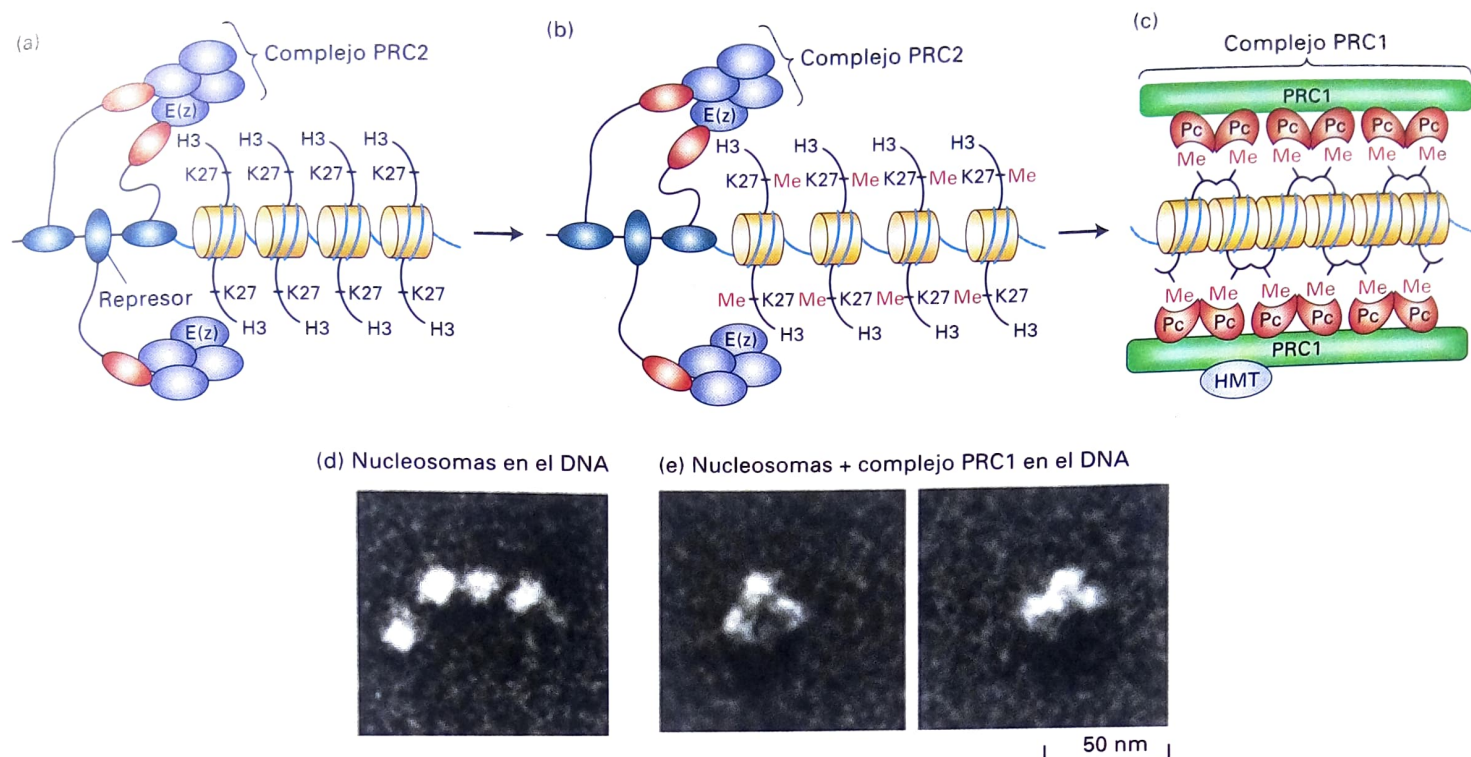


FIGURA 7-47 Modelo de la represión de los complejos Polycomb. (a) Durante la embriogénesis temprana, los represores se asocian con el complejo PRC2. (b) Esto resulta en la metilación (Me) de los nucleosomas vecinos en la histona H3 lisina 27 (K27) por la subunidad E(z) que contiene el dominio SET. (c) Los complejos PRC1 unen los nucleosomas metilados en la lisina 27 de la H3 a través de una subunidad Pc dimérica, que contiene el cromodominio. El complejo PRC1 condensa la cromatina en una estructura de cromatina reprimida, el complejo PRC2 se asocia con los complejos PRC1 para mantener

la metilación de la lisina 27 en la H3 de las histonas vecinas. En consecuencia, la asociación de PRC1 y PRC2 con la región es mantenida cuando la expresión de las proteínas represoras en (a) cesa. (d, e) Microfotografía electrónica de un fragmento de DNA de ≈1 kb unido a cuatro nucleosomas en ausencia (d) y en presencia (e) de un complejo PRC1 cada cinco nucleosomas. (Partes (a)-(c), adaptado de A. H. Lund y M. van Louhuizen, 2004, *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**:239. Partes (d, e), de N. J. Francis, R. E. Kingston y C. L. Woodcock, 2004, *Science* **306**:1574.)

metilación de la lisina 27 en la H3 en los nucleosomas en la región. Esto produce la asociación de la cromatina con los complejos PRC1 y PRC2 incluso después que ha cesado la expresión de las proteínas represoras iniciales en la **Figura 7-47a, b**. Esto también podría mantener la metilación de la lisina 27 de la histona H3 y la monoubicuitinación de la histona H2A a continuación de la replicación del DNA, mediante un mecanismo análogo al que se esquematizó en la **Figura 7-46**. Esto es una característica clave de la represión Polycomb, que se mantiene a través de las sucesivas divisiones celulares en la vida de un organismo (≈100 años para algunos vertebrados, ¡2 000 años para un pino de azúcar [*Pinus lambertiana*]!).

Las proteínas Trithorax contrarrestan el mecanismo represivo de las proteínas Polycomb, como se demostró en estudios de expresión del factor de transcripción Hox Abd-B en el embrión de *Drosophila* (**Fig. 7-48**). Cuando el sistema Polycomb es defectuoso, Abd-B está desreprimido en todas las células del embrión. Cuando el sistema Trithorax es defectuoso y no puede contrarrestar la represión por el sistema Polycomb, Abd-B está reprimido en la mayoría de las células, excepto aquellas en la parte muy posterior del embrión. Los complejos Trithorax incluyen histona metiltransferasa que trimetila la lisina 4 de la histona H3, una metilación de histona asociada con los promotores de los genes que se transcriben activamente. Estas modificaciones de

histonas crean un sitio de unión para los complejos de histona acetilasa y de remodelación de la cromatina, así como para TFIID, el factor de transcripción general que inicia el ensamblado del complejo de preiniciación (**Fig. 7-17**). Los nucleosomas con las modificaciones de la 4 metil lisina H3 son también sitios de unión para las histonas desacetilasas específicas que evitan la metilación de la histona H3 en la lisina 9 e impiden la unión de HP1, y en la lisina 27, lo que evita la unión de los complejos de represión PRC. De igual manera, una histona desmetilasa específica para la lisina 4 de la histona H3 se asocia con complejos PRC2. Los nucleosomas marcados con la metilación de la lisina 4 de la histona H3 se cree que también se distribuyen en ambas moléculas de DNA hijas durante la replicación del DNA, dando como resultado el mantenimiento de este marcador epigenético mediante una estrategia similar a la esquematizada en la **Figura 7-46**.

Los RNA no codificantes dirigen la represión epigenética en los metazoos

También se descubrió que los complejos de represión son complejos de proteínas unidas a moléculas de RNA. En algunos casos, esto resulta en la represión de genes sobre el mismo cromosoma a partir del cual se transcribe el RNA, como en el caso de la inactivación del cromosoma

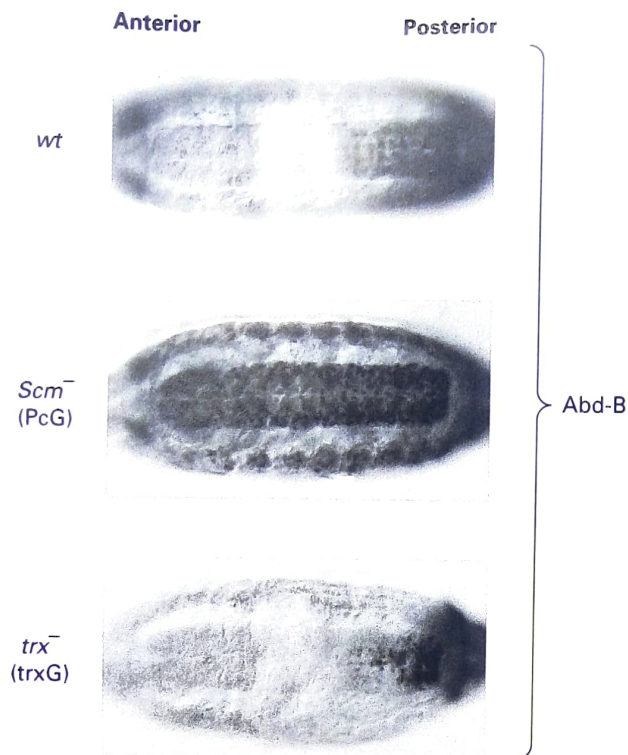


FIGURA 7-48 Influencia opuesta de los complejos Polycomb y Trithorax sobre la expresión del factor de transcripción Abd-B en los embriones de *Drosophila*.

En el estadio de embriogénesis de *Drosophila* mostrado, Abd-B se expresa normalmente solo en los segmentos posteriores, como se muestra en la parte superior mediante inmunotinción con un anticuerpo específico anti-Abd-B. En embriones con mutaciones homocigotas de *Scm*, un gen Polycomb (PcG) que codifica una proteína asociada con el complejo PRC1, la expresión de Abd-B está desreprimida en todos los segmentos del embrión. Por el contrario, en los mutantes homocigotas de *trx*, un gen Trithorax (*trxG*), la represión de Abd-B está aumentada de manera tal que solo se expresa a niveles elevados en el segmento más posterior. [Cortesía de Juerg Mueller, European Molecular Biology Laboratory.]

X en las hembras de los mamíferos. En otros casos, éstos representan complejos RNA-proteína que se pueden dirigir a genes que se transcriben desde otros cromosomas mediante apareamiento de bases con los RNA nacientes a medida que están siendo transcritos.

Inactivación del cromosoma X en mamíferos El fenómeno de inactivación del cromosoma X en los mamíferos hembra es uno de los ejemplos más intensamente estudiados de la represión epigenética mediada por un RNA largo, no codificante de proteína. La inactivación de X está controlada por un dominio de ≈ 100 kb en el cromosoma X llamado el centro de inactivación X. Notablemente, el centro de inactivación X no expresa proteínas, sino varios RNA no codificantes (ncRNA) que participan en la inactivación aleatoria de un cromosoma X entero, temprano en el desarrollo de los mamíferos hembra. Los ncRNA cuyas funciones se comprenden de forma parcial se transcriben a partir de las hebras de DNA complementario cerca de la parte media del centro de inactivación X: el RNA Tsix de 40 kb, el RNA Xist que es procesado a un RNA de ≈ 17 kb y el RNA RepA más corto de 1,6 kb a partir de la región 5' del RNA Xist (Fig. 7-49a).

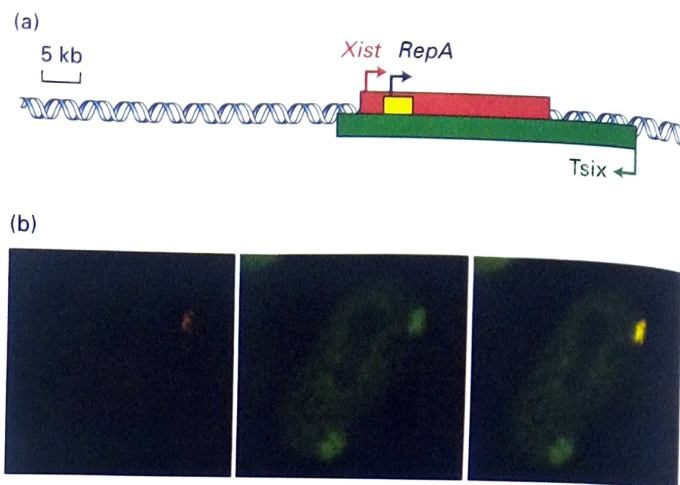


FIGURA 7-49 El RNA no codificante Xist codificado en el centro de inactivación X recubre el cromosoma X inactivo en las células humanas femeninas.

(a) La región del centro de inactivación X humano codifica los RNA *Xist*, *RepA* y *Tsix* no codificantes. (b) Un fibroblasto cultivado de una mujer se analizó mediante hibridación in situ con una sonda complementaria al RNA *Xist* marcada con un colorante fluorescente (izquierda), un grupo de cromosomas coloreados con sondas para el cromosoma X marcadas con colorante fluorescente verde (centro) y una superposición de las dos microfotografías fluorescentes. El cromosoma X inactivo condensado está asociado con el RNA *Xist*. [Parte (a) adaptado de J. T. Lee, 2010, *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 2:a003749. Parte (b) de C. M. Clemenson y cols., 1996, *J. Cell Biol.* 132:259.]

En las células femeninas diferenciadas, el cromosoma X inactivo está asociado con los complejos proteína-RNA Xist a lo largo de toda su longitud. La delección dirigida del gen *Xist* (Fig. 5-42) en células madre embrionarias cultivadas demuestra que es necesario para la inactivación X. En oposición a la mayoría de los genes que codifican proteína en el cromosoma X inactiva, *Xist* se transcribe a partir del centro de inactivación X del cromosoma X de otro modo mayormente inactivo. Los complejos proteína-RNA Xist no se difunden para interactuar con el cromosoma X inactivo. Puesto que la longitud total del cromosoma X inactivo se recubre con complejos proteína-RNA Xist (Fig. 7-49b), estos complejos se deben dispersar a lo largo de todo el cromosoma desde el centro de inactivación X donde se transcribe *Xist*. El cromosoma X inactivo también está asociado con los complejos Polycomb PRC2 que cataliza la trimetilación de la lisina 27 de la histona H3. Esto produce la asociación del complejo PRC1 y la represión transcripcional como se analizó recientemente.

En el embrión hembra temprano que consta de células madre embrionarias capaces de diferenciarse en todos los tipos de células (véase el Cap. 21) se transcriben los genes en ambos cromosomas X y el ncRNA *Tsix* de 40 kb se transcribe a partir del centro de inactivación de ambas copias del cromosoma X. Los experimentos que utilizan delecciones genéticamente modificadas en el centro de inactivación X demostraron que la transcripción de *Tsix* evita la transcripción significativa del RNA *Xist* de 17 kb de la hebra de DNA complementaria. Más adelante en el desarrollo del embrión temprano, a medida que las células comienzan a diferenciarse, se empieza a transcribir *Tsix*

solo a partir del cromosoma X inactivo. El (o los) mecanismo(s) que controlan esta transcripción asimétrica de Tsix todavía no se comprenden bien. Sin embargo, el proceso se produce de forma aleatoria en los dos cromosomas X.

En un modelo actual de la inactivación de X, la inhibición de la transcripción Tsix permite la transcripción del RNA RepA a partir de la hebra de DNA complementaria (Fig. 7-49a). El RNA RepA tiene un tallo y bucle que son unidos directamente por las subunidades del complejo Polycomb. Esta interacción se produce sobre los transcritos RepA nacientes que están unidos al cromosoma X durante la transcripción y llevan a la metilación de la lisina 27 de la H3 en la cromatina circundante. Mediante mecanismos que no se comprenden bien, esto activa la transcripción a partir del promotor Xist cercano. El RNA Xist transcrito contiene secuencias de RNA que mediante mecanismos desconocidos causan que éste se disperse a lo largo del cromosoma X. La secuencia repetida RepA cerca del extremo 5' del RNA Xist une el complejo Polycomb PRC2 que lleva a la dimetilación y trimetilación H3K27 a lo largo de la longitud completa del cromosoma X. Esto a su vez da como resultado la unión del complejo Polycomb PRC1 y la represión de la transcripción como se describió anteriormente. Al mismo tiempo, la transcripción continuada de Tsix a partir del otro cromosoma X activo continua, reprime la transcripción de Xist de ese cromosoma X y, en consecuencia, evita la represión mediada por Xist del X activo. Poco tiempo después en el desarrollo, el DNA del X inactivo también se metila en la mayoría de sus promotores con islas CpG asociadas, y probablemente contribuya a su inactivación estable a través de múltiples divisiones celulares que se producen más adelante en la embriogénesis y a lo largo de la vida adulta.

La represión trans por los RNA no codificantes largos Recientemente, investigadores que estudiaban la función de los RNA no codificantes transcritos a partir de una región que codifica un grupo de genes *HOX*, el locus *HOXC*, en fibroblastos humanos cultivados, descubrieron otro ejemplo de represión transcripcional mediante un RNA no codificante largo. La eliminación de un RNA no codificante de $\approx 2,2$ kb expresado a partir del locus *HOXC* por siRNA (Fig. 5-45) inesperadamente lleva a la desrepresión del locus *HOXD* en estas células, una región de 40 kb en otro cromosoma que codifica diversas proteínas *HOX* y otros múltiples RNA no codificantes. Ensayos similares a la inmunoprecipitación de la cromatina demostraron que este RNA no codificante, llamado HOTAIR (del inglés *HOX Antisense Intergenic RNA*), se asocia con los loci *HOXD* y con los complejos Polycomb PRC2. Esto da como resultado la dimetilación y trimetilación de la lisina 27 de la histona H3, la asociación de PRC1, la desmetilación de la lisina 4 de la H3 y la represión de la transcripción. Esto es similar al reclutamiento de los complejos Polycomb por parte del RNA Xist, excepto que el RNA Xist funciona *en cis*, permaneciendo en asociación con el cromosoma a partir del cual es transcrito, mientras que HOTAIR lleva a la represión de Polycomb *en trans* en ambas copias de otro cromosoma.

Recientemente, la caracterización del DNA asociado con el marcador de la trimetilación de la lisina 4 de la histona H3 asociada con las regiones promotoras y la metilación de la lisina 36 de la H3 asociada con la elongación de la transcripción por parte de Pol II, llevó al descubrimiento de los RNA no codificantes de $\approx 1\ 600$ de largo transcritos a partir de las regiones intergénicas entre los genes que

codifican proteína que están evolutivamente conservados entre los mamíferos. Esta conservación de la secuencia sugiere fuertemente que estos RNA no codificantes tienen funciones importantes. Los ejemplos de Xist, HOTAIR y otros dos ncRNA recientemente descubiertos que dirigen los mecanismos de represión de Polycomb hacia genes específicos contribuyen a la posibilidad de que muchos de éstos también puedan ser diana de la represión Polycomb. En consecuencia, el estudio de estos RNA no codificantes conservados es otra área de intensa investigación en la actualidad.

Las plantas y la levadura usan metilación de las histonas y el DNA dirigida por RNA cortos

Los centrómeros (Fig. 6-45c) de la levadura *Schizosaccharomyces pombe* están compuestos de múltiples repeticiones de secuencia como lo están en los organismos multicelulares. El funcionamiento apropiado de estos centrómeros durante la segregación de los cromosomas en la mitosis y la meiosis (Figs. 18-36, 5-10a, 19-38) requiere centrómeros que formen la heterocromatina. La formación de la heterocromatina en los centrómeros de *S. pombe* está dirigida por los RNA de interferencia corta (siRNA, *short interfering RNA*), inicialmente descubiertos en *C. elegans* por sus funciones en el citoplasma, donde dirigen la degradación de los mRNA a los cuales se hibridan (Fig. 5-45 y analizado más adelante en el Cap. 8). La RNA polimerasa II transcribe bajos niveles de los transcritos no codificantes a partir de las repeticiones centroméricas (cenRNA, Fig. 7-50). Éste se convierte en RNA doble hebra mediante una RNA polimerasa dependiente de RNA que se encuentra en las plantas y en muchos hongos (pero no en la levadura por gemación *S. cerevisiae*, donde no aparece el sistema siRNA, y tampoco en los mamíferos, donde no se produce este mecanismo de represión de la transcripción). Los RNA doble hebra largos resultantes son cortados por una ribonucleasa específica de RNA doble hebra llamada *Dicer*, en fragmentos de 22 nucleótidos con dos nucleótidos 3' que sobresalen. Una hebra de estos fragmentos *Dicer* es unida por un miembro de la familia de proteínas llamadas *Argonaut* que se asocian con los siRNA en los mecanismos de represión de la transcripción y la traducción. La proteína Argonaut de *S. pombe*, Ago 1, se asocia con otras dos proteínas para formar el complejo RITS (del inglés *RNA-induced transcriptional silencing*).

El complejo RITS se asocia con las regiones centroméricas mediante apareamiento de bases entre el siRNA asociado con su subunidad Ago1 y los transcritos nacientes a partir de la región y las interacciones de su subunidad Chp1 (proteína 1 de cromodominio) que contiene un cromodominio de unión a metil lisina específica para la unión de la histona H3 dimetil y trimetil lisina 9 asociada con la heterocromatina. El complejo RITS también se asocia con un complejo que contiene RNA polimerasa dependiente de RNA, RDRC. Debido a que se generan muchos siRNA a partir del RNA doble hebra, esto produce un circuito de retroalimentación positiva que incrementa la asociación de los complejos RITS con la heterocromatina centromérica. El complejo RITS también se asocia con una histona H3 lisina 9 metiltransferasa. Los marcadores metil histona H3 lisina 9 resultantes en la cromatina centromérica son sitios de unión para las proteínas HP1 de *S. pombe* y una histona desacetilasa (HDAC), que conduce a la condensación de la región centromérica en la heterocromatina.

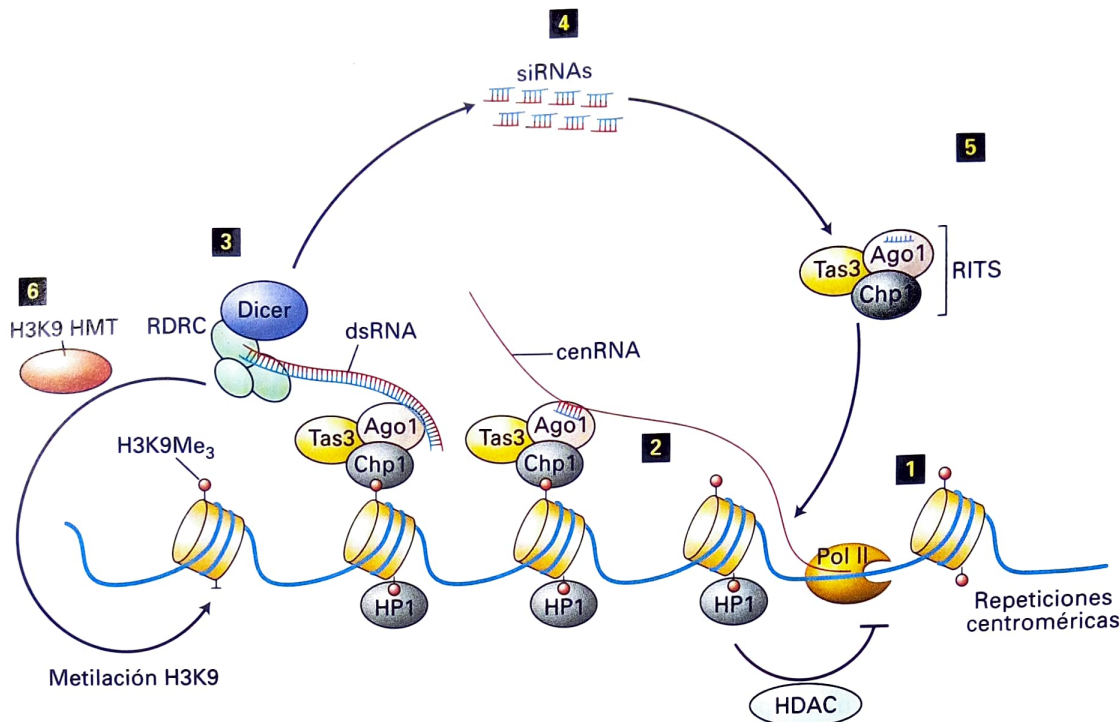


FIGURA 7-50 Modelo para la generación de la heterocromatina en los centrómeros de *S. pombe* mediante los RNA no codificantes. Paso (1): los transcritos por Pol II de las secuencias repetidas no codificantes de proteínas de los centrómeros se transcriben a un nivel bajo. Paso (2): el RNA nascente es unido por el complejo RITS mediante apareamiento de bases del RNA de interferencia corto complementario (siRNA) asociado con la subunidad Ago 1 del complejo RITS y la interacción de la subunidad Chp1 con la histona H3 metilada sobre la lisina 9. Paso (3): el complejo RITS se asocia con el complejo RDRC, que incluye una RNA polimerasa dependiente de RNA que convierte al transcripto de la Pol II de RNA nascente en un RNA doble hebra. Paso (4): el RNA doble hebra es cortado por la ribonucleasa Dicer específica de doble

hebra en fragmentos de doble hebra de ≈ 22 nucleótidos con dos bases que cuelgan en el extremo 3' de cada hebra. Paso (5): una de las dos hebras de ≈ 22 nucleótidos generadas es unida por la subunidad Ago1 de un complejo RITS. Como los múltiples siRNA asociados con el complejo RITS son generados a partir de cada transcripto Pol II, esto produce una retroalimentación positiva que concentra los complejos RITS en la región del centrómero. Paso (6): el complejo RITS también se asocia con una histona H3 lisina 9 metiltransferasa (H3K9), que metila la histona H3 en la región centromérica. Esto genera un sitio de unión para las proteínas HP1 de *S. pombe*, así como la subunidad Chp1 del complejo RITS. La unión de HP1 condensa la región en heterocromatina como se esquematiza en la Figura 6-35a. [Adaptado de D. Moazed, 2009, *Nature*, **457**:413.]



Inducción 5-metil C por los ncRNA en las plantas El modelo de planta *Arabidopsis thaliana* usa la metilación del DNA ampliamente para reprimir la transcripción de los transposones y los retrotransposones (analizados en el Cap. 6) y ciertos genes específicos. Además de la metilación de C en la posición 5 en la secuencia CG, las plantas también metilan genes en CHG (donde H es cualquiera de los otros nucleótidos) y CHH. Existe un grado de redundancia, pero la DNA metiltransferasa MET1 lleva a cabo en gran medida la metilación CpG y es funcionalmente similar a la DNMT1 en los animales multicelulares. CMT3 (cromometilasa 3) metila CHG y DRM2 es la principal metiltransferasa de CHH. La metilación de las secuencias CpG y CHG se mantienen con la replicación del DNA mediante MET1 y CMT3, respectivamente, por reconocimiento de la metil C en la hebra parental del DNA recientemente sintetizado y la metilación de la hebra hija C, como se analizó anteriormente para la DNMT1 humana. Sin embargo, uno de los cromosomas hijos de un sitio de metilación CHH tiene una G sin modificar en la posición complementaria a la C metilada y, por lo tanto, no porta modificación del DNA que pueda ser reconocida por la DRM2 metiltransferasa. En consecuencia, se debe mantener en los sitios de metilación CHH por un mecanismo alternativo.

El gen *FWA* codifica un factor de transcripción homeodominio involucrado en la regulación del tiempo de floración en respuesta a

la temperatura, de manera tal que las plantas no florezcan antes de los días cálidos de primavera. En *A. thaliana* de tipo silvestre, *FWA* se encuentra reprimido por la metilación de CHH de su región promotora. La falla para metilar el promotor *FWA* produce un fenotipo fácilmente reconocible de florecimiento tardío, lo que permite el aislamiento de mutantes de *A. thaliana* en múltiples genes que fallan en metilar las secuencias CHH. Estos genes se han clonado por los métodos descritos en el Capítulo 5, revelando un mecanismo complejo de metilación del DNA dirigido por RNA que involucra a las RNA polimerasas IV y V específicas de plantas mencionadas anteriormente (Fig. 7-51) y a los siRNA nucleares específicos de plantas que son de 24 nucleótidos de largo.

El gen *FWA* tiene una duplicación directa en su región promotora, y se encuentran presentes múltiples copias de transposones en el genoma. Mediante un mecanismo aún no elucidado, la Pol IV es dirigida a transcribir DNA repetido sin importar cuál es su secuencia. Una RNA polimerasa dependiente de RNA (RDR2) convierte el transcripto simple hebra de la Pol IV en un RNA doble hebra, que es cortado por las ribonucleasas Dicer, en especial DCL3, en fragmentos doble hebra de 24 nucleótidos con dos bases que sobresalen. Una hebra de estos fragmentos de RNA es unida por una proteína Argonauta (AGO4 o 6) en cuerpos densos en el núcleo llamados cuerpos de Ca-

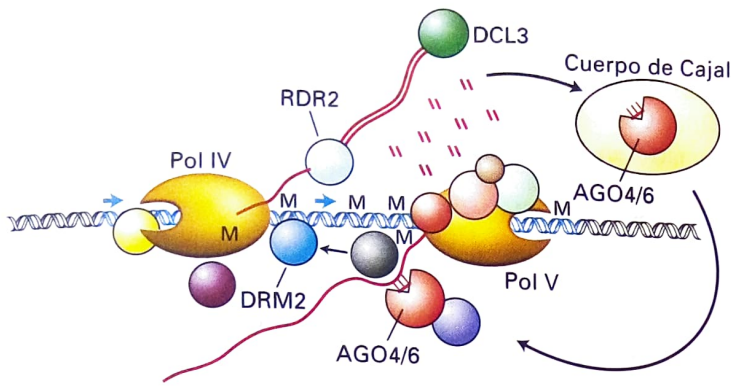


FIGURA 7-51 Modelo del mecanismo de metilación del DNA en las C en las secuencias CHH en *A. thaliana*. La RNA polimerasa IV especifica de plantas transcribe secuencias repetidas como los transposones y la región proximal al promotor del gen *FWA* (DNA azul, con la región duplicada indicada por las flechas azules). La RNA polimerasa RDR2 dependiente de RNA convierte esto en RNA doble hebra, que es cortada por la enzima Dicer DCL3 en fragmentos de RNA doble hebra de 24 nucleótidos con dos bases que sobresalen. Una hebra está unida por la proteína Argonauta AGO4 o AGO6 y forma apareamientos de bases con los transcritos del DNA repetido transcritos por la RNA polimerasa V específica de plantas. Esto lleva a la metilación de las C (M) mediante la DNA metiltransferasa DRM2. Diversas otras proteínas que participan en este proceso elaborado están representadas por círculos coloreados. Éstas fueron identificadas debido a que mutaciones en ellas producen un fenotipo de florecimiento tardío y no pueden metilar las C en la región promotora de *FWA*. [Adaptado de M. V. C. Greenberg y cols., 2011, *Epigenetics* 6:344.]

jal, después de que el biólogo español los descubrió por primera vez al comienzo del siglo veinte. El RNA simple hebra de 24 nucleótidos en estos complejos Argonauta luego forman apareamiento de bases con un transcritos naciente de DNA repetitivo sintetizado por la Pol V. Ésta dirige la DNA metiltransferasa DRM2 a metilar las C en el DNA repetitivo. Al igual que en los metazoos, una histona desacetilasa interactúa con las C metiladas, lo que lleva a la hipoacetilación de los nucleosomas asociados con el DNA repetitivo y a la represión de la transcripción por parte de la Pol II. ■

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 7.7

Regulación epigenética de la transcripción

- El término control *epigenético* de la transcripción se refiere a la represión o la activación que se mantiene después de que las células se replican como resultado de la metilación del DNA o modificaciones postraduccionales de las histonas, en especial la metilación de histonas.
- La metilación de secuencias CpG en los promotores con islas CpG en los mamíferos genera sitios de unión para una familia de proteínas de unión a metil (MBT) que se asocian con histonas desacetilasas, lo que induce la hipoacetilación de las regiones promotoras y la represión transcripcional.

- La histona H3 dimetilada o trimetilada en la lisina 9 crea sitios de unión para la proteína asociada con la heterocromatina HP1, que produce la condensación de la cromatina y la represión de la transcripción. Estas modificaciones postraduccionales se perpetúan con la replicación de los cromosomas debido a que las histonas metiladas se asocian de manera aleatoria con las moléculas de DNA hijas y con la histona H3 lisina 9 metiltransferasa que metila la lisina 9 de la histona 3 en las histonas H3 recientemente sintetizadas en la hebra de DNA hija.

- Los complejos Polycomb mantienen la represión de los genes inicialmente reprimidos por represores de factores de transcripción de unión a secuencias específicas expresados temprano durante la embriogénesis. Una clase de complejos de represión Polycomb, los complejos PRC2, se cree que se asocian con estos represores en las células embrionarias tempranas, lo que da como resultado la metilación de la lisina 27 de la histona H3. Esto crea sitios de unión para las subunidades en el complejo PRC2 y los complejos tipo PRC1 que inhiben el ensamblaje de los complejos de iniciación Pol II o inhiben la elongación de la transcripción. Debido a que los octámeros de histona parental con H3 metilada en la lisina 27 se distribuyen en ambas moléculas de DNA hijas a continuación de la replicación del DNA, los complejos PRC2 que se asocian con estos nucleosomas mantienen la metilación de la lisina 27 en la histona H3 por medio de la división celular.

- Los complejos Trithorax se oponen a la represión de los complejos Polycomb mediante la metilación de la histona H3 en la lisina 4 y mantienen esta marca de activación por medio de la replicación de los cromosomas.

- La inactivación del cromosoma X en las hembras de mamífero requieren un RNA no codificante, largo (ncRNA) llamado Xist que se transcribe desde el centro de inactivación X y luego se disemina, mediante un mecanismo que no se comprende bien, a lo largo del mismo cromosoma. Xist es unido por el complejo PRC2 en un estadio temprano de la embriogénesis, iniciando la inactivación X que se mantiene a lo largo del resto de la embriogénesis y de la vida adulta.

- También se ha descubierto que los ncRNA largos llevan a la represión de los genes en *trans*, en oposición a la inactivación *cis* impuesta por Xist. La represión se inicia por su interacción con los complejos PRC2. Queda mucho por aprender acerca de cómo son dirigidos a regiones cromosómicas específicas, pero el descubrimiento de ncRNA de $\approx 1\ 600$ de largo conservados entre los mamíferos aumenta la posibilidad de que éste sea un mecanismo ampliamente utilizado para la represión.

- En muchos hongos y plantas, las RNA polimerasas dependientes de RNA generan RNA de doble hebra a partir de los transcritos nacientes de secuencia repetida. Los RNA de estos transcritos nacientes son procesados por las ribonucleasas Dicer en siRNA de 22 a 24 nucleótidos unidos por las proteínas Argonauta. Estos siRNA forman apareamiento de bases con los transcritos nacientes a partir de las secuencias de DNA repetidas e inducen la metilación de la lisina 9 de la histona H3 en las repeticiones centroméricas en la levadura *S. pombe*, y la metilación del DNA en las plantas, lo que da como resultado la formación de heterocromatina transcripcionalmente reprimida.

7.8 Otros sistemas de transcripción eucariontes

Concluimos este capítulo con una breve descripción de la iniciación de la transcripción eucarionte por otras dos RNA polimerasas nucleares eucariontes, Pol I y Pol III, y por las diferentes polimerasas que transcriben el DNA mitocondrial y de los cloroplastos. Aunque estos sistemas, en particular sus regulaciones, son menos comprendidos que la transcripción por parte de la RNA polimerasa II, son igualmente fundamentales en la vida de las células eucariontes.

La iniciación de la transcripción por Pol I y Pol III es análoga a la de la Pol II

La formación de los complejos de iniciación de la transcripción que involucran a Pol I y Pol III es similar en algunos aspectos al ensamblaje del complejo de iniciación de Pol II (véase la Fig. 7-17). Sin embargo, cada una de las tres RNA polimerasas nucleares eucariontes requiere de sus propios factores de transcripción generales específicos de la polimerasa y reconocen diferentes elementos de control. Además, ni Pol I ni Pol III requieren hidrólisis de ATP por una DNA helicasa para ayudar a separar las hebras molde de DNA para iniciar la transcripción, mientras que Pol II sí. La iniciación de la transcripción por Pol I, que sintetiza los pre-rRNA, y por Pol III, que sintetiza los tRNA, el rRNA 5S y otros RNA estables, cortos (véase el Cuadro 7-2), está fuertemente acoplada a la tasa de crecimiento y de proliferación celular.

Iniciación por Pol I Los elementos de regulación que dirigen la iniciación de Pol I están localizados de modo similar en relación con el sitio de inicio de la transcripción, tanto en la levadura como en los mamíferos. Un *elemento central* que abarca el sitio de inicio de la transcripción desde -40 hasta $+5$ es esencial para la transcripción de Pol I. Un *elemento de control corriente arriba* adicional que se extienden aproxima-

damente -155 a -60 estimula 10 veces más la transcripción in vitro por parte de Pol I. En los seres humanos, el ensamblaje del complejo de preiniciación de Pol I (Fig. 7-52) se inicia por la unión cooperativa de UBF (factor de unión corriente arriba) y SL1 (factor de selectividad), un factor multisubunidad que contiene TBP y cuatro factores asociados con TBP específicos de Pol I (TAFIs), a la región promotora de Pol I. Las subunidades de TAF_I interactúan directamente con subunidades específicas de Pol I, dirigiendo su RNA polimerasa nuclear específica al sitio de inicio de la transcripción. TIF-1A, el homólogo de mamífero de *S. cerevisiae* RRN3, es otro factor necesario, así como la proteína-cinasa nuclear abundante CK2 (caseína-cinasa 2), la actina nuclear, la miosina nuclear, la proteína desacetilasa SIRT7 y la topoisomerasa I, que evita la formación de superenrollamientos de DNA (Fig. 4-8) durante la transcripción rápida de Pol I de la unidad de transcripción de ≈ 14 kb.

La transcripción del precursor de 14 kb de los rRNA 18S, 5.8S y 28S (véase el Cap. 8) está altamente regulada para coordinar la síntesis de ribosoma con el crecimiento y la división celular. Esto se logra por la regulación de las actividades de los factores de iniciación de Pol I mediante las modificaciones postraduccionales que incluyen la fosforilación y la acetilación en sitios específicos, el control de la velocidad de la elongación de Pol I y el control de ≈ 300 genes rRNA humano que están transcripcionalmente activos mediante mecanismos epigenéticos que ensamblan copias inactivas dentro de la heterocromatina. El cambio entre las copias silenciosas de la heterocromatina de los genes de rRNA y las activas se logra por un complejo multisubunidad de remodelación de la cromatina llamado NoRC ("No" por nucléolo, el sitio de transcripción de rRNA dentro del núcleo). NoRC localiza un nucleosoma sobre el sitio de inicio de la transcripción de Pol I y bloquea el ensamblaje del complejo de preiniciación. También interactúa con una DNA metiltransferasa que metila un CpG crucial en el elemento de control corriente arriba e inhibe la unión de UBF, así como las histonas metiltransferasas que dimetilan y trimetilan la lisina 9 de la histona

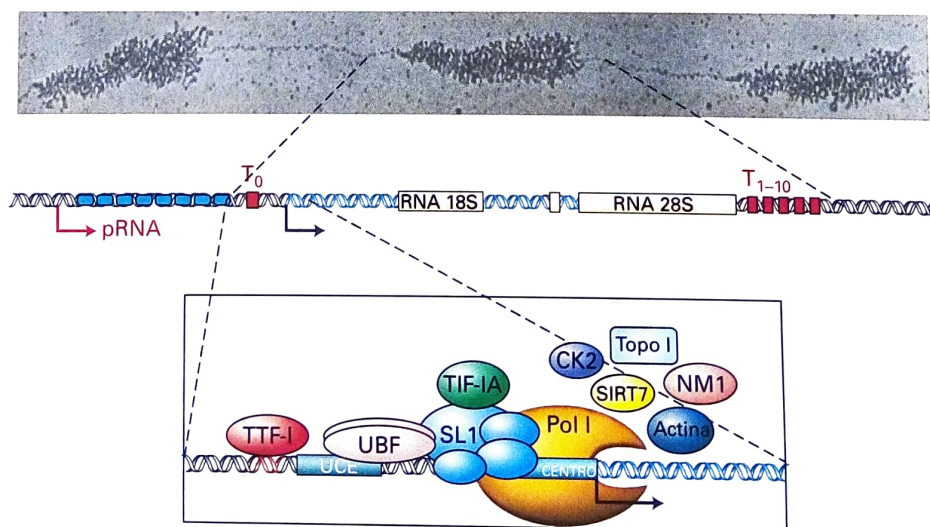


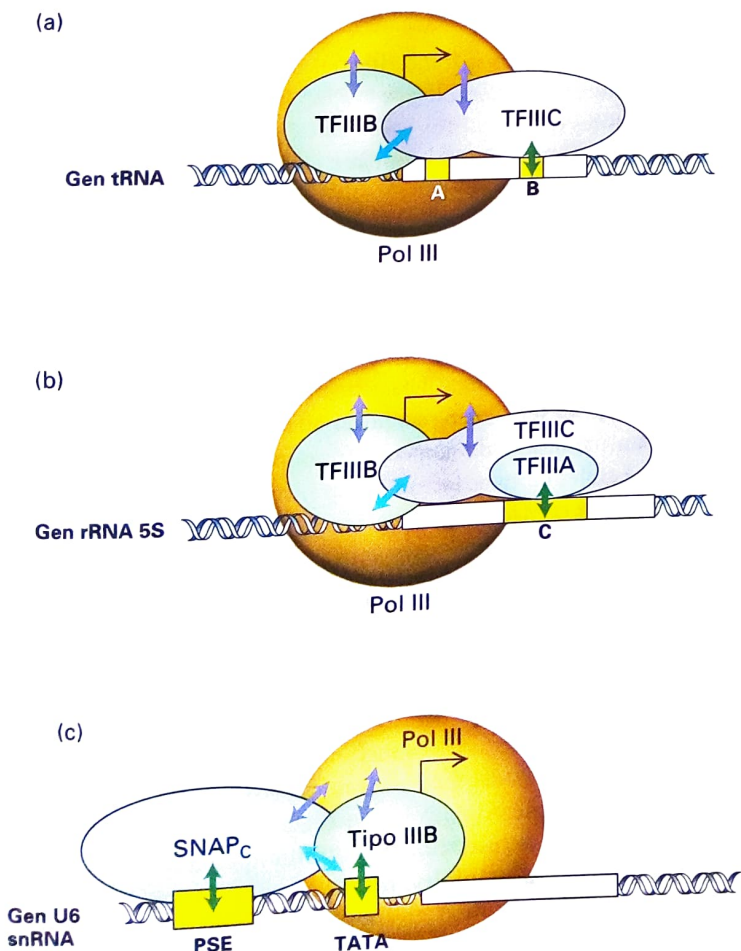
FIGURA 7-52 Transcripción del precursor de RNA del rRNA por la RNA polimerasa I. Arriba: microfotografía electrónica de los complejos de RNA de proteína transcritos a partir de genes repetidos de rRNA. En la parte del medio se esquematiza una unidad de transcripción de la Pol I. Los potenciadores que estimulan la transcripción de la Pol I desde un único sitio de inicio de la transcripción se representan por rectángulos azules. Los sitios de terminación de la transcripción de Pol I (T_0 , T_1 - T_{10}) unidos por el factor de terminación específico de Pol I TTF-1 se muestran como rectángulos

rojos. pRNA indica la transcripción del pRNA no codificante necesario para el silenciamiento transcripcional. Las regiones del DNA mostradas en azul están contenidas en el transcrito primario, pero se eliminan y se degradan durante el procesamiento del rRNA. El elemento del promotor central y los elementos de control corriente arriba se esquematizan abajo con la localización de la Pol I y se representan sus factores de transcripción generales UBF, SL1 y TIF-1A, así como otras proteínas necesarias para la elongación y el control por parte de Pol I. [Adaptado de I. Grummt, 2010, *FEBS J.* 277:4626.]

H3, creando sitios de unión para la HP1 heterocromática y las histonas desacetilasas. Además, un RNA no codificante de ≈ 250 nucleótidos llamado pRNA (por promotor asociado) transcrito por la Pol I desde ≈ 2 kb corriente arriba de la unidad de transcripción rRNA (flecha roja en la Fig. 7-52) se une a una subunidad de NoRC y es necesario para el silenciamiento transcripcional. Se cree que pRNA dirige a NoRC a las regiones promotoras de Pol I al formar un triple RNA:DNA con la secuencia terminadora T_0 . Esto crea un sitio de unión para la DNA metiltransferasa DNMT3b que metila el CpG crucial en el elemento promotor corriente arriba.

Iniciación por Pol III A diferencia de los genes que codifican proteínas y los genes de pre-rRNA, las regiones promotoras de los tRNA y los genes rRNA 5S se encuentran completamente dentro de la secuencia transcripta (Fig. 7-53a, b). Dos de tales elementos promotores *internos*, llamados la *caja A* y la *caja B*, están presentes en todos los genes tRNA. Estas secuencias altamente conservadas no solo funcionan como promotores sino que también codifican dos proteínas invariantes de los tRNA eucariontes que son necesarias para la síntesis proteica. En los genes rRNA 5S, una única región de control interna, la *caja C*, actúa como un promotor.

Tres factores de transcripción generales son necesarios para que la Pol III inicie la transcripción de los genes de tRNA y rRNA 5S *in vitro*. Dos factores multiméricos, TFIIC y TFIIB, participan en la iniciación tanto de los promotores de tRNA como de rRNA 5S; un tercer factor, TFIIA, es necesario para la iniciación en los promotores de rRNA 5S.



Al igual que con el ensamblaje de los complejos de iniciación de Pol I y Pol II, los factores de transcripción generales de Pol III se unen en el DNA promotor en una secuencia definida.

La mitad N-terminal de una subunidad TFIIB, llamada BRF (por factor relacionado con TFIIB, *TFIIB-related factor*), es similar en secuencia a TFIIB (un factor Pol II). Esta similitud sugiere que BRF y TFIIB llevan a cabo una función similar en la iniciación, es decir, asistir en la separación de las hebras de DNA molde en el sitio de inicio de la transcripción (Fig. 7-19). Una vez que TFIIB se ha unido al gen de tRNA o de rRNA 5S, Pol III se puede unir e iniciar la transcripción en presencia de ribonucleósidos trifosfato. La subunidad BRF de TFIIB interactúa específicamente con una de las subunidades de la polimerasa única con Pol III, que da cuenta de la iniciación mediante esta polimerasa nuclear específica.

Otra de las tres subunidades que componen TFIIB es TBP, que ahora se puede ver como un componente de un factor de transcripción para las tres RNA polimerasas nucleares eucariontes. El hallazgo de que TBP participa en la iniciación de la transcripción por Pol I y Pol III fue sorprendente, puesto que los promotores reconocidos por estas enzimas no suelen contener cajas TATA. No obstante, en el caso de la transcripción de Pol III, la subunidad TBP de TFIIB interactúa con el DNA de manera similar a la forma en la que interactúa con las cajas TATA.

Pol III también transcribe genes para los RNA pequeños, estables con promotores corriente arriba que contienen una caja TATA. Un ejemplo es el snRNA U6 involucrado en el corte y empalme del pre-mRNA, como se analizó en el Capítulo 8. En los mamíferos, este gen contiene un elemento promotor corriente arriba llamado el PSE, además de la caja TATA (Fig. 7-53c), que es unido por el complejo multisubunidad llamado SNAPC, mientras que la caja TATA es unida por la subunidad TBP de una forma especializada de TFIIB que contiene una subunidad BRF alternativa.

MAF1 es un inhibidor de la transcripción de Pol III que funciona mediante la interacción con la subunidad BRF de TFIIB y Pol III. Su función es regulada por el control de su importación desde el citoplasma al interior del núcleo mediante fosforilaciones en sitios específicos en respuesta a cascadas de proteína-cinasa de traducción de señales que responden al estrés celular y a la falta de nutrientes (véanse los Caps. 16 y 24). En los mamíferos, la transcripción de Pol III también está reprimida por los supresores de tumores cruciales p53 y la familia de retinoblastoma (RB). En los seres humanos existen dos genes que codifican la subunidad RPC32. Uno de estos se expresa específicamente en las células que están replicando, y su expresión forzada puede contribuir a la transformación oncogénica de fibroblastos humanos cultivados.

FIGURA 7-53 Elementos de control de la transcripción en genes transcritos por la RNA polimerasa III. Tanto los genes de tRNA (a) como de rRNA 5S (b) contienen elementos promotores internos (amarillo) localizados corriente abajo del sitio de inicio de la transcripción y llamados cajas A, B y C, como se indica. El ensamblaje de complejos de iniciación de la transcripción de estos genes comienza con la unión de los factores de transcripción generales específicos de Pol III, TFIIA, TFIIB y TFIIC a estos elementos de control. Las flechas verdes indican interacciones fuertes DNA-proteína específica de secuencia. Las flechas púrpuras indican interacciones entre los factores de transcripción generales y Pol III. (c) La transcripción del gen U6 snRNA en los mamíferos está controlada por un promotor corriente arriba con una caja TATA unida a la subunidad TBP de una forma especializada de TFIIB con una subunidad BRF alternativa y un elemento regulador corriente arriba llamado el PSE unido por un factor multisubunidad llamado SNAPC. (De L. Schramm y N. Hernandez, 2002, *Genes Dev.* 16:2593.)

Los DNA de cloroplastos y mitocondrias se transcriben mediante RNA polimerasas específicas de orgánulo

Como se analizó en el **Capítulo 6**, las mitocondrias y los cloroplastos probablemente evolucionaron a partir de las eubacterias que fueron endocitadas en células ancestrales que contenían un núcleo eucarionte. En los eucariontes modernos, ambos orgánulos contienen DNA distintos que codifican algunas de las proteínas esenciales para sus funciones específicas. Es interesante notar que las RNA polimerasas que transcriben DNA mitocondrial (mt) y DNA de cloroplasto son similares a las polimerasas de las eubacterias y los bacteriófagos, lo que refleja sus orígenes evolutivos.

Transcripción mitocondrial La RNA polimerasa que transcribe mtDNA se codifica en el DNA nuclear. Después de la síntesis de la enzima en el citosol, es importada a la matriz mitocondrial mediante mecanismos descritos en el **Capítulo 13**. Las RNA polimerasas mitocondriales de *S. cerevisiae* y de la rana *Xenopus laevis* consisten en una subunidad grande con actividad de polimerización de ribonucleótidos y una subunidad B pequeña (TFBM). En los mamíferos, otra proteína de la matriz, el factor de transcripción mitocondrial A (TFAM), se une a los promotores del mtDNA y es esencial para la iniciación de la transcripción en los sitios de inicio usados en la célula. La subunidad grande de la RNA polimerasa mitocondrial de levadura está evidentemente relacionada con las RNA polimerasas monoméricas del bacteriófago T7 y de bacteriófagos similares. Sin embargo, la enzima mitocondrial es funcionalmente distinta de la enzima de bacteriófago en su dependencia de otros dos polipéptidos para la transcripción desde los sitios adecuados de inicio.

Las secuencias promotoras reconocidas por la RNA polimerasa mitocondrial incluyen al sitio de inicio de la transcripción. Estas secuencias promotoras, que son ricas en residuos A, se han caracterizado en el mtDNA de levaduras, plantas y animales. El genoma mitocondrial circular humano contiene dos secuencias promotoras de 15 pb, una para la transcripción de cada hebra. Cada hebra se transcribe por completo; los transcriptos primarios largos luego son procesados por escisión en los genes de tRNA que separa cada uno de los mRNA y los rRNA mitocondriales. Un segundo promotor parece ser responsable de la transcripción de copias adicionales de los rRNA. Actualmente, se comprende poco acerca de cómo se regula la transcripción del genoma mitocondrial de manera tal de coordinar la producción de las pocas proteínas mitocondriales que codifica con la síntesis y la importación de los miles de proteínas codificadas por el DNA nuclear que comprenden la mitocondria.

Transcripción de cloroplasto El DNA de cloroplasto se transcribe por medio de dos tipos de RNA polimerasas, una proteína multisubunidad similar a las RNA polimerasas bacterianas y una similar a las enzimas de subunidad única de bacteriófagos y mitocondrias. Las subunidades del centro de la enzima del tipo bacteriano, α , β , β' , y las subunidades ω están codificadas en el DNA de cloroplastos de las plantas superiores, mientras que seis factores σ similares a σ^{70} están codificados en el DNA nuclear de las plantas superiores. Esto es otro ejemplo de la transferencia de genes de genomas organulares a los genomas nucleares durante la evolución. En este caso, los genes que codifican los factores de iniciación de la transcripción reguladores han sido transferidos al núcleo, donde el control de su transcripción por la RNA polimerasa II

nuclear probablemente controla de manera indirecta la expresión de grupos de genes de cloroplastos. La RNA polimerasa de cloroplasto similar a la bacteriana se denomina polimerasa de plástido debido a que su centro catalítico está codificado por el genoma de cloroplasto. La mayoría de los genes de cloroplasto son transcritos por estas enzimas y tienen regiones de control en -35 y -10 similares a los promotores de las cianobacterias, a partir de las cuales evolucionaron. La RNA polimerasa similar a la T7 de cloroplasto también está codificada en el genoma nuclear de las plantas superiores. Ésta transcribe un grupo diferente de genes de cloroplastos. Curiosamente, incluye genes que codifican subunidades de la polimerasa de plástido multisubunidad similar a la bacteriana. Resultados recientes indican que la transcripción por parte de la polimerasa multisubunidad está regulada por los factores sigma cuyas actividades están reguladas por la luz y el estrés metabólico.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 7.8

Otros sistemas de transcripción eucariontes

- El proceso de iniciación de la transcripción por Pol I y Pol III es similar al de la Pol II pero necesita diferentes factores de transcripción generales, es dirigido por diferentes elementos promotores y no requiere de la hidrólisis de enlaces fosfodiéster β - γ del ATP para separar las hebras de DNA en el sitio de inicio.
- El DNA mitocondrial se transcribe mediante una RNA polimerasa codificada en el núcleo compuesta por dos subunidades. Una subunidad es homóloga a la RNA polimerasa monomérica del bacteriófago T7; la otra se asemeja a los factores σ bacterianos.
- El DNA de cloroplastos se transcribe por una RNA polimerasa codificada por el cloroplasto homóloga a la RNA polimerasa bacteriana, con diversos factores σ alternativos codificados por el núcleo y una única subunidad de RNA polimerasa similar a la del bacteriófago T7.

Perspectivas para el futuro

Mucho se ha aprendido en los últimos años acerca del control de la transcripción en eucariontes. Los genes que codifican $\approx 2\,000$ activadores y represores se pueden reconocer en el genoma humano. Ahora tenemos un panorama de cómo el número astronómico de combinaciones posibles de estos factores de transcripción puede generar la complejidad de control génico necesaria para producir organismos tan notables como los que vemos a nuestro alrededor. Pero queda mucho por comprender. Aunque tenemos algún conocimiento acerca de qué procesos activan un gen y cuáles lo reprimen, conocemos poco acerca de cómo la frecuencia de transcripción es controlada con el fin de proporcionar a una célula las cantidades adecuadas de sus diversas proteínas. En un precursor de eritrocito, por ejemplo, los genes globina se transcriben a una tasa mucho más rápida que los genes que codifican las enzimas del metabolismo intermediario (los llamados genes de mantenimiento). ¿Cómo se logran las grandes diferencias en la frecuencia de la iniciación de la transcripción de varios genes? ¿Qué sucede con las múltiples interacciones entre los dominios de activación, los complejos coactivadores, los factores de transcripción y la RNA polimerasa II cuando la polimerasa inicia la transcripción

y transcribe alejándose desde la región promotora? ¿Están totalmente disociados en los promotores poco transcritos, de manera que la combinación de múltiples factores requeridos para la transcripción deben reensamblarse desde cero para cada ronda de transcripción? ¿Los complejos de activadores con sus múltiples coactivadores permanecen ensamblados en los promotores en los cuales tiene lugar la reiniciación a velocidad elevada, de manera que todo el ensamblaje no tenga que ser reconstruido cada vez que se inicia la polimerasa?

Queda mucho por aprender acerca de la estructura de la cromatina y de cómo esa estructura influye en la transcripción. ¿Qué componentes adicionales además de HP1 y la histona metilada en la lisina 9 de la H3 son necesarios para dirigir ciertas regiones de la cromatina para formar la heterocromatina, donde la transcripción está reprimida? Precisamente, ¿cómo cambia la estructura de la cromatina por los activadores y los represores, y cómo esto estimula o inhibe la transcripción? Una vez que los complejos de remodelación de la cromatina y los complejos de acetilación se asocian con una región promotora, ¿cómo permanecen asociados? Los modelos actuales sugieren que ciertas subunidades de estos complejos se asocian con colas de histonas modificadas, de manera tal que la combinación de unión a colas de histonas específicas modificadas más la modificación de las colas de histonas vecinas de la misma forma da como resultado la retención del complejo de modificación en la región promotora activada. En algunos casos, este tipo de mecanismo de ensamblado provoca que los complejos se diseminen a lo largo una fibra de cromatina. ¿Qué controla que tales complejos se dispersen y cuán lejos lleguen?

Se ha descubierto que dominios de activación únicos interactúan con diversos complejos coactivadores. ¿Son estas transiciones transitorias, de manera tal que el mismo dominio de activación puede interactuar con varios coactivadores de manera secuencial? ¿Se requiere un orden específico de interacción de coactivador? ¿De qué manera la interacción de los dominios de activación con el mediador estimula la transcripción? ¿Estas interacciones simplemente estimulan el ensamblaje de un complejo de preiniciación, o ellas también influyen en la velocidad a la cual la RNA polimerasa II inicia la transcripción a partir de un complejo de iniciación ensamblado?

La activación transcripcional es un proceso altamente cooperativo, de manera tal que los genes expresados en un tipo específico de célula solo se expresan cuando el grupo completo de los activadores que controlan ese gen están expresados y activados. Como se mencionó anteriormente, algunos factores de transcripción que controlan la expresión del gen *TTR* en el hígado también se expresan en las células intestinales y renales. Sin embargo, el gen no se expresa en estos otros tejidos, ya que su transcripción requiere dos factores de transcripción adicionales expresados sólo en el hígado. ¿Qué mecanismos explican esta acción altamente cooperativa de los factores de transcripción que es crucial para la expresión de genes específicos del tipo de célula?

El descubrimiento de que los RNA no codificantes largos pueden reprimir la transcripción de genes diana específicos ha despertado un gran interés. ¿Éstos reprimen siempre la transcripción al dirigir los complejos Polycomb? ¿Pueden también los RNA no codificantes largos activar la transcripción de genes diana específicos? ¿Cómo son dirigidos a genes específicos? Los $\approx 1\,600$ RNA no codificantes largos que están conservados entre los mamíferos, ¿realizan todas las funciones para regular la transcripción de genes diana específicos, añadiendo complejidad al control de la transcripción mediante proteínas de unión a DNA de secuencia específica? La investigación para

responder estas preguntas será un área apasionante de investigación en los próximos años.

Se necesitará un exhaustivo conocimiento del desarrollo normal y de los procesos anómalos asociados con enfermedades para responder éstos y muchos otros interrogantes. A medida que se descubran conocimientos adicionales de los principios de control de la transcripción, es probable que surjan aplicaciones para dichos conocimientos. Este entendimiento puede permitir un control fino de la expresión de los genes terapéuticos introducidos a través de vectores de terapia génica a medida que se desarrollen. El conocimiento detallado de las interacciones moleculares que regulan la transcripción puede proporcionar nuevos blancos para el desarrollo de fármacos terapéuticos que inhiban o estimulen la expresión de genes específicos. Una comprensión más completa del mecanismo de control de la transcripción puede permitir mejorar la ingeniería de cultivos con características deseables. Por cierto, posteriores avances en el área de control de la transcripción contribuirán a satisfacer nuestra comprensión acerca de cómo se desarrollan y funcionan organismos tan complejos como nosotros mismos.

Palabras clave

dominio de activación 307	mediador 315
activadores 281	receptores nucleares 309
factor antiterminación 301	promotor 281
bromodominio 319	elementos proximales
dominio carboxilo terminal (CTD) 293	al promotor 302
represión mediada por la cromatina 315	dominio de represión 308
cromodominio 330	represores 281
coactivador 311	RNA polimerasa II 290
correpresor 312	secuencias silenciadoras 316
huella genética con DNasa I 305	factores de transcripción
potencisoma 314	específicos 305
potenciadores 285	caja TATA 295
factores de transcripción	proteína de unión
generales 297	a caja TATA (TBP) 298
genes de choque térmico 325	secuencias activadoras
desacetilación de histonas 318	corriente arriba (UAS) 305
cierre de leucina 311	sistema de doble híbrido
locus <i>MAT</i> (en levadura) 315	de levadura 321
	dedos de cinc 309

Revisión de los conceptos

1. Describa los acontecimientos moleculares que se producen en el operón lac cuando las células de *E. coli* son cambiadas desde un medio que contiene glucosa a un medio que contiene lactosa.
2. La concentración de glutamina libre afecta la transcripción de la enzima glutamina sintetasa en *E. coli*. Describa los mecanismos para ello.
3. ¿Qué tipos de genes transcriben las RNA polimerasas I, II y III? Diseñe un experimento para determinar si un gen específico es transcrito por la RNA polimerasa II.
4. El CTD de la subunidad más grande de la RNA polimerasa II puede

ser fosforilada en múltiples residuos de serina. ¿Cuáles son las condiciones que llevan al CTD de la RNA polimerasa II fosforilado versus el no fosforilado?

5. ¿Qué tienen en común la caja TATA, los iniciadores y las islas CpG? ¿Cuál fue el primero en ser identificado? ¿Por qué?

6. Describa los métodos usados para identificar la localización de los elementos de control en las regiones proximales al promotor de los genes.

7. ¿Cuál es la diferencia entre un elemento proximal al promotor y un potenciador distal? ¿Cuáles son las similitudes?

8. Describa los métodos usados para identificar la localización de las proteínas de unión al DNA en las regiones reguladoras de los genes.

9. Describa las características estructurales de las proteínas activadoras y represoras de la transcripción.

10. Dar dos ejemplos de cómo la expresión génica puede ser reprimida sin alterar la secuencia que codifica el gen.

11. Usando CREB y receptores nucleares como ejemplo, compare y contraste los cambios estructurales que tienen lugar cuando estos factores de transcripción se unen a sus coactivadores.

12. ¿Qué factores de transcripción generales se asocian con un promotor de RNA polimerasa II además de la polimerasa? ¿En qué orden se unen in vitro? ¿Qué cambios estructurales se producen en el DNA cuando se forma un complejo de iniciación de la transcripción “abierto”?

13. La expresión de proteínas recombinantes en la levadura es una herramienta importante para las compañías biotecnológicas que producen nuevos fármacos para el uso humano. En un intento por obtener un gen X nuevo expresado en levadura, un investigador ha integrado el gen X en el genoma de levadura cerca de un telómero. ¿Resultará esta estrategia en una buena expresión del gen X? ¿Por qué sí o por qué no? ¿Podría el resultado de este experimento diferir si el experimento se hubiese llevado a cabo en una línea de levadura que contiene mutaciones en las colas de histonas H3 o H4?

14. Usted ha aislado una nueva proteína llamada STICKY. Puede predecir a partir de las comparaciones con otras proteínas conocidas que STICKY contiene un dominio HBHb y un dominio de interacción con Sin3. Prediga la función de STICKY y razone la importancia de estos dominios en la función STICKY.

15. El método de doble híbrido de levadura es un poderoso método de genética molecular para identificar una proteína (o proteínas) que interactúa con una proteína o dominio proteico conocido. Usted ha aislado el receptor glucocorticoide (GR) y tiene evidencia de que es una proteína modular que contiene un dominio de activación, un dominio de unión al DNA y un segundo dominio de activación de unión a ligando. Análisis posteriores revelaron que en las células pituitarias, la proteína está anclada en el citoplasma en la ausencia de su ligando de hormona, un resultado que lo lleva a usted a especular que se unen a otras proteínas inhibitorias. Describa cómo se podría usar un análisis de doble híbrido para identificar la proteína(s) con la cual interactúa GR. ¿Cómo podría usted identificar específicamente el dominio en el GR que une el o los inhibidores?

16. Los procariontes y los eucariontes inferiores como las levaduras tienen elementos de regulación del DNA llamados secuencias de activación corriente arriba. ¿Cuáles son las secuencias comparables que se encuentran en las especies de eucariontes superiores?

17. Recuerdese que el represor Trp se une a un sitio en la región operadora de los genes productores de triptófano cuando este es abundante, evitando así la transcripción. ¿Qué sucedería a la expresión de los genes

de enzimas de la biosíntesis de triptófano en los siguientes escenarios? Complete las zonas en blanco con una de las siguientes frases:

nunca se expresarán/siempre (constitutivamente) se expresarán

a. La célula produce un represor Trp mutante que no puede unirse al operador. Los genes de las enzimas.

b. La célula produce un represor Trp mutante que se une a su sitio operador incluso si no hay triptófano presente. Los genes de las enzimas.

c. La célula produce un factor sigma mutante que no puede unirse a la región promotora. Los genes de las enzimas.

d. La elongación de la secuencia líder siempre se detiene después de la región 1 de transcripción. Los genes de las enzimas.

18. Comparar/contrastar los mecanismos de expresión de genes eucariontes y bacterianos.

19. Usted tiene curiosidad en identificar la región de la secuencia del gen X que sirve como un potenciador para la expresión génica. Diseñe un experimento para investigar este tema.

20. Algunos organismos tienen mecanismos que anularán la terminación de la transcripción. Uno de tales mecanismos que utiliza la proteína Tat lo emplea el retrovirus de HIV. Explique por qué Tat es entonces un buen objetivo para la vacunación contra el HIV.

21. Con la identificación de la secuencia reguladora de DNA responsable de la traducción de un gen dado, usted nota que está enriquecida con secuencias CG ¿Es probable que el gen correspondiente tenga una alta tasa de expresión del transcripto?

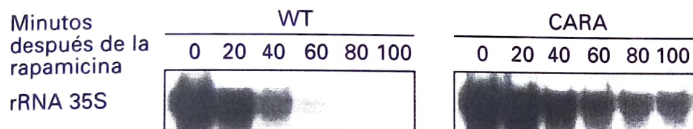
22. Nombre cuatro clases principales de proteínas de unión al DNA que son responsables de controlar la transcripción y describa sus características estructurales.

Análisis de los datos

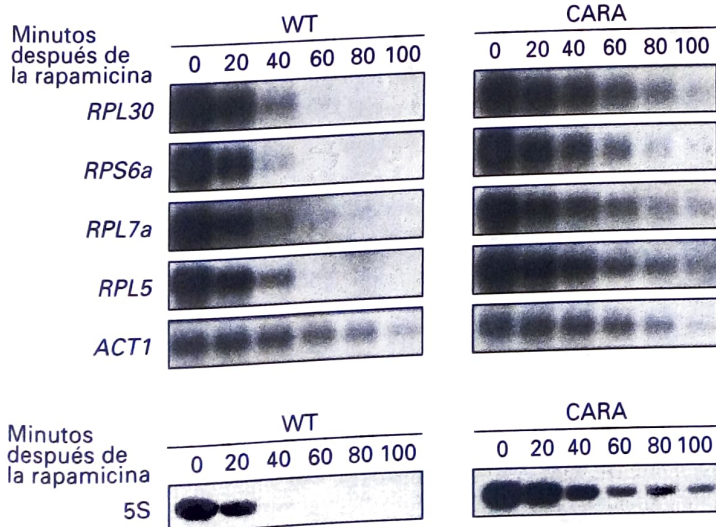
En los eucariontes, cada una de las tres RNA polimerasas, Pol I, Pol II y Pol III, transcribe genes únicos necesarios para la síntesis de ribosomas: rRNA 25S y 18S (Pol I), rRNA 5S (Pol III) y los mRNA para las proteínas ribosómicas (Pol III). Los investigadores han especulado que las actividades de las tres RNA polimerasas están reguladas de manera coordinada en función de la demanda de síntesis de ribosomas: alta en las células que están replicando en condiciones ricas en nutrientes y baja cuando escasean los nutrientes. Para determinar si las actividades de las tres polimerasas están coordinadas, Laferte y cols. diseñaron mediante ingeniería genética una cepa de levadura que es parcialmente resistente a la inhibición del crecimiento celular mediante el fármaco rapamicina (2006, *Genes Dev.* 20:2030-2040). Como se analizó en el Capítulo 8, la rapamicina inhibe una proteína-quinasa (llamada TOR, por *target of rapamycin*) que regula la velocidad global de síntesis de proteínas y ribosomas. Cuando TOR es inhibida por la rapamicina, la transcripción de los rRNA por parte de Pol I y Pol III y los mRNA de proteínas ribosómicas por parte de la RNA polimerasa II son rápidamente reprimidos. Parte de la inhibición de la síntesis de rRNA resulta de la disociación del factor de transcripción Rrn3 de la Pol I. En la cepa diseñada por Laferte y cols., el gen *Rrn3* de tipo silvestre y el gen *A43* de tipo silvestre, que codifican la subunidad de Pol I a la cual se une Rrn3, se reemplazaron con un gen que codifica una proteína de fusión de dos proteínas que evitarían la disociación de Rrn3 de la Pol I de otro modo causado por el

tratamiento con rapamicina. La cepa CARA (asociación constitutiva de *Rrn3* y *A43*) resultante se encontró que era parcialmente resistente a la rapamicina. En la ausencia de rapamicina, la cepa CARA creció a la misma tasa y tuvo igual cantidad de ribosomas que las células de tipo silvestre.

a. Para analizar la transcripción de rRNA por la Pol I, se aisló el RNA total a partir de las células de tipo silvestre (WT, *wild-type*) de crecimiento rápido y de las células CARA en diversos momentos después de la adición de rapamicina. Se midió la concentración del precursor de rRNA 35S transcripto por la Pol I (véase la Fig. 8-38) mediante el método extensión del cebador. Como el extremo 5' del precursor rRNA 23S se degrada durante el procesamiento del rRNA 25S y 18S, éste método mide el precursor pre-rRNA de vida relativamente corta. Ésta es una medición indirecta de la tasa de transcripción de rRNA por la Pol I. A continuación se muestran los resultados de este ensayo de extensión del cebador. ¿Cómo afecta la fusión CARA Pol I-*Rrn3* la respuesta de la transcripción por Pol I a la rapamicina?

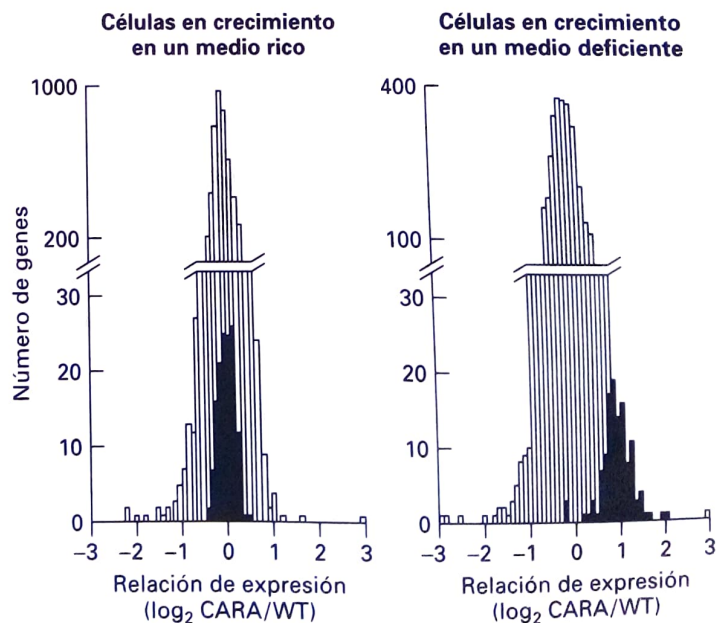


b. Se midieron las concentraciones de los cuatro mRNA que codifican proteínas ribosómicas, RPL30, RPS6a, RPL7a y RPL5, y el mRNA para la actina (*ACT1*), una proteína presente en el citoesqueleto, en las células de tipo silvestre y CARA mediante la técnica *Northern blotting* en diversos momentos después de la adición de rapamicina a las células en crecimiento rápido (autorradiogramas superiores). La transcripción de rRNA 5S se ensayó mediante pulso marcado de células de tipo silvestre de crecimiento rápido y células CARA con ^3H uracilo (durante 20 minutos), en diversos momentos después de la adición de rapamicina al medio. Se aisló el RNA celular total y se lo sometió a electroforesis en gel y autorradiografía. El autorradiograma inferior muestra la región del gen que contiene rRNA



5S. Sobre la base de esta información, ¿qué se puede concluir acerca de la influencia de la transcripción por Pol I en la transcripción de los genes de proteínas ribosómicas por la Pol II y del rRNA 5S por la Pol III?

c. Para determinar si las diferencias en el comportamiento de las células de tipo silvestre y las células CARA se pueden observar bajo condiciones fisiológicas normales (es decir, sin tratamiento con fármaco), las células se sometieron a un cambio en su fuente de nutrientes, desde un medio rico en nutrientes a un medio deficiente en nutrientes. Bajo estas condiciones, en las células de tipo silvestre, la proteína-cinasa TOR se tornó inactiva. En consecuencia, cambiar las células desde un medio rico en nutrientes a un medio deficiente en éstos debe provocar una respuesta fisiológica normal que es equivalente a tratar las células con rapamicina, la cual inhibe a TOR. Para determinar cómo la fusión de la proteína CARA afecta la respuesta a este cambio de medio, se extrajo el RNA de las células de tipo silvestre y de las células CARA y se usó como sondas de micromatrices que contienen todos los marcos de lectura abiertos de levadura. La extensión de la hibridación del RNA con las matrices se cuantificó y se expresó en los gráficos como $\log_2$ de la relación de concentración de RNA de células CARA respecto de la concentración de RNA de las células de tipo silvestre para cada marco de lectura abierto. Un valor de cero indica que las dos cepas de levadura muestran el mismo nivel de expresión para aquellos RNA específicos. Un valor de 1 indica que las células CARA contienen el doble como mucho de ese RNA particular que las células de tipo silvestre. Los siguientes gráficos muestran el número de marcos de lectura abiertos (eje y) que tienen valores de $\log_2$ de esta relación, indicada por el eje x. Los resultados de la hibridación a los marcos de lectura abiertos que codifican los mRNA para las proteínas ribosómicas se muestran mediante barras negras, aquellos para todos los otros mRNA, con barras blancas. El gráfico a la izquierda da los resultados para las células crecidas en un medio rico en nutrientes, el gráfico de la derecha para las células cambiadas a un medio deficiente en nutrientes durante 90 minutos. ¿Qué sugieren estos datos acerca de la regulación de la transcripción del gen de proteína ribosómica por la Pol II?



Referencias

Control de la expresión génica en bacterias

- Campbell, E. A., L. F. Westblade, and S. A. Darst. 2008. Regulation of bacterial RNA polymerase sigma factor activity: a structural perspective. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**:121-127.
- Casino, P., V. Rubio, and A. Marina. 2010. The mechanism of signal transduction by two-component systems. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **20**:763-771.
- Halford, S. E., and J. F. Marko. 2004. How do site-specific DNA-binding proteins find their targets? *Nucl. Acids Res.* **32**:3040-3052.
- Hsieh, Y. J., and B. L. Wanner. 2010. Global regulation by the seven-component Pi signaling system. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**:198-203.
- Lawson, C. L., et al. 2004. Catabolite activator protein: DNA binding and transcription activation. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **14**:10-20.
- Muller-Hill, B. 1998. Some repressors of bacterial transcription. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**:145-151.
- Murakami, K. S., and S. A. Darst. 2003. Bacterial RNA polymerases: the whole story. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**:31-39.
- Sharma, U. K., and D. Chatterji. 2010. Transcriptional switching in *Escherichia coli* during stress and starvation by modulation of sigma activity. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**:646-657.
- Wigneshweraraj, S. R., et al. 2008. Modus operandi of the bacterial RNA polymerase containing the sigma54 promoter-specificity factor. *Mol. Microbiol.* **68**:538-546.

Panorama general del control génico en eucariontes y RNA polimerasas

- Brenner, S., et al. 2002. Conserved regulation of the lymphocyte-specific expression of Ick in the Fugu and mammals. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **99**:2936-2941.
- Cramer P., et al. 2008. Structure of eukaryotic RNA polymerases. *Ann. Rev. Biophys.* **37**:337-352.
- Maston, G. A., S. K. Evans, and M. R. Green. 2006. Transcriptional regulatory elements in the human genome. *Ann. Rev. Genomics Hum. Genet.* **7**:29-59.
- Ptashne, M., and A. Gann. 2001. Transcription initiation: imposing specificity by localization. *Essays Biochem.* **37**:1-15.
- Struhl, K. 1999. Fundamentally different logic of gene regulation in eukaryotes and prokaryotes. *Cell* **98**:1-4.
- Visel, A., E. M. Rubin, and L. A. Pennacchio. 2009. Genomic views of distant-acting enhancers. *Nature* **461**:199-205.
- Wallace, J. A., and G. Felsenfeld. 2007. We gather together: insulators and genome organization. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **17**:400-407.

Promotores y factores de transcripción generales de la RNA polimerasa II

- Baumann, M., J. Pontiller, and W. Ernst. 2010. Structure and basal transcription complex of RNA polymerase II core promoters in the mammalian genome: an overview. *Mol. Biotechnol.* **45**:241-247.
- Brueckner, F., J. Ortiz, and P. Cramer. 2009. A movie of the RNA polymerase nucleotide addition cycle. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **19**:294-299.
- Fuda, N. J., M. B. Ardehali, and J. T. Lis. 2009. Defining mechanisms that regulate RNA polymerase II transcription in vivo. *Nature* **461**:186-192.
- Hahn, S. 2004. Structure and mechanism of the RNA polymerase II transcription machinery. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**:394-403.
- Illingworth, R. S., and A. P. Bird. 2009. CpG islands—'a rough guide'. *FEBS Lett.* **583**:1713-1720.
- Jun, S. H., et al. 2011. Archaeal RNA polymerase and transcription regulation. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **46**:27-40.
- Kornberg, R. D. 2007. The molecular basis of eukaryotic transcription. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. **104**:12955-12961.
- Miiller, F., A. Zaucker, and L. Tora. 2010. Developmental regulation of

transcription initiation: more than just changing the actors. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **20**:533-540.

Papai, G., P. A. Weil, and P. Schultz. 2011. New insights into the function of transcription factor TFIID from recent structural studies. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **21**:219-224.

Price, D. H. 2008. Poised polymerases: on your mark... get set... go! *Mol. Cell* **30**:7-10.

Roeder, R. G. 1996. The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem. Sci.* **21**:327-335.

Sandelin, A., et al. 2007. Mammalian RNA polymerase II core promoters: insights from genome-wide studies. *Nat. Rev. Genet.* **8**:424-436.

Seila, A. C., et al. 2009. Divergent transcription: a new feature of active promoters. *Cell Cycle* **8**:2557-2564.

Selth, L. A., S. Sigurdsson, and J. Q. Svejstrup. 2010. Transcript elongation by RNA polymerase II. *Ann. Rev. Biochem.* **79**:271-293.

Sikorski, T. W., and S. Buratowski. 2009. The basal initiation machinery: beyond the general transcription factors. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**:344-351.

Thomas, M. C., and C. M. Chiang. 2006. The general transcription machinery and general cofactors. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **41**:105-178.

Wade, J. T., and K. Struhl. 2008. The transition from transcriptional initiation to elongation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **18**:130-136.

Yamada, T., et al. 2006. P-TEFb-mediated phosphorylation of hSpt5 C-terminal repeats is critical for processive transcription elongation. *Mol. Cell* **21**:227-237.

Secuencias reguladoras en los genes que codifican proteínas y las proteínas mediante las cuales funcionan

- Fuxreiter, M., et al. 2008. Malleable machines take shape in eukaryotic transcriptional regulation. *Nat. Chem. Biol.* **4**:728-737.
- Garvie, C. W., and C. Wolberger. 2001. Recognition of specific DNA sequences. *Mol. Cell* **8**:937-946.
- Kadonaga, J. T. 2004. Regulation of RNA polymerase II transcription by sequence-specific DNA binding factors. *Cell* **116**:247-257.
- Kaufmann, K., A. Pajoro, and G. C. Angenent. 2010. Regulation of transcription in plants: mechanisms controlling developmental switches. *Nat. Rev. Genet.* **11**:830-842.
- Riechmann, J. L., et al. 2000. *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* **290**:2105-2110.
- Tupler, R., G. Perini, and M. R. Green. 2001. Expressing the human genome. *Nature* **409**:832-833.

Mecanismos moleculares de represión y activación de la transcripción

- Bannister, A. J., and T. Kouzarides. 2011. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* **21**:381-395.
- Bulger, M., and M. Groudine. 2011. Functional and mechanistic diversity of distal transcription enhancers. *Cell* **144**:327-339.
- Cairns, B. R. 2009. The logic of chromatin architecture and remodelling at promoters. *Nature* **461**:193-198.
- Conaway, R. C., and J. W. Conaway. 2011. Function and regulation of the Mediator complex. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **21**:225-230.
- Courey, A. J., and S. Jia. 2001. Transcriptional repression: the long and the short of it. *Genes Dev.* **15**:2786-2796.
- Deaton, A. M., and A. Bird. 2011. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev.* **25**:1010-1022.
- Hargreaves, D. C., and G. R. Crabtree. 2011. ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms. *Cell Res.* **21**:396-420.
- Kornberg, R. D. 2005. Mediator and the mechanism of transcriptional activation. *Trends Biochem. Sci.* **30**:235-239.

Li, C. A., Carey, and J. L. Workman. 2007. The role of chromatin during transcription. *Cell* 128:707-719.

Malik, S., and R. G. Roeder. 2010. The metazoan Mediator co-activator complex as an integrative hub for transcriptional regulation. *Nat. Rev. Genet.* 11:761-772.

Mohrmann, L., and C. P. Verrijzer. 2005. Composition and functional specificity of SWI2/SNF2 class chromatin remodeling complexes. *Biochim. Biophys. Acta* 1681:59-73.

Perissi, V., et al. 2010. Deconstructing repression: evolving models of co-repressor action. *Nat. Rev. Genet.* 11:109-123.

Smith, C. L., and C. L. Peterson. 2005. ATP-dependent chromatin remodeling. *Curr. Top. Dev. Biol.* 65:115-148.

Taatjes, D. J. 2010. The human Mediator complex: a versatile, genome-wide regulator of transcription. *Trends Biochem. Sci.* 35:315-322.

Venters, B. J., and B. F. Pugh. 2009. How eukaryotic genes are transcribed. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 44:117-141.

Yun, M., et al. 2011. Readers of histone modifications. *Cell Res.* 21:564-578.

Regulación de la actividad de los factores de transcripción

Altarejos, J. Y., and M. Montminy. 2011. CREB and the CRTC co-activators: sensors for hormonal and metabolic signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12:141-151.

Brivanlou, A. H., and J. E. Darnell, Jr. 2002. Signal transduction and the control of gene expression. *Science* 295:813-818.

Chen, H., M. Tini, and R. M. Evans. 2001. HATs on and beyond chromatin. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13:218-224.

Echeverria, P. C., and D. Picard. 2010. Molecular chaperones, essential partners of steroid hormone receptors for activity and mobility. *Biochim. Biophys. Acta* 1803:641-649.

Lefstin, J. A., and K. R. Yamamoto. 1998. Allosteric effects of DNA on transcriptional regulators. *Nature* 392:885-888.

Perissi, V., and M. G. Rosenfeld. 2005. Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6:542-554.

Wu, S. C., and Y. Zhang. 2009. Minireview: role of protein methylation and demethylation in nuclear hormone signaling. *Mol. Endocrinol.* 23:1323-1334.

York, B., and B. W. O'Malley. 2010. Steroid receptor coactivator (SRC) family: masters of systems biology. *J. Biol. Chem.* 285:38743-38850.

Regulación epigenética de la transcripción

Beisel, C., and R. Paro. 2011. Silencing chromatin: comparing modes and mechanisms. *Nat. Rev. Genet.* 12:123-135.

Black, J. C., and J. R. Whetstone. 2011. Chromatin landscape: methylation beyond transcription. *Epigenetics* 6:9-15.

Clouaire, T., and I. Stancheva. 2008. Methyl-CpG binding proteins: specialized transcriptional repressors or structural components of chromatin? *Cell Mol. Life Sci.* 65:1509-1522.

Grewal, S. I. 2010. RNAi-dependent formation of heterochromatin and its diverse functions. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 20:134-141.

Lee, J. T. 2010. The X as model for RNA's niche in epigenomic regulation. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 2(9):a003749 (1-12).

Minks, J., and C. J. Brown. 2009. Getting to the center of X-chromosome inactivation: the role of transgenes. *Biochem. Cell. Biol.* 87:759-766.

Moazed, D. 2009. Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. *Nature* 457:413-420.

Simon, J. A., and R. E. Kingston. 2009. Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10:697-708.

Vermaak, D., and H. S. Malik. 2009. Multiple roles for heterochromatin protein 1 genes in *Drosophila*. *Ann. Rev. Genet.* 43:467-492.

Wutz, A., and J. Gribnau. 2007. X inactivation Xplained. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 17:387-393.

Otros sistemas de transcripción eucariontes

Bonawitz, N. D., D. A. Clayton, and G. S. Shadel. 2006. Initiation and beyond: multiple functions of the human mitochondrial transcription machinery. *Mol. Cell* 24:813-825.

Dumay-Odelot, H., et al. 2010. Cell growth- and differentiation-dependent regulation of RNA polymerase III transcription. *Cell Cycle* 9:3687-3699.

Grummt, I. 2010. Wisely chosen paths—regulation of rRNA synthesis. *FEBS J.* 277:4626-4639.

Leigh-Brown, S., J. A. Enriquez, and D. T. Odom. 2010. Nuclear transcription factors in mammalian mitochondria. *Genome Biol.* 11:215:1-9.

Schweer, J., et al. 2010. Role and regulation of plastid sigma factors and their functional interactors during chloroplast transcription—recent lessons from *Arabidopsis thaliana*. *Eur. J. Cell Biol.* 89:940-946.

Willis, I. M., and R. D. Moir. 2007. Integration of nutritional and stress signaling pathways by Maf1. *Trends Biochem. Sci.* 32:51-53.



Porción de un "cromosoma en escobilla o plumulado" de un ovocito del tritón *Nophthalmus viridescens*; la proteína hnRNP asociada con el transcrito de RNA naciente fluoresce en rojo, después de la tinción con anticuerpos monoclonales. (Cortesía de M. Roth y J. Gall.)

Control génico postraduccional

En los capítulos anteriores hemos visto que la mayoría de los genes se regulan en el primer paso de la expresión génica, la transcripción, al controlar el ensamblaje del complejo de preiniciación de la transcripción en una secuencia de DNA promotora, así como mediante la regulación del alargamiento de la transcripción en la región proximal al promotor. Una vez que se ha iniciado la transcripción, la síntesis del RNA codificado requiere que la RNA polimerasa transcriba el gen completo y no termine en forma prematura. Más aún, los **transcritos primarios** iniciales producidos a partir de los genes eucariontes deben atravesar diversas reacciones de procesamiento para generar los RNA funcionales correspondientes. Para los mRNA, se debe añadir la estructura 5' cap necesaria para la traducción (véase la Fig. 4-14), los intrones se deben cortar y eliminar de los pre-mRNA (Cuadro 8-1) y se debe poliadenilar el extremo 3' (véase la Fig. 4-15). Una vez formados los mRNA en el núcleo, ya maduros y funcionales, estos son exportados al citoplasma como componentes de las ribonucleoproteínas. Tanto el procesamiento como la exportación desde el núcleo ofrecen la posibilidad de regulación adicional de la expresión génica después de la iniciación de la transcripción.

Recientemente, la gran cantidad de información de secuencia acerca de los mRNA humanos expresados en diferentes tejidos y en diversos momentos durante la embriogénesis y la diferenciación celular, ha re-

velado que el ~ 95% de los genes humanos surgen mediante el corte y empalme alternativo de los mRNA. Estos mRNA procesados de modo alternante codifican proteínas relacionadas, con diferencias en las secuencias limitadas a los dominios funcionales específicos. En muchos casos, el corte y empalme alternativo del RNA está regulado para satisfacer la necesidad de una isoforma concreta de la proteína, en un tipo celular específico. Dada la complejidad del proceso de corte y empalme del pre-mRNA, no es sorprendente que ocasionalmente se produzcan errores, originando precursores de mRNA con exones procesados de manera inapropiada. Sin embargo, las células eucariontes han desarrollado mecanismos de vigilancia que evitan el transporte de estos RNA incorrectamente procesados al citoplasma o llevan a su degradación si ellos son transportados.

En el citoplasma pueden ocurrir controles adicionales de expresión génica. En el caso de los genes que codifican proteína, por ejemplo, la cantidad de proteína producida depende de la estabilidad de los mRNA correspondientes en el citoplasma y la velocidad de sus transducciones. Por ejemplo, durante la respuesta inmunitaria, los linfocitos se comunican secretando hormonas polipeptídicas llamadas citocinas, las cuales señalan linfocitos vecinos a través de los receptores que atraviesan sus membranas plasmáticas (Cap. 23). Es importante para los linfocitos sintetizar y secretar citocinas en estallidos breves. Esto es posible debi-

CONTENIDO

8.1	Procesamiento del pre-mRNA eucarionte	348
8.2	Regulación del procesamiento del pre-mRNA	360
8.3	Transporte del mRNA a través de la envoltura nuclear	365

8.4	Mecanismos citoplasmáticos de control postranscripcional	370
8.5	Procesamiento del rRNA y tRNA	384

Cuadro 8-1 RNA analizados en el Capítulo 8

mRNA	RNA mensajero totalmente procesado con caperuza 5', intrones eliminados por corte y empalme del RNA, y una cola de poli(A).
pre-mRNA	Un precursor de mRNA que contiene intrones y no cortado en los sitios de poli(A).
hnRNA	RNA nucleares heterogéneos. Estos incluyen a los pre-mRNA y los RNA intermediarios del procesamiento que contienen uno o más intrones.
snRNA	Cinco RNA nucleares pequeños que actúan en la eliminación de intrones de los pre-mRNA mediante el proceso de corte y empalme de RNA, además de dos RNA nucleares pequeños que sustituyen a los dos primeros en intrones raros.
pre-tRNA	Un precursor de tRNA que contiene bases transcritas adicionales en los extremos 5' y 3', en comparación con el tRNA maduro. Algunos de los pre-tRNA también contienen un intrón en el bucle anticodón.
pre-rRNA	El precursor de los RNA ribosómicos maduros 18S, 5.8S, y 28S. Los rRNA maduros son procesados a partir de esta molécula de RNA precursora larga por corte, eliminación de bases a partir de los extremos de los productos escindidos y modificación de bases específicas.
snoRNA	RNA nucleolares pequeños. Estos forman apareamiento de bases con regiones complementarias de la molécula de pre-RNA, dirigiendo la escisión de la cadena de RNA y la modificación de bases durante la maduración de los rRNA.
siRNA	sRNA de interferencia pequeños, ~ 22 bases de largo, que son perfectamente complementarios a la secuencia de un mRNA. Junto con las proteínas asociadas, los siRNA causan el corte del RNA "objetivo o diana", lo que produce su rápida degradación.
miRNA	Micro-RNA, de ~ 22 bases de longitud, que forman extensos apareamientos de bases, pero no por completo, con los mRNA, en especial a lo largo de seis pares de bases en el extremo 5' del miRNA. Esto inhibe la traducción del mRNA "diana".

do a que los mRNA de las citocinas son extremadamente inestables. En consecuencia, la concentración del mRNA en el citoplasma desciende rápidamente una vez que su síntesis se detiene. Por el contrario, los mRNA que codifican proteínas requeridas en grandes cantidades y que funcionan por períodos largos de tiempo (tales como las proteínas ribosómicas) son extremadamente estables, de manera tal que se transcriben muchos polipéptidos de cada mRNA.

Además de regular el procesamiento del pre-mRNA, la exportación nuclear y la traducción, las localizaciones celulares de muchos (si no todos) los mRNA son reguladas de modo tal que las proteínas recién sintetizadas se concentren en donde son necesarias. Ejemplos particularmente sorprendentes acerca de esto se producen en el sistema nervioso de los animales multicelulares. Algunas neuronas en el cerebro humano generan más de 1 000 sinapsis separadas con otras neuronas. Durante el proceso de aprendizaje, las sinapsis que se encienden con más frecuencia que otras aumentan en tamaño muchas veces, mientras que otras sinapsis hechas por la misma neurona no lo hacen. Esto puede suceder debido a que los mRNA que codifican proteínas cruciales para el alargamiento de la sinapsis se almacenan en todas las sinapsis, pero la traducción de estos mRNA localizados y almacenados está regulada en cada sinapsis de manera independiente mediante la frecuencia a la cual se inicia el desencadenamiento. De esta forma, la síntesis de las proteínas asociadas con la sinapsis se puede regular independientemente en cada una de las muchas sinapsis hechas por la misma neurona.

Otro tipo de regulación génica que recientemente ha salido a la luz involucra a los micro-RNA (miRNA), los cuales regulan la estabilidad y la traducción de los mRNA diana específicos en los animales multicelulares y en las plantas. Los análisis de estos miRNA cortos en los diversos tejidos humanos indican que existen ~ 500 miRNA expresados

en los múltiples tipos de células humanas. Aunque de manera reciente se ha descubierto que algunos funcionan a través de la inhibición de la expresión del gen diana en el tejido adecuado y en el momento apropiado del desarrollo, se desconocen las funciones de la vasta mayoría de los miRNA humanos y por ende es un área de creciente investigación. Si la mayoría de los miRNA efectivamente tienen funciones significativas, los genes de los miRNA constituyen un subgrupo importante de los ~ 25 000 genes humanos. Un proceso estrechamente relacionado, llamado interferencia por RNA (RNAi), conduce a la degradación de los RNA virales en las células infectadas y la degradación de los RNA codificados por transposones en muchos eucariontes. Esto es de una enorme importancia para investigaciones biológicas debido a que es posible diseñar **RNA de interferencia pequeño (siRNA)**, a fin de inhibir experimentalmente la traducción de los mRNA específicos mediante un proceso llamado *silenciamiento génico por siRNA*. Esto hace posible la inhibición de la función de cualquier gen que se desee, incluso en organismos que no son susceptibles a los métodos genéticos clásicos para el aislamiento de mutantes.

Nos referimos a todos los mecanismos que regulan la expresión génica a continuación de la transcripción como *control génico postranscripcional* (Fig. 8-1). Como la estabilidad y la velocidad de la traducción de un RNA contribuyen a la cantidad de proteína expresada a partir de un gen, estos procesos postranscripcionales son componentes importantes en el **control génico**. En efecto, el resultado proteico de un gen está regulado en cada paso en la vida de un mRNA desde la iniciación de su síntesis hasta su degradación. Por ende, los procesos genéticos reguladores actúan sobre el RNA, así como sobre el DNA. En este capítulo, se considerarán los acontecimientos que se producen en el procesamiento de un mRNA a continuación de la iniciación de la transcripción y de



la elongación proximal al promotor, y los diversos mecanismos que se conoce que regulan estos acontecimientos. En la última sección, analizaremos brevemente el procesamiento de los transcritos primarios producidos a partir de los genes que codifican los rRNA y los tRNA.

8.1 Procesamiento del pre-mRNA eucarionte

En esta sección, describiremos con mayor detalle cómo las células eucariotas convierten al transcrito primario inicial sintetizado por la RNA polimerasa II, en un mRNA funcional. Tres acontecimientos principales se producen durante el proceso: *formación de la caperuza 5'*, *corte/poliadenilación 3'* y *corte y empalme del RNA* (Fig. 8-2). La adición de estas modificaciones específicas a los extremos 5' y 3' del pre-mRNA es importante, a fin de protegerlo de las enzimas que digieren rápidamente los RNA sin caperuza generados por el procesamiento del RNA, tales como los intrones eliminados y el RNA transcrito en dirección 3' desde el sitio de poliadenilación. El 5' cap y la cola 3' poli(A) distinguen a las moléculas de pre-mRNA de muchas otras clases de RNA en el núcleo. Las moléculas de pre-mRNA (véase el Cuadro 8-1) están unidas a las proteínas nucleares que funcionan en la exportación del mRNA al citoplasma. Después de que los mRNA son exportados al citoplasma, estos se unen a un grupo de proteínas citoplasmáticas que estimulan la traducción y son críticas para la estabilidad del mRNA en el citoplasma. Antes de la exportación nuclear se deben eliminar los intrones para generar la correcta región de codificación del mRNA. En los eucariotes superiores, incluyendo a los seres humanos, el proceso de corte y empalme alternativo está regulado de modo intrincado con el fin de sustituir diferentes dominios funcionales en proteínas, produciendo una expansión considerable del proteoma de estos organismos.

Los acontecimientos del procesamiento de pre-mRNA en la formación del casquete, el corte y el empalme, así como la poliadenilación,

se producen en el núcleo a medida que el precursor de mRNA está siendo transcrito. Por lo tanto, el procesamiento de pre-mRNA es *cotranscripcional*. Al tiempo que el RNA emerge desde la superficie de la RNA polimerasa II, su extremo 5' es modificado de manera inmediata por la adición de la estructura 5' cap que se encuentra en todos los mRNA (véase la Fig. 4-14). A medida que el pre-mRNA naciente continúa emergiendo desde la superficie de la polimerasa, se une inmediatamente a miembros de un grupo complejo de proteínas de unión al RNA que asisten en el corte y empalme del RNA y en la exportación al RNA que asisten en el corte y empalme del RNA y en la exportación del mRNA totalmente procesado a través de los complejos del poro nuclear hasta el citoplasma. Algunas de estas proteínas permanecen asociadas con el mRNA en el citoplasma, pero la mayoría permanece asociada con el mRNA en el citoplasma. Las proteínas de unión al RNA el mRNA es exportado al citoplasma. En consecuencia, citoplasmático son intercambiadas por las nucleares. En consecuencia, los mRNA nunca se producen como moléculas de RNA libres en la célula, sino que siempre están asociados con proteínas como los complejos de ribonucleoproteína (RNP), primero a medida que a los pre-mRNA nacentes se les coloca la caperuza 5' y cuando son procesados al tiempo que son transcritos. Luego, a continuación de la escisión y la poliadenilación, se denominan como *mRNP nucleares*. Siguiendo el intercambio de proteínas que acompañan la exportación al citoplasma, se denominan *mRNP citoplasmáticos*. A pesar de que con frecuencia se denominan pre-mRNA y mRNA, es importante recordar que siempre están asociados con proteínas formando complejos RNP.

La caperuza 5' se añade a los RNA nacentes poco tiempo después de la iniciación de la transcripción

A medida que emerge el transcrito de RNA del canal para el RNA de la RNA polimerasa II y alcanza una longitud de ~ 25 nucleótidos, se

ANIMACIÓN: Ciclo de vida de un mRNA

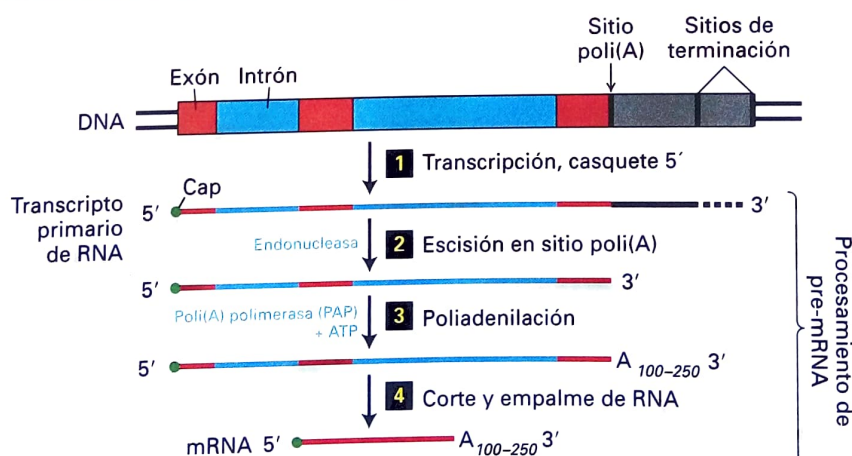


FIGURA 8-2 Panorama general del procesamiento en los eucariotes.

Corto tiempo después de que la RNA polimerasa II inicia la transcripción en el primer nucleótido del primer exón de un gen, se añade la caperuza al extremo 5' del RNA naciente con 7-metilguanilato (paso 1). La transcripción por la RNA polimerasa II termina en cualquiera de uno de los múltiples sitios de terminación en dirección 3' desde el sitio de poli(A), que está localizado en el extremo 3' del exón final. Después de que el transcrito primario es cortado en el sitio poli(A) (paso 2), se añade una cadena de residuos de adenosina (A)

(paso 3). La cola de poli(A) contiene ~ 250 residuos A en los mamíferos, ~ 150 en los insectos y ~ 100 en las levaduras. Para los transcritos primarios cortos con pocos intrones, el proceso de corte y empalme (paso 4) suele seguir al corte y a la poliadenilación, como se muestra. Para los genes grandes con múltiples intrones, los intrones suelen ser eliminados del RNA naciente durante su transcripción, es decir, antes de que la transcripción del gen se haya completado. Nótese que el casquete 5' y la secuencia adyacente a la cola de poli(A) son retenidos en los mRNA maduros.

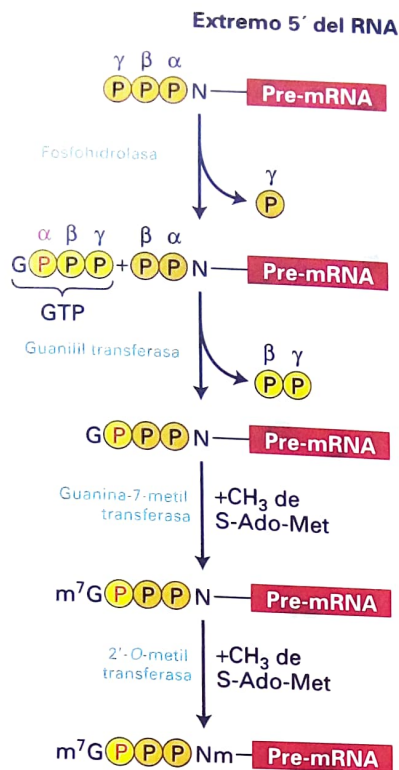


FIGURA 8-3 Síntesis del casquete 5' en los mRNA eucariontes. El extremo 5' de un RNA naciente contiene un 5' trifosfato a partir del NTP iniciador. El fosfato γ es eliminado en el primer paso de la formación del casquete, mientras que los fosforilos α y β restantes (anaranjado) permanecen asociados con el casquete. El tercer fosfato del enlace 5',5'-trifosfato deriva del α -fosfato de GTP que dona la guanina. El metil donante para la metilación de la guanina del cap y la primera de las dos ribosas del mRNA es S-adenosilmetionina (S-Ado-Met). [Tomado de S. Venkatesan y B. Moss, 1982, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 79:304.]

añade una caperuza de protección de 7-metilguanosina y ribosas metiladas en el extremo 5' de los mRNA eucariontes (véase la Fig. 4-14). El 5' cap marca a las moléculas de RNA como precursores de mRNA y las protege de las enzimas que digieren RNA (5'-exorribonucleasas) en el núcleo y el citoplasma. Este paso inicial en el procesamiento del RNA está catalizado por una enzima dimérica formadora de la caperuza, que se asocia con el dominio carboxilo terminal (CTD) fosforilado de la RNA polimerasa II. Cabe recordar que el CTD es fosforilado por el factor de transcripción general TFIIF en múltiples serinas en la posición 5 en la repetición heptapéptido del CTD durante la iniciación de la transcripción (véase la Fig. 7-17). La unión de los CTD fosforilados estimula la actividad formadora de la caperuza de las enzimas, de manera tal que se centran en los RNA que contienen un 5'-trifosfato que emerge de la RNA polimerasa II y no sobre los RNA transcritos por la RNA polimerasa I o III, los cuales no tienen un CTD. Esto es importante debido a que la síntesis de pre-mRNA representa solo el ~ 80% del RNA total sintetizado en las células replicativas. Alrededor del 20% es RNA prerribosómico el cual es transcrito por la RNA polimerasa I, el rRNA 5S y los tRNA, así como por otros RNA pequeños estables que son transcritos por la RNA polimerasa III. Los dos mecanismos de: (1) unión de la enzima formadora de casquete al iniciado por la RNA polimerasa II, específicamente a través de su único CTD fosforilado y (2) la activación de la enzima formadora del casquete mediante el CTD fosforilado, dan

como resultado la formación de casquetes en los RNA específicamente transcritos por la RNA polimerasa II.

Una subunidad de la enzima formadora del casquete elimina el fosfato γ del extremo 5' del RNA naciente (Fig. 8-3). Otro dominio de la subunidad transfiere el resto GMP del GTP al 5'-difosfato del transcrito naciente, creando la estructura inusual de guanosina 5'-5'-trifosfato. En los pasos finales, enzimas separadas transfieren grupos metilos desde la S-adenosilmetionina a la posición N7 de la guanina y uno o dos oxígenos 2' de las ribosas en el extremo 5' del RNA naciente.

Existe considerable evidencia que indica que la formación del casquete del transcrito naciente está acoplada a la elongación por la RNA polimerasa II, de manera tal que a todos sus transcritos se les coloca casquete durante la primera fase de la elongación. Como se analizó en el Capítulo 7, en los metazoos, durante la fase inicial de la transcripción de la polimerasa se alarga el transcrito naciente muy lentamente, debido a la asociación de NELF (factor de elongación negativo) con la RNA polimerasa II en la región proximal al promotor (véase la Fig. 7-20). Una vez que el extremo 5' del RNA naciente tiene casquete, la fosforilación del CTD en la posición 2 de la repetición heptapéptido de la RNA polimerasa y del NELF y DSIF por parte de la proteincinasa CDK9-ciclina T, causa la liberación del NELF. Esto permite que la RNA polimerasa II entre en un modo rápido de elongación que transcribe rápidamente alejándose del promotor. El efecto neto de este mecanismo es que la polimerasa espera que se le coloque el casquete al RNA naciente antes de alargar a una velocidad rápida.

Un grupo diverso de proteínas con dominios de unión al RNA conservados se asocian con los pre-mRNA

Como se mencionó anteriormente, ni los transcritos de RNA nacientes de genes que codifican proteínas ni los intermediarios del procesamiento de mRNA, colectivamente llamados como **pre-mRNA**, existen como moléculas en el núcleo de las células eucariontes. A partir del momento en que los transcritos nacientes emergen por primera vez de la RNA polimerasa II hasta que los mRNA maduros son transportados al citoplasma, las moléculas de RNA están asociadas con un grupo abundante de proteínas nucleares. Estas son los principales componentes proteicos de las *partículas de ribonucleoproteína heterogéneas* (hnRNP), que contienen al *RNA heterogéneo nuclear* (hnRNP), un término colectivo referente al pre-mRNA y a otros RNA nucleares de diversos tamaños. Estas proteínas hnRNP contribuyen con los siguientes pasos en el procesamiento del RNA, incluyendo el corte y empalme, la poliadenilación y la exportación a través del complejo del poro nuclear hasta el citoplasma.

Los investigadores identificaron las proteínas hnRNP al exponer primero células cultivadas a altas dosis de irradiación con UV, lo cual causa el entrecruzamiento de enlaces covalentes entre las bases de RNA y proteínas estrechamente asociadas. La cromatografía de los extractos nucleares de las células tratadas en una columna de celulosa con oligo-dT, que une a los RNA con una cola de poli(A), se utilizó para recuperar las proteínas que se han entrecruzado con el RNA nuclear poliadenilado. El tratamiento subsecuente de los extractos celulares (a partir de células no irradiadas) con anticuerpos monoclonales específicos para las principales proteínas identificadas por esta técnica de entrecruzamiento, reveló un complejo grupo de proteínas hnRNP abundantes que varían en tamaño desde ~ 30 hasta ~ 120 kDa.

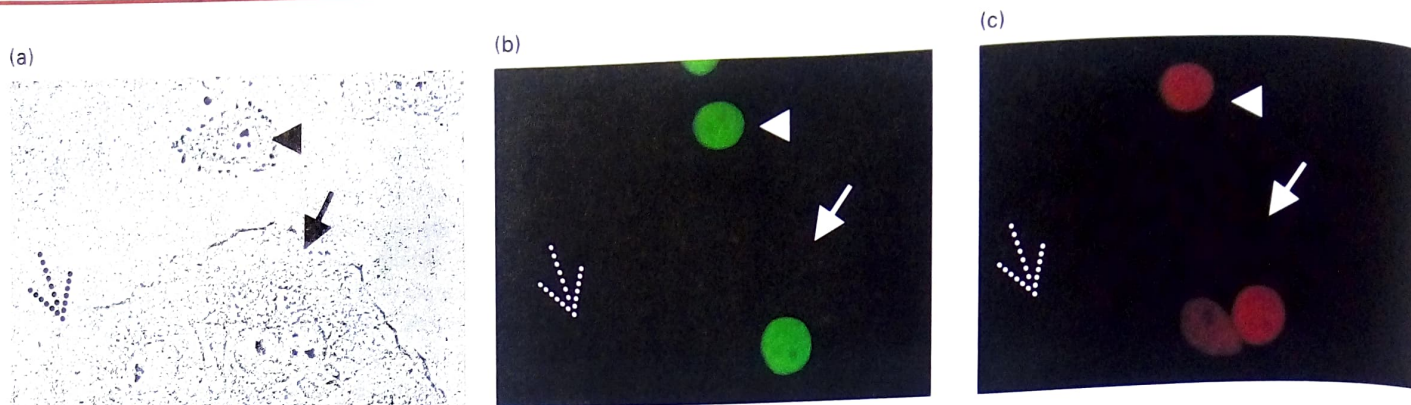


FIGURA 8-4 La proteína hnRNP A1 puede alternar adentro y afuera del citoplasma, pero la proteína hnRNP C no. Las células cultivadas HeLa y las células de *Xenopus* se fusionaron mediante tratamiento con polietilenglicol, produciendo heterocariontes que contienen núcleos de cada tipo de célula. Las células híbridas se trataron con cicloheximida inmediatamente después de la fusión a fin de evitar la síntesis de proteína. Después de 2 horas, las células se fijaron y se tiñeron con anticuerpos marcados con fluorescencia, específicos para las proteínas humanas hnRNP C y A1. Estos anticuerpos no se unen a las proteínas homólogas de *Xenopus*. (a) Una preparación fijada, visualizada mediante microscopía por contraste de fase, incluye a las células HeLa fusionadas (cabeza de flecha) y a las células de *Xenopus* (flecha de puntos), así como también a los heterocariontes fusionados (flechas sólidas). En el heterocarionte en esta microfotografía, el núcleo de la célula HeLa redondo se encuentra a la

derecha del núcleo ovalado de *Xenopus*. (b, c) Cuando la misma preparación se visualizó mediante microscopía por fluorescencia, la proteína hnRNP C teñida apareció verde y la proteína A1 roja. Nótese que la célula de *Xenopus* no fusionada a la izquierda no está teñida, confirmando que los anticuerpos son específicos para las proteínas humanas. En los heterocariontes, la proteína hnRNP C aparece solo en el núcleo de la célula HeLa (b), mientras que la proteína A1 aparece tanto en el núcleo de la célula HeLa como en el núcleo de *Xenopus* (c). Dado que la síntesis de proteína se bloqueó después de la fusión de las células, algunas de las proteínas hnRNP A1 humanas deben haber dejado el núcleo de la célula HeLa y se movieron a través del citoplasma, entrando luego al núcleo de la célula de *Xenopus* en el heterocarionte. (Véase S. Pinol-Roma y G. Dreyfuss, 1992,

Nature 355:730; cortesía de G. Dreyfuss.)

Al igual que los factores de transcripción, la mayoría de las proteínas hnRNP tienen una estructura modular. Contienen uno o más dominios de unión al RNA y al menos uno de los otros dominios que interactúan con otras proteínas. Se han identificado diferentes motivos de unión al RNA creando proteínas hnRNP con secuencias aminoácidas perdidas y se ha evaluado su capacidad de unión al RNA.

Funciones de las proteínas hnRNP La asociación de pre-mRNA con proteínas hnRNP evita que los pre-mRNA formen estructura secundarias cortas dependientes del apareamiento de bases de regiones complementarias, tornando accesibles de esta forma a los pre-mRNA para la interacción con otras proteínas o moléculas de RNA. Los pre-mRNA asociados con las proteínas hnRNP presentan un sustrato más uniforme para los subsiguientes pasos de procesamiento que si estuviesen libres (pre-mRNA no unidos), en los cuales cada mRNA forma una única estructura secundaria debido a su secuencia específica.

Los estudios de unión con las proteínas hnRNP purificadas indican que diferentes proteínas se asocian con distintas regiones de una molécula de pre-mRNA recién sintetizada. Por ejemplo, las proteínas hnRNP A1, C y D se unen preferentemente a las secuencias ricas en pirimidina en los extremos 3' de los intrones (véase la Fig. 8-7). Algunas proteínas hnRNP interactúan con la secuencia RNA que especifica el corte y empalme del RNA o el corte/poliadenilación y contribuyen al reconocimiento de la estructura por parte de los factores de procesamiento del RNA. Finalmente, los experimentos de fusión de células han demostrado que algunas proteínas hnRNP permanecen localizadas en el núcleo, mientras que otras alternan entre aden-

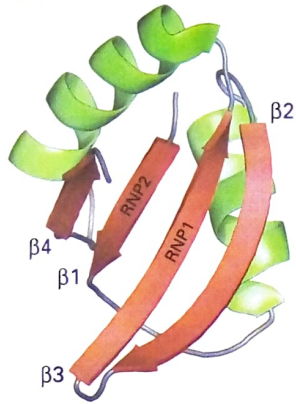
tro y afuera del citoplasma, lo cual sugiere que funcionan en el transporte de mRNA (Fig. 8-4).

Motivos de unión al RNA conservados El motivo de reconocimiento al RNA (RPM), también llamado motivo RNP y dominio de unión al RNA (RBD), es el dominio de unión al RNA en las proteínas hnRNP. Este dominio de ~ 80 residuos, que se produce en muchas otras proteínas de unión al RNA, contiene dos secuencias altamente conservadas (RNP1 y RNP2) que se encuentran en otros organismos que van desde las levaduras hasta los seres humanos, lo cual indica que al igual que muchos dominios de unión al DNA, ellos se desarrollaron temprano en la evolución eucariote.

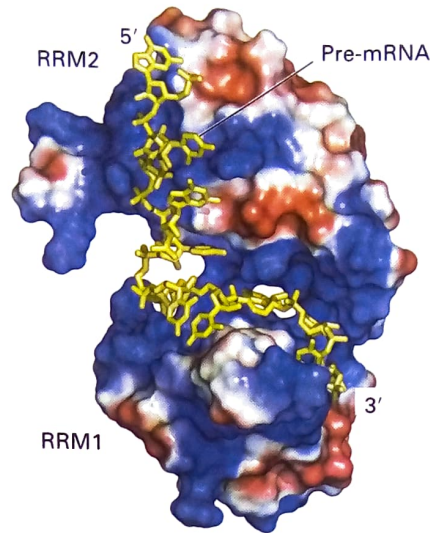
Los análisis estructurales demostraron que el dominio RRM consiste en una lámina β de cuatro hebras flanqueada en un lado por dos hélices α . Para interactuar con el fosfato cargado negativamente del RNA, la lámina forma una superficie cargada positivamente. Las secuencias conservadas RNP1 y RNP2 se encuentran a cada lado de las dos hebras β centrales, y sus cadenas laterales hacen múltiples contactos con una región de RNA de una hélice que se encuentra a través de la superficie de la lámina β (Fig. 8-5).

El motivo KH de 45 residuos se encuentra en las proteínas K hnRNP y en varias otras proteínas de unión al RNA. La estructura tridimensional de los dominios KH representativos es similar a la de los dominios RRM pero más pequeña, consistiendo en una lámina β de tres hebras flanqueada a un lado por dos hélices α . No obstante, el dominio KH interactúa con el RNA de manera muy diferente al dominio RRM. El RNA se une al dominio KH mediante interacción con la superficie

(a) Motivo de reconocimiento de RNA (RRM)



(b) Dominios RRM de sex-lethal (Sxl)



(c) Proteína de unión a segmento de polipirimidina (PTB)

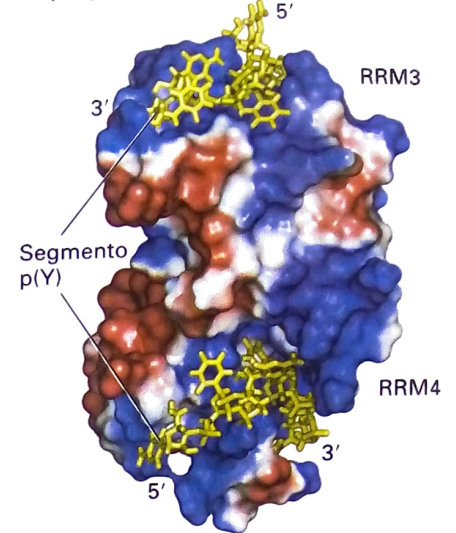


FIGURA 8-5 Estructura del dominio RRM y su interacción con el RNA.

(a) Diagrama del dominio RRM que muestra las dos hélices α (verde) y cuatro hojas β (rojo) que caracterizan a este motivo. Las regiones conservadas RNP1 y RNP2 se localizan en las dos hojas β centrales. (b) Representación superficial de dos dominios RRM en la proteína Sex-lethal (Sxl) de *Drosophila*, que se unen a una secuencia de nueve bases en el pre-mRNA de transformer (se trata del nombre de un gen) (amarillo). Los dos RRM están orientados como las dos partes de un par abierto de castañuelas, con la hoja β del RRM1 orientada hacia arriba y la hoja β del RRM2 orientada hacia abajo. Las regiones cargadas positivamente en la proteína Sxl se muestran como sombras en azul; las re-

giones cargadas negativamente, en sombras en rojo. El pre-mRNA se une a las superficies de las hojas β cargadas positivamente, haciendo el mayor contacto con las regiones RNP1 y RNP2 de cada RRM. (c) Sorprendentemente la orientación diferente de los dominios RRM en una hnRNP diferente, el segmento de polipirimidina de unión a proteína (PTB), ilustra que los RRM están orientados en diferentes posiciones relativas en diferentes hnRNP; los colores son como en (b). El RNA de polipirimidina [p(Y)] de una hélice se une con las hojas β hacia arriba (RRM3) y hacia abajo (RRM4). El RNA se muestra en amarillo. (Parte [a] adaptado de K. Nagai y cols., 1995 *Trends Biochem. Sci.* **20**:235. Parte [b] después N. Harada y cols., 1999 *Nature* **398**:579. Parte [c] después F. C. Oberstrass y cols., 2006 *Science* **309**:2054.)

hidrófoba constituida por las hélices α y una lámina β . La caja RGG, otro motivo de unión al RNA que se encuentra en las proteínas hnRNP, contiene cinco repeticiones Arg-Gly-Gly (RGG) con diversos aminoácidos aromáticos intercalados. Aunque todavía no se ha determinado la estructura de este motivo, su naturaleza rica en arginina es similar a la de los dominios de unión al RNA de la proteína Tat del HIV. Los dominios KH y las repeticiones RGG suelen estar diseminados en dos o más grupos, en una única proteína de unión al RNA.

El proceso de corte y empalme se produce en secuencias cortas, conservadas en los pre-mRNA a través de dos reacciones de transesterificación

Durante la formación de un mRNA maduro, funcional, se eliminan los **intrones** y se unen los **exones**. Para las unidades de transcripción cortas, el proceso de **corte y empalme del RNA** en general es seguido por el corte y la poliadenilación del extremo 3' del transcrito primario, como se describe en la **Figura 8-2**. Sin embargo, para las unidades de transcripción largas que contienen múltiples exones, el corte y empalme de los exones en el RNA naciente comienza antes de que se complete la transcripción del gen.

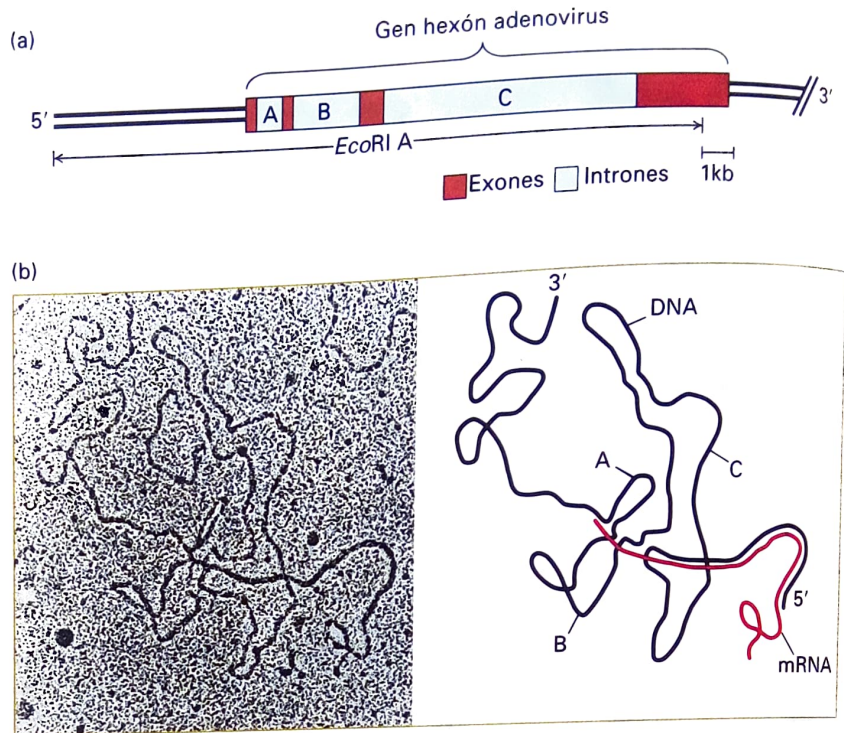
Los investigadores pioneros en el procesamiento nuclear de los mRNA, revelaron que los mRNA inicialmente se transcriben como moléculas de RNA mucho más largas que los mRNA ya maduros en el citoplasma. También se demostró que las secuencias cerca del 5' cap añadidas poco tiempo después de la iniciación de la transcripción son retenidas en el mRNA maduro y que las secuencias de RNA cerca del

extremo poliadenilado de los intermediarios del procesamiento del mRNA en los hnRNA son retenidos en el mRNA maduro en el citoplasma. La solución a este aparente acertijo provino del descubrimiento mediante microscopía electrónica de los intrones de los híbridos RNA-DNA del DNA de adenovirus y el mRNA que codifica hexón, una proteína importante de la cápside del virión (**Fig. 8-6**). Otros estudios revelaron que los RNA virales nucleares que eran colineales con el DNA viral (los transcritos primarios) y los RNA con uno o dos de los intrones eliminados (intermediarios del procesamiento). Esto da como resultado, junto con los hallazgos más tempranos, de que la caperuza 5' y la cola de poli(A) 3' en cada extremo de los precursores largos del mRNA son retenidos en los mRNA citoplasmáticos, más cortos y maduros, lo que permitió comprender que los intrones son eliminados de los transcritos primarios y los exones son unidos.

La localización de los **sitios de corte y empalme**, es decir, de las uniones exón-intrón en un pre-mRNA se puede determinar al comparar la secuencia del DNA genómico con la del cDNA preparado a partir del correspondiente mRNA (véase la **Fig. 5-15**). Las secuencias que están presentes en el DNA genómico, pero ausentes en el cDNA, representan los intrones e indican las posiciones de los sitios de corte y empalme. El análisis de un gran número de mRNA diferentes reveló secuencias cortas consenso, moderadamente conservadas en los sitios de corte y empalme, que flanquean a los intrones en los pre-mRNA eucariontes; una región rica en pirimidina justo en la dirección 5' del sitio de corte 3' también es común (**Fig. 8-7**). Estudios de genes mutantes con deleciones introducidas en los intrones, han demostrado que mucha de la porción central de los intrones se puede eliminar sin afectar el proceso de corte y empalme; en general, solo son necesarios

FIGURA EXPERIMENTAL 8-6 La microscopia electrónica de híbridos de DNA molde-mRNA demuestra que los intrones son eliminados durante el proceso de corte y empalme del pre-mRNA.

(a) Diagrama del fragmento de *EcoRI* A del adenovirus de DNA, que se extiende desde el extremo izquierdo del genoma hasta antes del exón del extremo final del gen hexón. El gen consiste en tres exones cortos y uno largo (~ 3,5 kb) separados por tres intrones de ~ 1, 2,5 y 9 kb. (b) Microfotografía electrónica (izquierda) y dibujo esquemático (derecha) de un híbrido entre un fragmento de DNA *EcoRI* A y un mRNA de hexón. Los lazos marcados como A, B, y C corresponden a los intrones indicados en (a). Puesto que estas secuencias intrónicas en el DNA genómico viral no están presentes en el mRNA maduro de hexón, forman un lazo hacia afuera entre las secuencias exónicas que se hibridan con sus secuencias complementarias en el mRNA. (Microfotografía de S. M. Berget y cols., 1977, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 74:3171; cortesía de P. A. Sharp)



30-40 nucleótidos en cada extremo de un intrón para que se produzca el corte y empalme a velocidades normales.

Los análisis de los intermediarios formados durante el procesamiento de los pre-mRNA in vitro llevan al descubrimiento de que el proceso de corte y empalme de los exones se produce a través de dos *reacciones de transesterificación* secuenciales (Fig. 8-8). Los intrones son eliminados como una estructura de lazo, en la cual la 5' G del intrón es unida con un residuo en un enlace inusual 2'-5'-fosfodiéster a una adenosina cerca del extremo 3' del intrón. Este residuo A se denomina *punto de ramificación A*, debido a que se forma una ramificación del RNA en la estructura de lazo. En cada reacción de transesterificación, un enlace fosfoéster es intercambiado por otro. Puesto que el número de enlaces fosfoéster en la molécula no cambia en la reacción, no se consume energía. El resultado neto de estas dos reacciones es que dos exones son ligados y el intrón interviniente es liberado como una estructura de lazo ramificada.

Durante el proceso de corte y empalme, los snRNA forman apareamientos de bases con el pre-mRNA

El proceso de corte y empalme del RNA requiere la presencia de los **RNA nucleares pequeños (snRNA)**, importantes para el apareamiento de bases con el pre-mRNA y ~ 170 proteínas asociadas. Cinco snRNA ricos en U, designados U1, U2, U4, U5 y U6 participan en el proceso de corte y empalme del pre-mRNA. Variando en longitud desde 107-210 nucleótidos, estos snRNA se asocian con 6-10 proteínas cada una en las muchas partículas de ribonucleoproteína nucleares pequeñas (snRNP) en los núcleos de las células eucariotes.

La evidencia definitiva para el papel que cumplen el snRNA U1 en el corte y empalme provino de experimentos que indicaban que el apareamiento de bases entre el sitio de corte y empalme 5' de un pre-mRNA y la región 5' del snRNA U1, es necesaria para el corte y em-

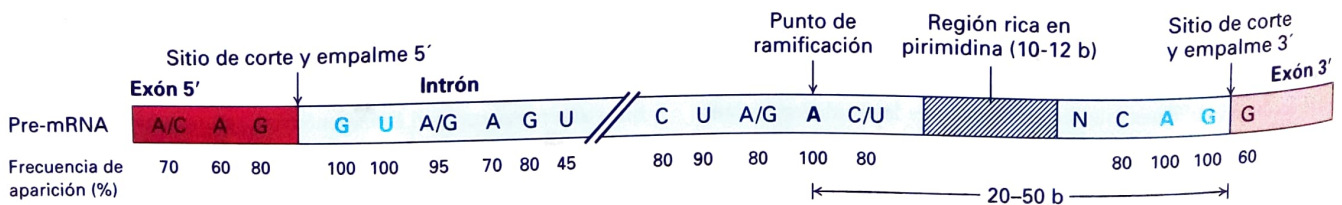


FIGURA 8-7 Secuencia consenso alrededor de los sitios de corte y empalme en los pre-mRNA de vertebrados. Las únicas bases casi invariables son las 5' GU y la 3' AG del intrón (azul), aunque las bases flanqueadas indicadas se encuentran a frecuencias más elevadas de lo esperado sobre la base de una distribución aleatoria. En la mayoría de los casos se encuentra una región rica en pirimidinas (rayada) cerca del extremo 3' del intrón. La adenosina del

punto de ramificación, también invariable, suele estar de 20-50 bases desde el sitio de corte y empalme 3'. La región central del intrón, que puede variar desde 40 bases hasta 50 kilobases en longitud, en general es innecesaria para que se produzca el corte y empalme (véase R. A. Padgett y cols., 1986, *Ann. Rev. Biochem.* 55:1119; E.B. Keller y W. A. Noon, 1984, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 81:7417).

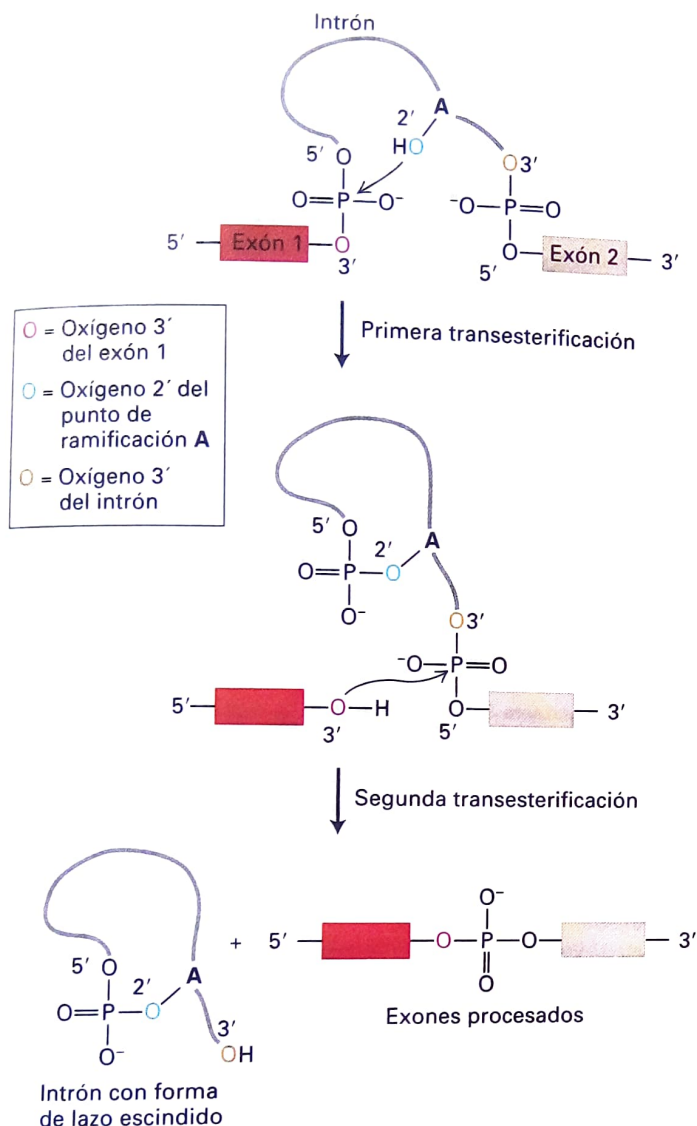


FIGURA 8-8 Dos reacciones de transesterificación que dan como resultado el procesamiento de los exones en el pre-mRNA. En la primera reacción, el enlace éster entre el fósforo 5' del intrón y el oxígeno 3' (rojo oscuro) del exón 1, es intercambiado por un enlace éster con el oxígeno 2' (azul) del residuo A del sitio de ramificación. En la segunda reacción, el enlace éster entre el fósforo 5' del exón 2 y el oxígeno 3' (anaranjado) del intrón es intercambiado por un enlace éster con el oxígeno 3' del exón 1, liberando el intrón como una estructura con forma de lazo y uniendo los dos exones. Las flechas muestran dónde reaccionan los oxígenos hidroxilos activados con los átomos de fósforo.

palme del RNA (Fig. 8-9a). En experimentos *in vitro* se demostró que un oligonucleótido sintético que se hibrida con la región del extremo 5' del snRNA U1 bloquea el corte y empalme del RNA. Los experimentos *in vivo* demostraron que las mutaciones que interrumpen el apareamiento de bases en el sitio de corte 5' del pre-mRNA también bloquean el proceso de corte y empalme del RNA; en este caso, sin embargo, el proceso puede ser restaurado mediante la expresión de un snRNA U1 mutante con una transformación compensatoria que restaura el apareamiento de bases del sitio de corte y empalme 5' del pre-mRNA mutante (Fig. 8-9b). La implicación del snRNA U2 en el corte y empalme se sospechó inicialmente cuando se encontró que tiene una secuencia interna muy complementaria a la secuencia de consenso que

flanquea al punto de ramificación en los pre-mRNA (véase la Fig. 8-7). Los experimentos de compensación de mutaciones, similares a los realizados con los sitios de corte 5' y con los snRNA U1, demostraron que el apareamiento de bases entre el snRNA U2 y la secuencia del punto de ramificación en el pre-mRNA, también son cruciales para el proceso de corte y empalme.

La Figura 8-9a ilustra las estructuras generales de los snRNA U1 y U2, y cómo ellos forman apareamiento de bases con el pre-mRNA durante el corte y empalme. Especialmente, el punto de ramificación A en sí mismo, que no suele formar apareamiento de bases con el snRNA U2, "sobresale" (Fig. 8-10a) permitiendo que su hidroxilo 2' participe en la primera reacción de transesterificación del corte y empalme del RNA (véase la Fig. 8-8).

Estudios similares con otros snRNA demostraron que el apareamiento de bases entre ellos también se produce durante el corte y empalme. Más aún, los reordenamientos en estas interacciones RNA-RNA son cruciales en la vía de corte y empalme, como se describe a continuación.

Los espliceosomas, ensamblados a partir de los snRNP y un pre-mRNA, llevan a cabo el proceso de corte y empalme

Los cinco snRNP del corte y empalme y otras proteínas involucradas en este proceso se ensamblan en un pre-mRNA, formando un complejo ribonucleoproteico grande llamado un **espliceosoma** (Fig. 8-11). El espliceosoma tiene una masa similar a la de un ribosoma. El ensamblado de un espliceosoma comienza con el apareamiento de bases del snRNA U1 en el sitio de corte y empalme 5' y la unión cooperativa de la proteína SF1 (factor 1 del espliceosoma) al punto de ramificación A, y la proteína heterodimérica U2AF (factor asociado a U2) al tramo de pirimidina y al 3' AG del intrón a través de sus subunidades grande y pequeña, respectivamente. Después la snRNP U2 forma apareamientos de bases con la región del punto de ramificación (Fig. 8-9a) a medida que se libera SF1. La extensión del apareamiento entre los snRNA en las snRNP U4 y U6 forma un complejo que se asocia con la snRNP U5. El "tri-snRNP" U4/U6/U5 luego se asocia con el complejo previamente constituido U1/U2/pre-mRNA para generar un espliceosoma.

Después de la formación del espliceosoma, los grandes reordenamientos en el apareamiento de los snRNA y el pre-mRNA llevan a la liberación de la snRNP U1. La Figura 8-10b muestra una estructura mediante microscopía crioelectrónica de este intermediario en el proceso de corte y empalme. Luego se produce un reordenamiento adicional de los componentes del espliceosoma con la pérdida de la snRNP U4. Esto genera un complejo que cataliza la primera reacción de transesterificación, que forma el enlace 2',5'-fosfodiéster entre el hidroxilo 2' en el punto de ramificación A y el fosfato en el extremo 5' del intrón (Fig. 8-9). A continuación de los reordenamientos de las snRNP, la segunda reacción de transesterificación, une los dos exones en un enlace 3',5'-fosfodiéster estándar, liberando al intrón como una estructura de lazo asociada con las snRNP. El complejo final intrón-snRNP se disocia rápidamente y las snRNP individuales liberadas pueden participar en un nuevo ciclo de corte y empalme. El intrón escindido es degradado rápidamente por una enzima desramificante y otras RNasas nucleares que se describen más adelante.

Como se menciona antes, un espliceosoma casi tiene el tamaño de un ribosoma y está compuesto por ~ 170 proteínas, incluyendo ~ 100 "factores de corte y empalme" además de las proteínas asociadas con las cinco snRNP. Esto posibilita la comparación, en cuanto a complejidad,

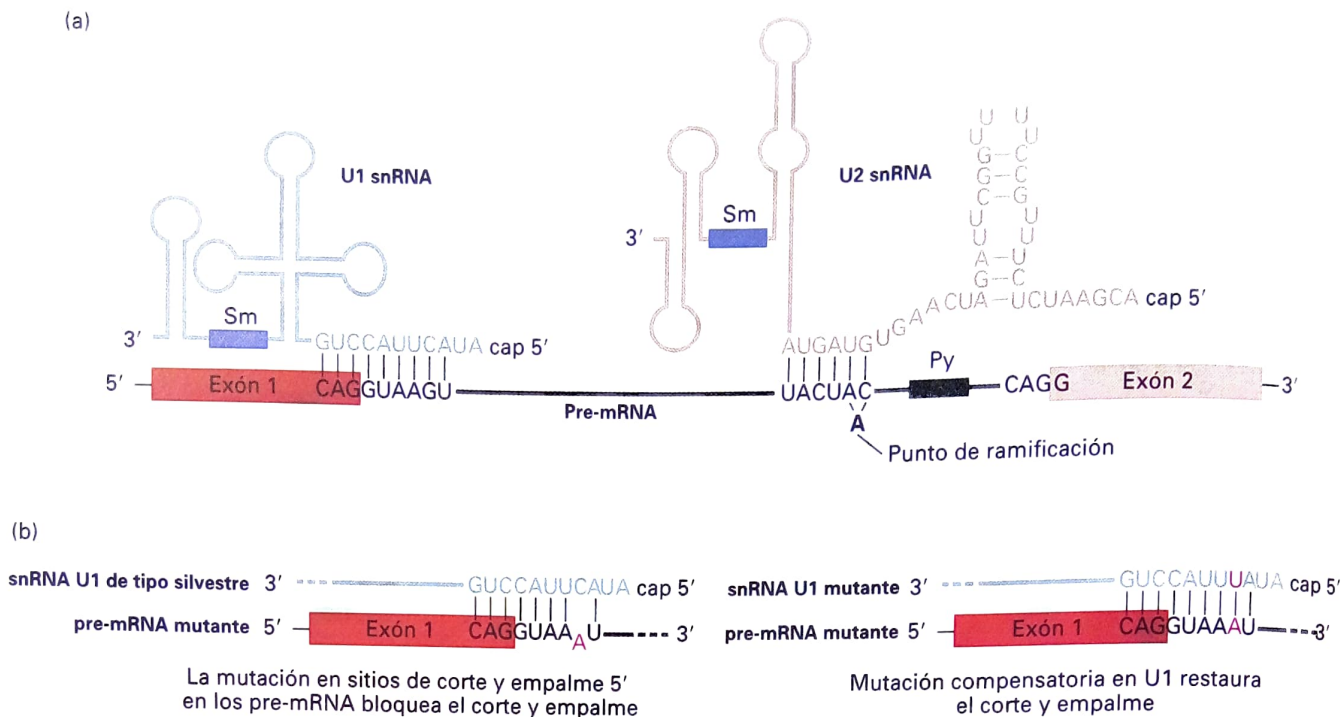


FIGURA 8-9 Apareamiento de bases entre el pre-mRNA, el snRNA U1 y el snRNA U2 temprano en el proceso de corte y empalme. (a) En este diagrama, las estructuras secundarias en los snRNA que no están alteradas durante el corte y empalme se describen de manera esquemática. Aquí se muestra la secuencia del punto de ramificación en levadura. Nótese que snRNA U2 forma apareamiento de bases con una secuencia que incluye al punto de ramificación A, aunque este residuo no se aparea. Los rectángulos violetas representan secuencias que unen proteínas snRNP reconocidas por los anticuerpos anti-Sm. Por razones desconocidas, el antisero de pacientes con la enfermedad autoinmunitaria lupus eritematoso sistémico contiene anticuerpos contra

proteínas snRNP, que han sido útiles en la caracterización de los componentes de la reacción de corte y empalme. (b) Aquí solo se muestran los extremos 5' de los snRNA U1 y los sitios 5' de corte y empalme en los pre-mRNA. (Izquierda) Una mutación (A) en un sitio de corte y empalme del pre-mRNA que interfiere con el apareamiento de bases en el extremo 5' del snRNA U1 bloquea el corte y empalme. (Derecha) La expresión de un snRNA U1 con una mutación compensatoria (U) que restaura el apareamiento de bases, también restaura el corte y empalme del pre-mRNA mutante. (Parte [a] adaptado de M. J. Moore y cols., 1993, en R. Gesteland y J. Atkins, eds. *The RNA World*, Cold Spring Harbor Press, pp. 303-357. Parte [b] véase Y. Zhuang y A. M. Weiner, 1986, *Cell* 46:827.)

VIDEO: Naturaleza dinámica del movimiento del factor de corte y empalme del pre-mRNA en las células vivas

FIGURA 8-10 Estructuras de una A que sobresalen en una hélice RNA-RNA y un intermediario en el proceso de corte y empalme.

(a) Se determinó por cristalografía de rayos X la estructura de un RNA dúplex con la secuencia mostrada, que contiene residuos A que sobresalen en la posición 5 en la hélice de RNA. (b) Los residuos A que sobresalen se extienden desde el lateral de una hélice de RNA-RNA de tipo A. El esqueleto fosfato de una hebra se muestra en verde; el de la otra hebra en azul. La estructura sobre la derecha está girada 90 grados para una vista hacia abajo del eje de la hélice. (c) Una estructura de 30 Å de resolución, de un intermediario del procesamiento de corte y empalme espliceosómico que contiene las snRNP U2, U4, U5 y U6, determinada por microscopía crioelectrónica y reconstrucción de imagen. El complejo snRNP-tri U4/U6/U5 tiene una estructura similar a la del cuerpo triangular de este complejo, lo cual sugiere que estos snRNP se encuentran en la parte inferior de la estructura mostrada aquí y que la cabeza está compuesta en gran medida por la snRNP U2 (Parte [a] y [b] de J. A. Berglund y cols., 2001, *RNA* 7:682. Parte [c] de D. Boehringer y cols., 2004, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11:463. Véase también H. Stark y R. Luhrmann, 2006, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 35:435.)

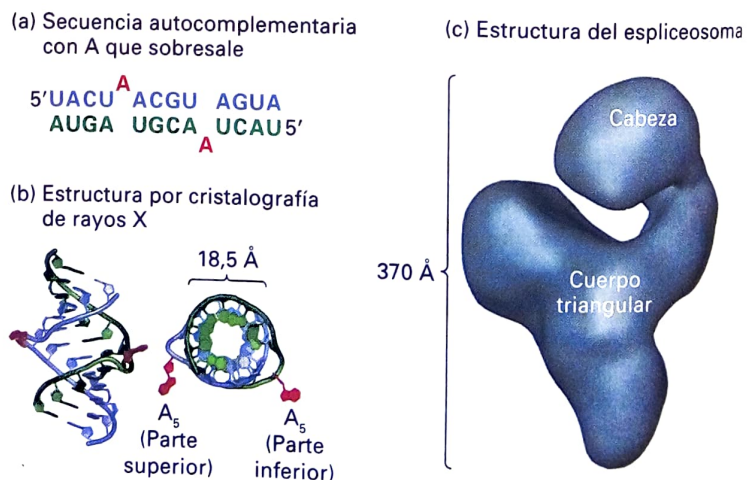
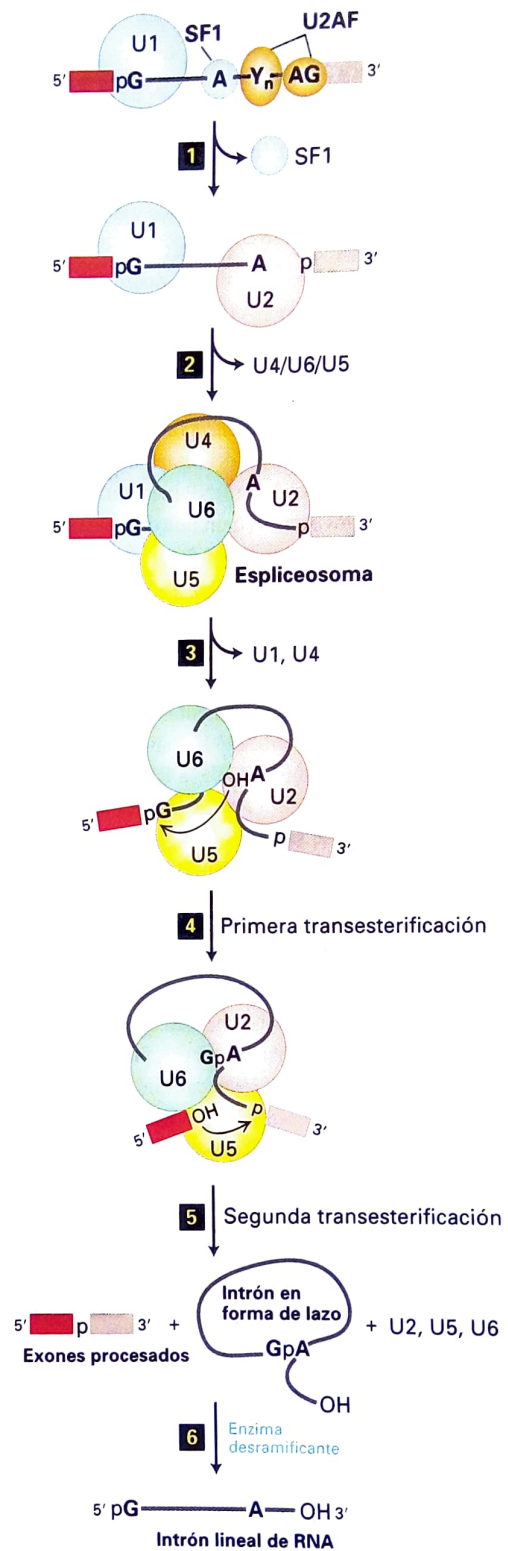


FIGURA 8-11 Modelo de corte y empalme del pre-mRNA mediado por espliceosoma. Paso **1**: después de que U1 forma apareamiento de bases con el sitio de corte y empalme 5' consenso, el SF1 (factor de corte y empalme 1) se une al punto de ramificación A; U2AF (el factor asociado a snRNP U2) se une con el segmento de polipirimidina y el sitio de corte y empalme 3'; y el snRNP U2 se asocia con el punto de ramificación A mediante interacciones de pares de bases que se muestran en la Figura 8-9, desplazando a SF1. Paso **2**: un complejo snRNP trimérico de U4, U5 y U6 se une al complejo inicial para formar el espliceosoma. Paso **3**: los reordenamientos de las interacciones de pares de bases entre los snRNA convierten al espliceosoma en una conformación catalíticamente activa y desestabilizan a los snRNP U1 al U4, que son liberados. Paso **4**: el centro catalítico, que se piensa está formado por U6 y U2, cataliza entonces la primera reacción de transesterificación, formando el intermediario que contiene un enlace 2',5'-fosfodiéster como se muestra en la Figura 8-8. Paso **5**: siguiendo los reordenamientos entre las snRNP, la segunda reacción de transesterificación une los dos exones mediante un enlace 3',5'-fosfodiéster estándar y libera al intrón como una estructura con forma de lazo y a las snRNP restantes. Paso **6**: el intrón con forma de lazo escindido es convertido en un RNA lineal mediante una enzima desramificante. (Adaptado de T. Villa y cols., 2002, *Cell* 109:149.)



del proceso de corte y empalme del RNA con la transcripción y la síntesis de proteína. Algunos de los factores de corte y empalme se asocian con las snRNP, pero otros no. Por ejemplo, la subunidad 65-kD del factor asociado U2 (U2AF) se une a la región rica en pirimidina cerca del extremo 3' de los intrones y a la snRNP U2. La subunidad de 35 kD de U2AF se une al dinucleótido AG en el extremo 3' del intrón y también interactúa con la subunidad U2AF más grande unida en la cercanía. Estas dos subunidades U2AF actúan junto con SF1 para ayudar a especificar el sitio de corte y empalme 3' al estimular la interacción de la snRNP U2 con el punto de ramificación (véase la Fig. 8-11, paso **1**). Algunos factores de corte y empalme también exhiben homología de secuencia para con las RNA helicasas conocidas; estas probablemente son necesarias para los reordenamientos de apareamiento de bases que se producen en las snRNP durante el ciclo de corte y empalme espliceosómico.

A continuación del proceso de corte y empalme, un grupo específico de proteínas hnRNP permanecen unidas al RNA procesado aproximadamente a 20 nucleótidos del 5' de cada unión exón-intrón, formando así un *complejo de unión al exón*. Una de las proteínas hnRNP asociadas con el complejo de unión al exón es el factor de exportación de RNA (REF) que funciona en la exportación de los mRNP totalmente procesados, desde el núcleo hasta el citoplasma, como se analiza en la Sección 8-3. Otras proteínas asociadas con el complejo de unión-exón funcionan en un mecanismo de control de la calidad que lleva a la degradación de los mRNA procesados de modo incorrecto, el cual se conoce como decaimiento mediado por secuencias sin sentido (Sección 8.4).

Una pequeña fracción de los pre-mRNA (< 1% en los seres humanos) contiene intrones cuyos sitios de corte y empalme no concuerdan la secuencia de consenso estándar. Esta clase de intrones comienzan con AU y terminan con AC, en lugar de seguir con la usual "regla GU-AG" (véase la Fig. 8-7). El corte y empalme de esta clase especial de intrones se produce a través de un ciclo de corte y empalme análogo al mostrado en la Figura 8-11, excepto porque están involucradas esas cuatro snRNP nuevas, de poca abundancia, junto con la snRNP U5 estándar.

Casi todos los mRNA funcionales en las células vegetales, de vertebrados

de insectos derivan de una única molécula del pre-mRNA correspondiente mediante eliminación de intrones internos y el corte y empalme de exones. Sin embargo, en dos tipos de protozoos, los tripanosomas y los euglenoides, los mRNA se construyen mediante corte y empalme junto

RNA polimerasa II

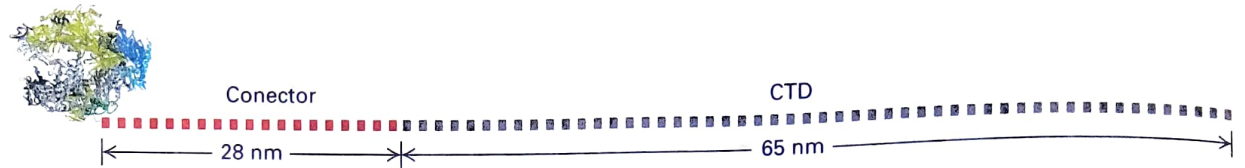


FIGURA 8-12 Diagrama esquemático de la RNA polimerasa II con el CTD extendido. La longitud del dominio carboxilo terminal (CTD) de la RNA polimerasa II de levadura completamente extendido y la región conectora que lo une a la polimerasa se muestran con relación al dominio globular de

la polimerasa. El CTD de la RNA polimerasa II de mamíferos es del doble de largo. En su forma extendida, el CTD se puede asociar con múltiples factores de procesamiento del RNA de manera simultánea. (De P. Cramer, D. A. Bushnell y R. D. Kornberg, 2001, *Science* **292**:1863.)

con moléculas de RNA separadas. Este proceso denominado como *corte y empalme trans* (*trans-splicing*), también se utiliza en la síntesis del 10-15% de los mRNA en el nematodo (gusano *Caenorhabditis elegans*), un organismo modelo importante para el estudio del desarrollo embrionario. El corte y empalme trans es realizado por los snRNP mediante un proceso similar al del corte y empalme de los exones en un único pre-mRNA.

La elongación de la cadena por la RNA polimerasa II está acoplada a la presencia de factores del procesamiento del RNA

¿De qué manera se acopla tan eficientemente el procesamiento del RNA con la transcripción de un pre-mRNA? La clave se encuentra en el dominio carboxilo terminal largo (CTD) de la RNA polimerasa II, la cual, como se describió en el Capítulo 7, está compuesta de múltiples repeticiones de una secuencia de siete residuos (heptapéptido). Cuando se encuentra totalmente extendido, el dominio CTD en la enzima de levadura es de alrededor de 65 nm de largo (Fig. 8-12); el CTD en la RNA polimerasa II humana es de cerca del doble de largo. La notable longitud del CTD aparentemente permite que múltiples proteínas se asocien de modo simultáneo con una única molécula de RNA polimerasa II. Por ejemplo, como se mencionó antes, las enzimas que añaden la caperuza 5' a los transcritos nacientes se asocian con el CTD fosforilado en múltiples serinas en la quinta posición en la repetición heptapéptido (Ser-5), durante o brevemente después de la iniciación de la transcripción por una subunidad del TFIIF. Además, se ha encontrado que los factores de corte y empalme y de la poliadenilación del RNA se asocian con el CTD fosforilado. En consecuencia, estos factores del procesamiento están presentes en altas concentraciones locales cuando la polimerasa transcribe los sitios de corte y empalme y las señales de poli(A), aumentando la velocidad y la especificidad del procesamiento del RNA. En un modelo recíproco, la asociación de las proteínas hnRNP con el RNA naciente potencia la interacción de la RNA polimerasa II con los factores de elongación como el DSIF y la CDK9-ciclina T (P-TEFb) (Fig. 7-20), aumentando la velocidad de la transcripción. Por lo tanto, la velocidad de la transcripción está coordinada con la velocidad del RNA naciente en asociación con las hnRNP y los factores de procesamiento del RNA. Este mecanismo puede asegurar que un pre-mRNA no sea sintetizado a menos que la maquinaria para el procesamiento este posicionada de manera correcta.

Las proteínas SR contribuyen a la definición del exón en los pre-mRNA largos

La longitud promedio de un exón en el genoma humano es de ~ 150 bases, mientras que la longitud promedio de un intrón es mucho más

larga (~ 3 500). ¡Los intrones más largos contienen más de 500 kb! Debido a que los sitios de corte y empalme 5' y 3' y los puntos de ramificación están tan degenerados, es probable que se produzcan múltiples copias aleatorias en los intrones largos.

La información para definir los sitios de cortes y empalme que demarcan los exones está codificada dentro de las secuencias de los exones. Una familia de las proteínas de unión al RNA, las *proteínas SR*, que interactúan con secuencias dentro de los exones llamados *amplificadores de corte y empalme exónicos*. Las proteínas SR son un subgrupo de las proteínas hnRNP analizadas anteriormente y por lo tanto contienen uno o más dominios de unión al RNA RRM. También contienen diversos dominios de interacciones proteínas-proteínas ricos en residuos en arginina (R) y serina (S) llamados dominios (RS). Cuando se unen a los amplificadores de corte y empalme exónicos, las proteínas SR median la unión cooperativa de snRNP U1 a un sitio de corte y empalme 5' verdadero y de snRNP U2 a un punto de ramificación a través de una red de interacciones proteína-proteína que atraviesan un exón (Fig. 8-13). El complejo de proteínas SR, las snRNP y otros factores de corte y empalme (p. ej., U2AF) que se ensamblan a través de un exón el cual ha sido denominado **complejo de reconocimiento a través del exón**, permiten la especificación precisa de los exones en los pre-mRNA largos.



En las unidades de transcripción de los organismos superiores con los intrones largos, los exones no solo codifican las secuencias aminoácidas de diferentes porciones de una proteína, sino que también contienen sitios de unión para las proteínas SR. Las mutaciones que interfieren con la unión de una proteína SR a un amplificador de corte y empalme exónico, incluso si no cambian la secuencia de aminoácido codificada, evitan la formación del complejo de reconocimiento a través del exón. Como resultado, el exón afectado es "omitido" durante el proceso de corte y empalme y no es incluido en el mRNA procesado final. El mRNA truncado producido en este caso es degradado o es traducido a una proteína mutante, de funcionamiento anómalo. Este tipo de mutación se produce en algunas enfermedades genéticas humanas. Por ejemplo, la *atrofia muscular espinal* es una de las causas genéticas más comunes de mortalidad infantil. Esta enfermedad es el resultado de mutaciones en una región del genoma que contiene dos genes muy relacionados, el *SMN1* y el *SMN2*, que surgen por duplicación génica. El *SMN2* codifica una proteína idéntica con el *SMN1*. El *SMN2* se expresa a un nivel mucho menor, debido a que una mutación silenciosa en un exón interfiere con la unión de una proteína SR. Esto lleva a una omisión de exón en la mayoría de los mRNA *SMN2*. El gen *SMN* homólogo en el ratón, donde existe solo una copia, es esencial para la viabilidad celular. La atrofia muscular espinal en los seres humanos es el resultado de mutaciones homocigotas que inactivan al gen *SMN1*. La baja con-

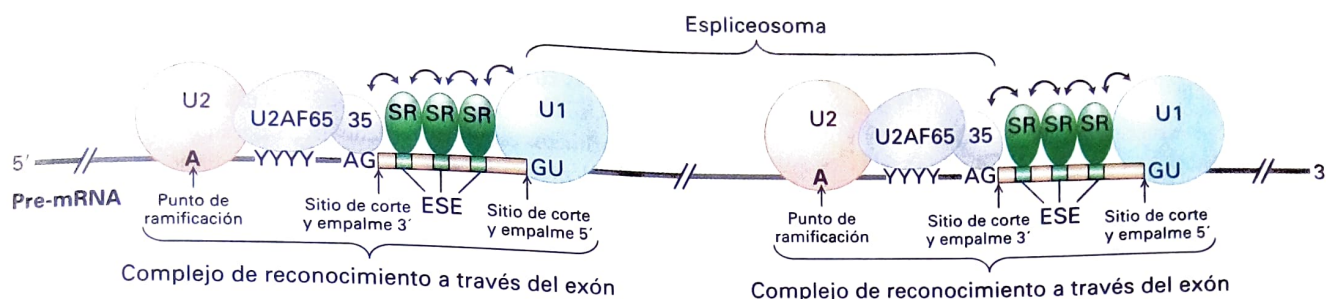


FIGURA 8-13 Reconocimiento de exón a través de la unión cooperativa de las proteínas SR y los factores de corte y empalme para el pre-mRNA.

Los sitios de corte y empalme 5' GU y 3' AG son reconocidos por factores de corte y empalme sobre la base de sus proximidades a los exones. Los exones contienen amplificadores de corte y empalme exónicos, que son sitios de unión para las proteínas SR. Cuando se unen a los amplificadores exónicos, las proteínas SR interactúan una con otra y estimulan la unión cooperativa de la snRNP U1 al sitio de corte y empalme 5' del intrón en dirección 3' de SF1 y luego de snRNP U2 al sitio de ramificación del intrón en dirección 5', de las subunidades de 65 y 35 kD de U2AF al segmento rico en pirimidina y al sitio de corte y empalme AG 3' del intrón en dirección 5', y otros factores de corte

y empalme (no se muestran). El complejo de reconocimiento a través del exón RNA-proteína formado atraviesa un exón y activa los sitios de corte y empalme correctos para el procesamiento del RNA. Nótese que las snRNP U1 y U2 en esta unidad no forman parte del mismo espliceosoma. La snRNP U2 sobre la derecha forma un espliceosoma con la snRNP U1 unida al extremo 5' del mismo intrón. La snRNP U1 mostrada hacia la derecha forma un espliceosoma con la snRNP U2 unida al punto de ramificación del intrón en dirección 3' (no se muestra), y la snRNP U2 sobre la izquierda forma un espliceosoma con un snRNP U1 unido al sitio de corte y empalme 5' del intrón en dirección 5' (no se muestra). Las flechas dobles indican interacciones proteína-proteína. (Adaptado de T. Maniatis, 2002, *Nature* 418:236; véase también S. M. Berget, 1995, *J. Biol. Chem.* 270:2411.)

centración de proteína traducida a partir de la pequeña fracción de los mRNA de *SMN2* que están cortados y empalmados correctamente es suficiente como para mantener la viabilidad celular durante la embriogénesis y el desarrollo fetal, pero es insuficiente para mantener la viabilidad de las neuronas motoras de la médula espinal en la niñez, dando como resultado su muerte y la enfermedad asociada.

Aproximadamente el 15% de las mutaciones de un único par de bases que causa enfermedades genéticas humanas interfieren con la adecuada *definición del exón*. Algunas de estas mutaciones se producen en los sitios de corte y empalme 5' o 3', a menudo dando como resultado el uso de sitios de corte y empalme "crípticos" presentes en la secuencia génica normal. En la ausencia del sitio de corte y empalme normal, el complejo de reconocimiento a través del exón reconoce estos sitios alternativos. Otras mutaciones que causan el corte y empalme anormal producen una nueva secuencia del sitio de corte y empalme consenso, que se torna reconocible en lugar del sitio de corte y empalme normal. Por último, algunas mutaciones interfieren con la unión de proteínas SR específicas contra los pre-mRNA. Estas mutaciones inhiben el corte y empalme en los sitios normales de corte y empalme, como en el caso del gen *SMN2*, y por lo tanto llevan a la omisión del exón. ■

Los intrones del grupo II de autoprocesamiento proporcionan pistas acerca de la evolución de los snRNA

En ciertas condiciones no fisiológicas *in vitro*, las preparaciones puras de algunos transcritos de RNA lentamente cortan los intrones en ausencia de cualquier proteína. Esta observación condujo al reconocimiento de que algunos intrones sufren *autoprocesamiento* de corte y empalme. Se descubrió que dos tipos de intrones se autoprocesan: los *intrones del grupo I*, presentes en los genes de los rRNA de protozoos y los *intrones del grupo II*, presentes en los genes que codifican proteína y algunos genes de rRNA y tRNA en las mitocondrias y cloroplastos de plantas y hongos. El hallazgo de la actividad catalítica de autoprocesamiento

de los intrones revolucionó los conceptos acerca de las funciones del RNA. Como se analizó en el **Capítulo 4**, en la actualidad se sabe que el RNA cataliza la formación del enlace peptídico durante la síntesis de proteína en los ribosomas. Aquí se analiza la probable función de los intrones del grupo II, que ahora se encuentran solo en el DNA de los cloroplastos y mitocondrias, en la evolución de los snRNA; el funcionamiento de los intrones del grupo I se considera en la última sección del procesamiento de los rRNA.

Incluso a pesar de que sus secuencias precisas no están altamente conservadas, todos los intrones del grupo II se pliegan en una estructura secundaria compleja conservada que contiene numerosos bucles (Fig. 8-14a). El autoprocesamiento por parte de un intrón del grupo II se produce a través de dos reacciones de transesterificación, las cuales involucran intermediarios y productos análogos a aquellos encontrados en el corte y empalme del pre-mRNA nuclear. La similitud mecánica entre el autoprocesamiento del intrón del grupo II y el autoprocesamiento del espliceosoma conduce a la hipótesis de que los snRNA funcionan de manera análoga a los bucles en la estructura secundaria de los intrones del grupo II. De acuerdo a esta hipótesis, los snRNA interactúan con los sitios de corte y empalme 5' y 3' de los pre-mRNA así como entre sí, a fin de producir una estructura de RNA tridimensional funcionalmente análoga a la de los grupos de intrones de autoprocesamiento (Fig. 8-14b).

Una extensión de esta hipótesis es que los intrones en los pre-mRNA evolucionaron a partir de intrones del grupo II con autoprocesamiento a través de la pérdida progresiva de estructuras de RNA internas, que simultáneamente evolucionaron a snRNA que actúan *in trans* y llevan a cabo las mismas funciones. El aval para este tipo de modelo evolutivo proviene de experimentos con mutantes de intrones del grupo II, en los cuales se elimina el dominio V y parte del dominio I. Los transcritos de RNA que contienen tales intrones mutantes son defectuosos en el autoprocesamiento, pero cuando se añaden las moléculas de RNA equivalentes a las regiones eliminadas a la reacción *in vitro*, se produce el autoprocesamiento. Este hallazgo demuestra que estos dominios en los intrones del grupo II pueden actuar *in trans*, como los snRNA.

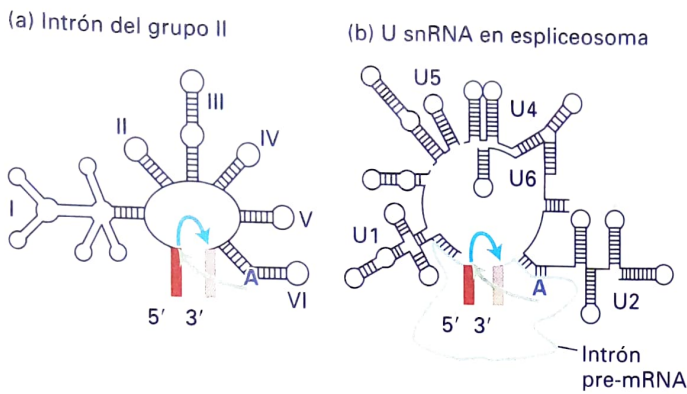


FIGURA 8-14 Comparación de los intrones de autoprocesamiento del grupo II y el espliceosoma. El esquema compara las estructuras secundarias de los intrones de autoprocesamiento (a) del grupo II y (b) los snRNA presentes en los espliceosomas. La primera reacción de transesterificación se indica mediante flechas verdes; la segunda reacción, mediante flechas azules. El punto de ramificación A está en negrita. La similitud de estas estructuras sugiere que los snRNA del espliceosoma evolucionaron a partir de los intrones del grupo II, siendo los snRNA que actúan en trans, funcionalmente análogos a los dominios correspondientes en los intrones del grupo II. Las barras coloreadas que flanquean a los intrones en (a) y (b) representan exones. (Adaptado de P. A. Sharp, 1991, *Science* 254:663.)

La similitud en los mecanismos de autoprocesamiento de los intrones del grupo II y el corte y empalme por espliceosomas de los pre-mRNA, también sugiere que la reacción de corte y empalme está catalizada por el snRNA, no por la proteína, componentes del espliceosoma. Aunque los intrones del grupo II pueden autoprocesarse *in vitro* a temperaturas y concentraciones elevadas de Mg^{2+} , en condiciones *in vivo* las proteínas denominadas *maturasas* (que se unen a los RNA con intrones del grupo II), son necesarias para las interacciones tridimensionales del RNA intrónico necesario para catalizar las dos reacciones de transesterificación de corte y empalme. Por analogía, se piensa que las proteínas snRNP en los espliceosomas estabilizan la geometría precisa de los snRNA y los nucleótidos necesarios para catalizar el corte y empalme de los pre-mRNA.

La evolución de los snRNA pudo haber sido un paso importante en la evolución rápida de los eucariontes superiores. Una secuencia intrónica interna se perdió y sus funciones en el corte y empalme del RNA fueron suplantadas por los snRNA que actúan en trans; las secuencias intrónicas restantes estuvieron libres para divergir. Esto a su vez probablemente facilitó la evolución de nuevos genes a través de la **combinación de exones**, ya que existen pocas restricciones en la secuencia de los nuevos intrones generados en el proceso (véanse las Figs. 6-18 y 6-19). También permitió el incremento en la diversidad de proteínas que resultó a partir del proceso de corte y empalme alternativo del RNA y un nivel adicional de control génico resultante del corte y empalme regulado del RNA.

La escisión 3' y la poliadenilación de los pre-mRNA están estrechamente acopladas

En las células eucariontes todos los mRNA, excepto los mRNA de las histonas, tienen una *cola de poli(A)* 3'. Los principales mRNA de histonas se transcriben a partir de genes repetidos a niveles prodigiosos en las células en proceso de replicación durante la fase S. Ellos sufren

una forma especial de procesamiento del extremo 3' que involucra el corte, pero no la poliadenilación. Proteínas especializadas de unión al RNA, las cuales ayudan a regular la traducción de los mRNA de histonas, se unen al extremo 3' generado por este sistema especializado. Los primeros estudios de adenovirus marcados con pulsos y el RNA de SV40 demostraron que los transcritos primarios virales se extienden más allá del sitio donde se expande la cola de poli(A). Estos resultados sugieren que los residuos de A son añadidos a un hidroxilo 3' generados por escisión endonucleolítica de un transcrito más largo, pero el fragmento predicho de RNA en dirección 3' nunca fue detectado *in vivo*, presumiblemente debido a su rápida degradación. Sin embargo, la detección de ambos productos de escisión se observó en reacciones de procesamiento *in vitro* llevadas a cabo con extractos nucleares de células humanas cultivadas. El proceso de escisión/poliadenilación y la degradación del RNA en la dirección 3' del sitio de corte se produce mucho más lentamente en estas reacciones *in vitro*, simplificando la detección del producto de escisión en dirección 3'.

La secuenciación temprana de los clones de cDNA a partir de células animales demostró que casi todos los mRNA contienen la secuencia AAUAAA de 10-35 nucleótidos *en dirección* 5' de la cola de poli(A) (Fig. 8-15). La poliadenilación de los transcritos de RNA es virtualmente eliminada cuando la secuencia correspondiente en el molde de DNA es mutada a cualquier otra secuencia, excepto a una que constituya una secuencia estrechamente relacionada (AUUAAA). Los transcritos de RNA sin procesar, producidos a partir de tales moldes de mutantes, no se acumulan en los núcleos sino que son degradados rápidamente. Estudios adicionales de mutagénesis revelaron que se necesita una segunda señal en la dirección 3' del sitio de corte para la escisión y la poliadenilación eficiente de la mayoría de los mRNA en las células animales. Esta señal en dirección 3' no es una secuencia específica, sino una rica en GU o simplemente una región rica en U dentro de los ~ 50 nucleótidos del sitio de corte.

La identificación y la purificación de las proteínas necesarias para el corte y la poliadenilación de los pre-mRNA han conducido al modelo mostrado en la Figura 8-15. Un factor de especificidad de corte y poliadenilación (CPSF) de 360 kDa, constituye primero un complejo inestable con la señal de poli(A) AAUAAA en dirección 5'. Luego, al menos tres proteínas adicionales se unen al complejo CPSF-RNA: un heterodímero de 200 kDa llamado *factor estimulante del corte* (CstF), que interactúa con la secuencia rica en G/U; un heterotetrámero de 150 kDa llamado *factor de corte I* (CFI); y un segundo factor de corte heterodimérico (CFII). Se cree que una proteína de ~ 150 kDa llamada *simplekina* forma una plataforma sobre la cual se ensamblan los factores de escisión/poliadenilación. Finalmente, la *poli(A) polimerasa* (PAP) se une al complejo *antes* de que ocurra la escisión. Este requerimiento para la unión del PAP conecta la escisión y la poliadenilación, de manera tal que el extremo 3' generado sea rápidamente poliadenilado y no se pierda información esencial con la degradación por parte de las exonucleasas de un extremo 3' desprotegido.

El ensamblaje del gran **complejo de corte/poliadenilación** multiproteico alrededor de la señal de poli(A) rica en AU en un pre-mRNA, es análogo en muchos aspectos a la formación del complejo de preiniciación de la transcripción en la caja TATA rica en AT de una molécula de DNA molde (véase la Fig. 7-16). En ambos casos, los complejos multiproteicos se ensamblan de manera cooperativa a través de una red de interacciones específicas proteína-ácido nucleico y proteína-proteína.

Tras la escisión en el sitio de poli(A), la poliadenilación procede en dos fases. La adición de los primeros 12 residuos A, aproximadamente,

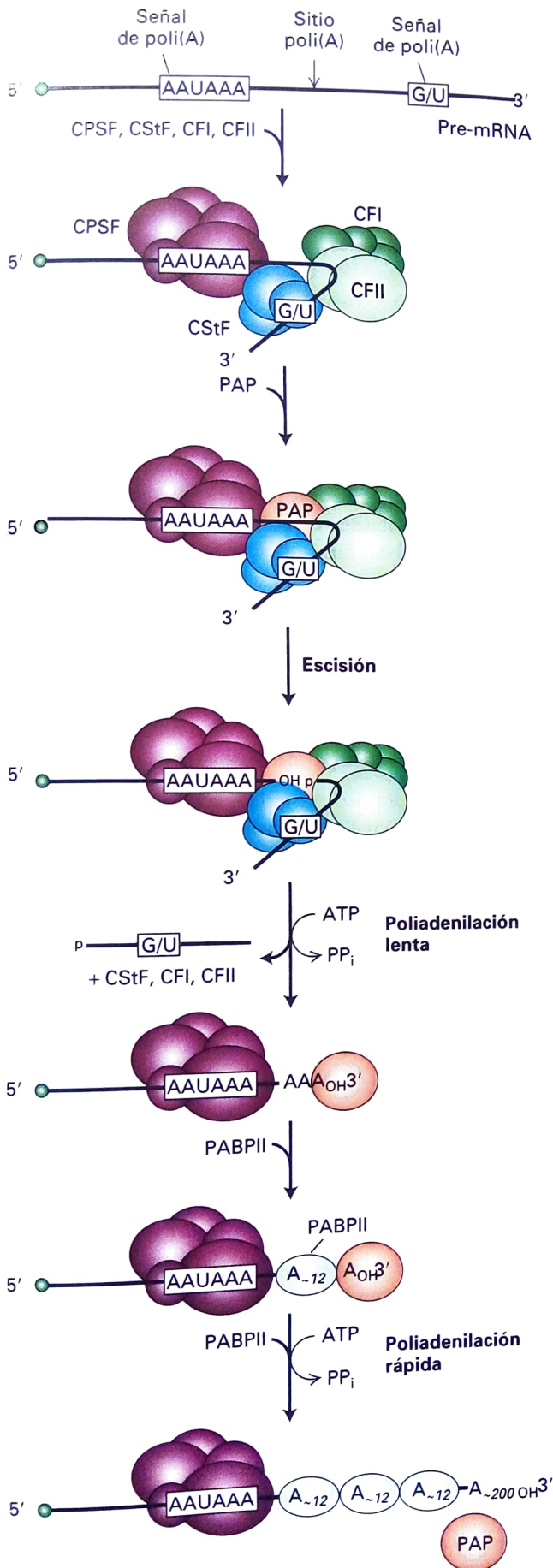


FIGURA 8-15 Modelo para el corte y la poliadenilación de los pre-mRNA en las células de mamífero. El factor de especificidad de corte y la poliadenilación (CPSF) se une a la señal poli(A) AAUAAA en dirección 5'. CStF interactúa con una secuencia rica en U o GU en dirección 3' y con CPSF unido, forma un lazo en el RNA; la unión de CFI y CFII ayuda a estabilizar el complejo. La unión de la poli(A) polimerasa (PAP) después estimula el corte en un sitio poli(A), que suele estar a 10-35 nucleótidos 3' de la señal poli(A) en dirección 5'. Los factores de corte son liberados, a medida que se forma el producto del corte de RNA en dirección 3', el cual es rápidamente degradado. PAP unida luego añade ~ 12 residuos A a una velocidad baja al grupo 3'-hidroxilo generado por la reacción de escisión. La unión de la proteína de unión a poli(A) (PABPII) a la corta cola de poli(A) inicial acelera la velocidad de adición por parte de la PAP. Después de que se añaden 200-250 residuos de A, la PABPII indica a la PAP que detenga la polimerización.

se produce de manera lenta seguida por una adición rápida de unos 200-250 residuos A más. La fase rápida requiere la unión de múltiples copias de una *proteína de unión a poli(A)* que contiene el motivo RRM. Esta proteína es designada *PABPII* para distinguirla de la proteína de unión a poli(A) presente en el citoplasma. *PABPII* se une a la corta cola A agregada inicialmente por la PAP, estimulando la velocidad de polimerización de los residuos adicionales de A, lo que da como resultado la rápida fase de poliadenilación (Fig. 8-15). *PABPII* también es responsable de la señalización de la poli(A) polimerasa para terminar la polimerización cuando la cola de poli(A) alcanza una longitud de 200-250 residuos, aunque el mecanismo para el control de la longitud de la cola aún no se comprende. La unión de la *PABPII* a la cola de poli(A) es esencial para la exportación del mRNA en el citoplasma.

Las exonucleasas nucleares degradan el RNA que es procesado y eliminado de los pre-mRNA

Debido a que el genoma humano contiene intrones largos, solo ~ 5% de los nucleótidos que son polimerizados por la RNA polimerasa II durante la transcripción son retenidos en los mRNA procesados, maduros. Aunque este proceso parece ineficiente, es probable que haya evolucionado en organismos multicelulares dado el proceso de combinación de exones facilitado por la evolución de nuevos genes en organismos con intrones largos (Cap. 6). Los intrones que son eliminados y la región en la dirección 3' del sitio de corte y poliadenilación, son degradados por exonucleasas nucleares que hidrolizan una base cada vez, desde cualquiera de los extremos 5' o 3' de una hebra de RNA.

Como se mencionó anteriormente, el enlace 2',5'-fosfodiéster en los intrones cortados es hidrolizado por una enzima desramificante, produciendo una molécula lineal con extremos desprotegidos los cuales pueden ser atacados por exonucleasas (véase la Fig. 8-11). La vía de decaimiento nuclear predominante es la hidrólisis 3' → 5' por parte de 11 exonucleasas que se asocian unas con otras en un complejo proteico largo llamado el *exosoma*. Otras proteínas en el complejo incluyen la RNA helicasa que interrumpe el apareamiento de bases y las interacciones RNA-proteína, que de otro modo podrían impedir a las exonucleasas. Los exosomas también funcionan en el citoplasma, como se analizará más adelante. Además de los intrones, los exosomas parecen degradar los pre-mRNA que no han sido apropiadamente procesados o poliadenilados. Aún no está claro cómo los exosomas reconocen a los pre-mRNA procesados de manera inadecuada. Pero en las células de levadura con mutantes sensibles a la temperatura

de la poli(A) polimerasa (Fig. 8-15), los pre-mRNA son retenidos en sus sitios de transcripción en el núcleo en la temperatura no permisiva. Estos pre-mRNA procesados anormalmente son liberados en las células con una segunda mutación en una subunidad del exosoma, encontrada solo en los exosomas nucleares y no en los citoplasmáticos (PM-Scl; 100 kD en los seres humanos). Asimismo, los exosomas que se localizan en los sitios de transcripción en los cromosomas politénicos de *Drosophila*, donde están asociados con los factores de elongación de la RNA polimerasa II. Estos resultados sugieren que el exosoma participa en un mecanismo de control de la calidad que aún no se comprende bien, el cual reconoce los pre-mRNA procesados de manera aberrante, evitando su exportación al citoplasma y en última instancia llevándolo a su degradación.

A fin de evitar ser degradados por las exonucleasas nucleares, los transcritos nacientes, los intermediarios del procesamiento de los pre-mRNA y los mRNA maduros en el núcleo deben tener sus extremos protegidos. Como se analizó antes, el extremo 5' de un transcrito naciente está protegido por la adición de la estructura de la caperuza 5' tan pronto como el extremo 5' emerge de la polimerasa. La caperuza 5' está protegida debido a que es incorporada por un *complejo de unión al casquete nuclear*, el cual lo protege de la acción de las 5' exonucleasas y también actúa en la exportación del mRNA al citoplasma. El extremo 3' de un transcrito naciente se encuentra dentro de la RNA polimerasa y por lo tanto es inaccesible a las exonucleasas (véase la Fig. 4-12). Como se describió antes, el extremo 3' libre, generado por la escisión de un pre-mRNA en la dirección 3' del sitio de poli(A), es rápidamente poliadenilado por la poli(A) polimerasa asociada con los otros factores del procesamiento 3', y la cola de poli(A) resultante es unida por la PABPII (Fig. 8-15). Este acoplamiento estrecho del corte y la poliadenilación protege al extremo 3' del ataque por parte de las exonucleasas.

CONCEPTOS CLAVES de la Sección 8.1

Procesamiento del pre-mRNA eucarionte

- En el núcleo de las células eucariontes, los pre-mRNA están asociados con las proteínas hnRNP y procesados por la caperuza 5', el corte y la poliadenilación 3', y el corte y empalme antes de ser transportados al citoplasma (véase la Fig. 8-2).
- Poco tiempo después de la iniciación de la transcripción, las enzimas de la caperuza asociadas con el dominio carboxilo terminal (CTD) de la RNA polimerasa II, que está fosforilada múltiples veces en la serina 5 de la repetición heptapéptido por el TFIIH durante la iniciación de la transcripción, añaden la caperuza 5' del transcrito naciente. Otros factores del procesamiento del RNA involucrados en el corte y empalme del RNA, la escisión 3' y la poliadenilación se asocian con el CTD cuando está fosforilado en la serina 2 de la repetición del heptapéptido, aumentando la velocidad de la elongación de la transcripción. En consecuencia, la transcripción no procede a una velocidad alta hasta que los factores del procesamiento se asocian con el CTD, donde están posicionados para interactuar con el pre-mRNA naciente a medida que emerge de la superficie de la polimerasas.

- Cinco diferentes snRNP interactúan a través del apareamiento de bases una con otras y con el pre-mRNA para formar el espliceosoma (véase la Fig. 8-11). Este complejo ribonucleoproteico muy grande cataliza dos reacciones de transesterificación que unen dos exones y eliminan el intrón como una estructura en forma de lazo, la cual es posteriormente degradada (véase la Fig. 8-8).

- Las proteínas SR que se unen a las secuencias *potenciadoras del corte y empalme exónico* en los exones, son cruciales en definir los exones en los pre-mRNA largos de los organismos superiores. Una red de interacciones entre las proteínas SR (las snRNP) y los factores del corte y empalme del RNA forman un complejo de reconocimiento a través del exón, que especifica los sitios de corte y empalme correctos (véase la Fig. 8-13).

- Se cree que los snRNA en el espliceosoma tienen una estructura terciaria global similar a la de los intrones del autoprocesamiento del grupo II.

- Para las unidades de transcripción largas en los organismos superiores, el corte y empalme de exones suele comenzar a medida que el pre-mRNA todavía se está formando. El corte y la poliadenilación para formar el extremo 3' del mRNA se produce después de que se transcribe el sitio de poli(A).

- En la mayoría de los genes que codifican proteínas, una señal conservada de poli(A) AAUAAA se encuentra ligeramente antes en la dirección 5' de un sitio de poli(A) donde se produce el corte y la poliadenilación. Una secuencia rica en U o GU en la dirección 3' del sitio de poli(A) contribuye a la eficiencia del corte y la poliadenilación.

- Un complejo multiproteico que incluye la poli(A) polimerasa (PAP) lleva a cabo el corte y la poliadenilación de un pre-mRNA. Una proteína nuclear de unión a poli(A), PABPII, estimula la adición de residuos A mediante la PAP y detiene la adición una vez que la cola de poli(A) alcanza los 200-250 residuos (véase la Fig. 8-15).

- Los intrones cortados y el RNA en la dirección 3' del sitio de corte/poli(A) son degradados principalmente por los exosomas, complejos multiproteína que contienen once exonucleasas 3' → 5' a medida, así como RNA helicasas. Los exosomas también degradan inadecuadamente los pre-mRNA.

8.2 Regulación del procesamiento del pre-mRNA

Ahora que hemos visto cómo se procesan los pre-mRNA en los mRNA funcionales, maduros, consideraremos cómo contribuye la regulación de este proceso al control génico. Recuérdese del Capítulo 6 que los eucariontes superiores contienen unidades de transcripción tanto complejas como simples, codificadas en sus DNA. Los transcritos primarios producidos a partir del anterior contienen un sitio de poli(A) y exhiben solo un patrón de corte y empalme del RNA, incluso si se encuentran presentes múltiples intrones; así, las unidades de transcripción simples codifican un único mRNA. Por el contrario, los transcritos primarios producidos a partir de las unidades de transcripción complejas (~92-94% de todas las unidades de transcripción humanas) pueden ser procesadas en formas alternativas para dar diferentes mRNA que codifican proteínas diferentes (véase la Fig. 6-3).

El corte y empalme alternativo genera transcritos con diferentes combinaciones de exones

El descubrimiento de que una gran fracción de unidades de transcripción en los organismos superiores codifica mRNA por corte y empalme alternativos y que los mRNA procesados de manera diferente se expresan en distintos tipos de células reveló que la regulación del corte y empalme del RNA es un mecanismo de control génico importante en los eucariontes superiores. Aunque se conocen muchos ejemplos de corte en sitios poli(A) alternativos en los pre-mRNA, el **corte y empalme alternativo** de diferentes exones es el mecanismo más común para expresar diferentes proteínas a partir de una unidad de transcripción compleja. En el **Capítulo 4**, por ejemplo, mencionamos que los fibroblastos producen un tipo de proteína extracelular fibronectina, mientras que los hepatocitos producen otro tipo. Ambas isoformas de la fibronectina están codificadas en la misma unidad de transcripción, que es procesada de manera alternativa en los dos tipos de células para dar dos mRNA diferentes (véase la **Fig. 4-16**). En otros casos, el procesamiento alternativo puede ocurrir simultáneamente en el mismo tipo celular en respuesta a diferentes señales ambientales o del desarrollo. Primero se analizará uno de los ejemplos mejor comprendidos del procesamiento del RNA regulado y luego se considerarán brevemente las consecuencias del corte y empalme en el desarrollo del sistema nervioso.

Una cascada regulada de corte y empalme del RNA controla la diferenciación sexual en *Drosophila*

Uno de los primeros ejemplos de corte y empalme alternativo regulado del pre-mRNA provino a partir de estudios de diferenciación sexual en *Drosophila*. Los genes necesarios para la diferenciación sexual de *Drosophila* se caracterizaron por primera vez mediante aislamiento de mutantes de *Drosophila* defectuosos en el proceso. Cuando las proteínas codificadas por los genes de tipo silvestre se caracterizaron bioquímicamente, se encontró que dos de ellas regulaban una cascada de corte y empalme alternativo del RNA en embriones de *Drosophila*. Investigaciones más recientes mostraron cómo estas proteínas regulan el procesamiento del RNA y en última instancia llevan a la creación de dos represores de la transcripción específicos del sexo, que suprimen el desarrollo de las características del sexo opuesto.

La proteína Sxl, codificada por el gen *sex-lethal*, es la primera proteína que actúa en la cascada (**Fig. 8-16**). La proteína Sxl está presente solo en los embriones hembra. Temprano en el desarrollo, el gen es transcrito a partir de un promotor que funciona solo en los embriones hembra. Más tarde este promotor específico de las hembras es apagado y se activa otro promotor para *sex-lethal* tanto en embriones hembra como en machos. Sin embargo, en ausencia de la proteína Sxl temprana, el pre-mRNA *sex-lethal* en los embriones macho es procesado para

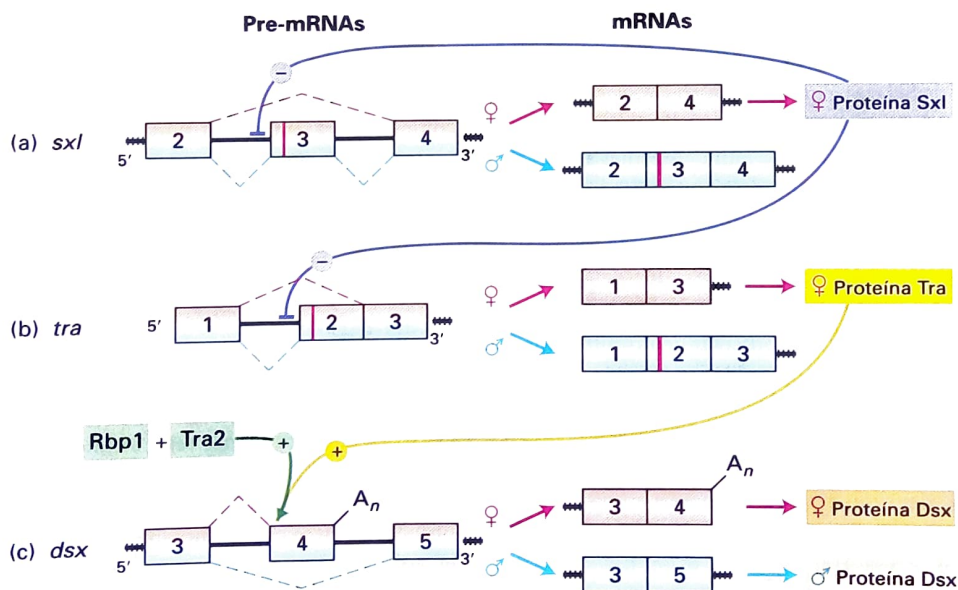


FIGURA 8-16 Cascada regulada de corte y empalme que controla la determinación del sexo en los embriones de *Drosophila*. Para mayor claridad, solo se muestran los exones (rectángulos) y los intrones (líneas negras) donde se produce el corte y empalme. El corte y empalme se indica mediante líneas discontinuas rojas por encima (hembras) y azules por debajo (machos) de los pre-mRNA. Las líneas verticales rojas en los exones indican codones de terminación en marco de lectura, los cuales evitan la síntesis de la proteína funcional. Únicamente los embriones hembra producen la proteína Sxl funcional, que reprime el corte y empalme entre los exones 2 y 3 en el pre-mRNA *sxl* (a) y entre los exones 1 y 2 en el pre-mRNA *tra* (b). (c) Por el contrario, la unión

cooperativa de la proteína Tra y dos proteínas SR, Rbp1 y Tra2, activa el corte y empalme entre los exones 3 y 4 y el corte/poliadenilación (A_n) en el extremo 3' del exón 4 en el pre-mRNA de *dsx* en los embriones hembra. En los embriones macho, que carecen de Tra funcional, las proteínas SR no se unen al exón 4 y en consecuencia el exón 3 es empalmado con el intrón 5. Las proteínas Dsx distintas producidas en los embriones hembra y macho como resultado de esta cascada de cortes y empalmes regulados reprime la transcripción de los genes necesarios para la diferenciación sexual del sexo opuesto. (Adaptado de M. J. Moore y cols., 1993, in R. Gesteland y J. Atkins, eds., *The RNA world*, Cold Spring Harbor Press, pp. 303-357.)

producir un mRNA que contiene un codón de detención temprano en la secuencia. El resultado neto es que los embriones macho producen una proteína Sxl funcional, ya sea temprano o tarde en el desarrollo.

En contraste, la proteína Sxl expresada en los embriones hembra dirige el corte y empalme del pre-mRNA *sex-lethal*, de manera tal que se produzca un mRNA *sex-lethal* funcional (Fig. 8-16a). Sxl logra esto al unirse a una secuencia en el pre-mRNA cerca del extremo 3' del intrón entre el exón 2 y el exón 3, bloqueando de esta forma la asociación adecuada de U2AF y U2 snRNP (Fig. 8-11). En consecuencia, la U1 snRNP unida al extremo 3' del exón 2 se ensambla en un espliceosoma con la U2 snRNP unida en el punto de ramificación en el extremo 3' del intrón entre los exones 3 y 4, llevando al corte y empalme del exón 2 con el exón 4 y saltando el exón 3. El sitio de unión para Sxl en el pre-mRNA de Sxl se denomina *silenciador del corte y empalme intrónico*, debido a su localización en un intrón y su función de bloquear o "silenciar" el uso del sitio de corte y empalme. El mRNA *sex-lethal* resultante específico de las hembras es traducido a una proteína Sxl funcional, que refuerza su propia expresión en los embriones hembra al causar continuamente el saltado del exón 3. Esta ausencia de la proteína Sxl en los embriones macho permite la inclusión del exón 3 y, por ende, del codón de detención que evita la traducción de la proteína Sxl funcional.

La proteína Sxl regula el proceso de corte y empalme alternativo del pre-mRNA del gen *transformer* (Fig. 8-16b). En los embriones machos, donde no se expresa Sxl, el exón 1 es empalmado con el exón 2, que contiene un codón de detención que evita la síntesis de una proteína *transformer* funcional. En los embriones hembra, no obstante, la unión de la proteína Sxl a un silenciador de corte y empalme intrónico en el extremo 3' del intrón entre los exones 1 y 2 bloquea la unión de U2AF en este sitio. La interacción de Sxl con el pre-mRNA *transformer* es mediada por dos dominios RRM en la proteína (véase la Fig. 8-5). Cuando se une Sxl, la unión de U2AF a un sitio de baja afinidad 3' más allá en el pre-mRNA; como resultado el exón 1 es cortado en este sitio de corte 3' alternativo, eliminando el exón 2 con su codón de detención. El mRNA *transformer* específico de hembra resultante, que contiene exones adicionales procesados constitutivamente, es traducido en una proteína Transformer (Tra) funcional.

Finalmente, la proteína Tra regula el procesamiento alternativo del pre-mRNA transcrito a partir del gen *double-sex* (Fig. 8-16c). En los embriones hembra, un complejo de Tra y dos proteínas expresadas constitutivamente, Rbp1 y Tra2, dirigen el empalme del exón 3 con el exón 4 y también estimulan el corte/poliadenilación en el sitio poli(A) alternativo en el extremo 3' del exón 4, lo cual conduce a una versión específica de las hembras, corta, de la proteína Dsx. En los embriones macho, que no producen proteína Tra, el exón 4 es omitido; por lo tanto, el exón 3 es empalmado al exón 5. El exón 5 es empalmado constitutivamente al exón 6, que está poliadenilado en su extremo 3', lo cual conduce a una versión más larga, específica de los machos de la proteína Dsx. La secuencia RNA a la cual se une Tra en el exón 4 se denomina *potenciador del corte y empalme exónico*, puesto que potencia el proceso de corte y empalme en las cercanías del sitio de corte.

Como resultado de la cascada regulada del procesamiento del RNA descrito en la Figura 8-16, en los embriones macho y hembra se expresan diferentes proteínas Dsx. La proteína Dsx macho es un represor de la transcripción que inhibe la expresión de los genes necesarios para el desarrollo de la hembra. A la inversa, la proteína Dsx hembra reprime la transcripción de los genes necesarios para el desarrollo del macho.

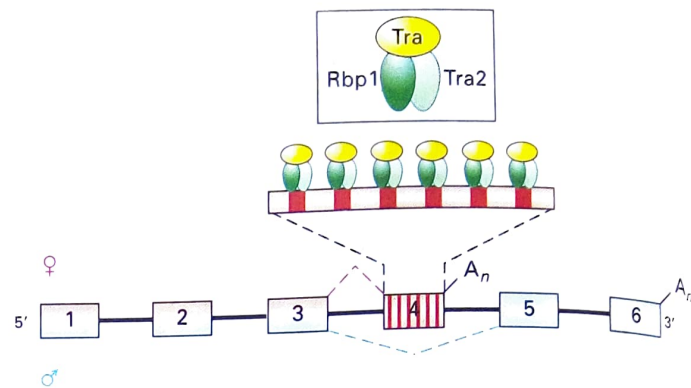


FIGURA 8-17 Modelo de activación del proceso de corte y empalme por la proteína Tra y las proteínas SR Rbp1 y Tra2. En los embriones hembra de *Drosophila*, el corte y empalme de los exones 3 y 4 en el pre-mRNA *dsx* es activado por la unión de los complejos Tra/Tra2/Rbp1 a seis sitios en el exón 4. Debido a que Rbp1 y Tra2 no pueden unirse al pre-mRNA en ausencia de Tra, el exón 4 es saltado en los embriones machos. Véase el texto para más descripción. A_n = poliadenilación. (Adaptado de T. Maniatis y B. Tasic, 2002, *Nature* 418:236.)

La Figura 8-17 ilustra cómo se cree que el complejo Tra/Tra2/Rbp1 interactúa con el pre-mRNA *double-sex* (*dsx*). Rbp1 y Tra2 son proteínas SR, pero no interactúan con el exón 4 en ausencia de la proteína Tra. La proteína Tra interactúa con Rbp1 y Tra2, dando como resultado la unión cooperativa de las tres proteínas a seis potenciadores del corte y empalme exónico en el exón 4. La unión de las proteínas Tra2 y Rbp1 luego promueven la unión de U2AF y U2 snRNP al extremo 3' del intrón entre los exones 3 y 4, al igual que lo hacen otras proteínas SR para los exones procesados constitutivamente (véase la Fig. 8-13). Los complejos Tra/Tra2/Rbp1 pueden potenciar la unión del complejo de corte/poliadenilación al extremo 3' del exón 4.

Los represores y activadores del proceso de corte y empalme controlan este proceso en sitios alternativos

Como se evidencia en la Figura 8-16, la proteína Sxl y la proteína Tra de *Drosophila* tienen efectos opuestos: Sxl evita el corte y empalme, causando que los exones sean omitidos, mientras que Tra promueve dicho corte y empalme. La acción de proteínas similares puede explicar la expresión específica del tipo de célula de las isoformas de la fibronectina en los seres humanos. Por ejemplo, un represor del corte y empalme como Sxl, expresado en los hepatocitos podría unirse a los sitios de corte y empalme de los exones EIIIA y EIIIB en el pre-mRNA de la fibronectina, provocando que los mismos sean omitidos durante el proceso de corte y empalme del RNA (véase la Fig. 4-16). Alternativamente, un activador como Tra expresado en los fibroblastos podría activar los sitios de corte asociados con los exones EIIIA y EIIIB de la fibronectina, llevando a la inclusión de los mismos en el mRNA maduro. El análisis experimental en algunos sistemas ha revelado que la inclusión de un exón en algunos tipos celulares, versus la omisión del mismo exón en otros tipos de células, es el resultado de la influencia combinada de diversos represores y potenciadores del corte y empalme. Los sitios de unión del RNA para los represores, en general proteínas hnRNP, también pueden presentarse en los exones, donde se denominan *silenciadores del corte y empalme exónicos*. Y los sitios de unión para

los activadores del corte y empalme, en general proteínas SR, también se pueden presentar en los intrones, donde se denominan *potenciadores del corte y empalme intrónicos*.

El corte y empalme alternativo de los exones es en especial común en el sistema nervioso, generando múltiples isoformas de muchas proteínas necesarias para el desarrollo y la función neuronal tanto en los invertebrados como en los vertebrados. Los transcritos primarios de estos genes suelen presentar patrones complejos de corte y empalme que pueden generar diferentes mRNA, con diferentes formas procesadas expresadas en distintas localizaciones anatómicas dentro del sistema nervioso central. Consideraremos dos ejemplos notables que ilustran el papel crucial de este proceso en la función neural.

Expresión de las proteínas del canal de K^+ en las células pilosas de vertebrados En el oído interno de los vertebrados, las “células pilosas” individuales (que son neuronas ciliadas) responden muy fuertemente a una frecuencia específica de sonido. Las células sintonizadas a una baja frecuencia (~ 50 Hz) se encuentran en un extremo de la cóclea tubular que constituye el oído interno; las células que responden a una alta frecuencia (~ 5 000 Hz) se encuentran en el otro extremo (Fig. 8-18a). Las células entre los extremos responden a un gradiente de frecuencias entre estos extremos. Un componente en la sintonización de las células pilosas en los reptiles y las aves es la apertura de los canales iónicos de K^+ , en respuesta al aumento de las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} . La concentración de Ca^{2+} a la que el canal se abre determina la frecuencia a la cual el potencial de membrana oscila y por ende, la frecuencia a la que la célula se sintoniza.

El gen que codifica este canal de K^+ activado por Ca^{2+} se expresa como múltiples mRNA procesados de manera alternativa. Las diversas proteínas codificadas por estos mRNA alternativos se abren a diversas concentraciones de Ca^{2+} diferentes. Las células pilosas con diferentes frecuencias de respuesta expresan diversas isoformas de la proteína del canal, dependiendo de su posición a lo largo de la longitud de la cóclea. La variación de la secuencia en la proteína es muy compleja: existen al menos ocho regiones en el mRNA donde se utilizan exones alternativos, permitiendo la expresión de 576 posibles isoformas (Fig. 8-18b). El análisis por PCR de los mRNA a partir de células pilosas individuales, ha demostrado que cada célula pilosa expresa una mezcla de diferentes mRNA de canales de K^+ activados por Ca^{2+} , con diferentes formas que predominan en distintas células de acuerdo a sus posiciones en la cóclea. Este notable ordenamiento sugiere que el proceso de corte y empalme del pre-mRNA del canal de K^+ activado por Ca^{2+} está regulado en respuesta a señales extracelulares, las cuales informan a la célula de su posición a lo largo de la cóclea.

Otros estudios demostraron que el corte y empalme en uno de los sitios de corte alternativos en el pre-mRNA del canal de K^+ activado por Ca^{2+} en la rata, se suprime cuando una proteincinasa específica es activada por despolarización neuronal en respuesta a la actividad sináptica a partir de las neuronas interactuantes. Esta observación eleva la posibilidad de que un represor específico del corte y empalme para este sitio puede ser activado cuando es fosforilado por esta proteincinasa, cuya actividad a su vez está regulada por actividad sináptica. Puesto que las proteínas hnRNP y SR son modificadas en gran extensión por la fosforilación y por otras modificaciones postraduccionales, parece probable que la regulación compleja del proceso de corte y empalme alternativo del RNA a través de modificaciones postraduccionales de los factores del corte y empalme, cumpla una función significativa en la modulación de la función neuronal.

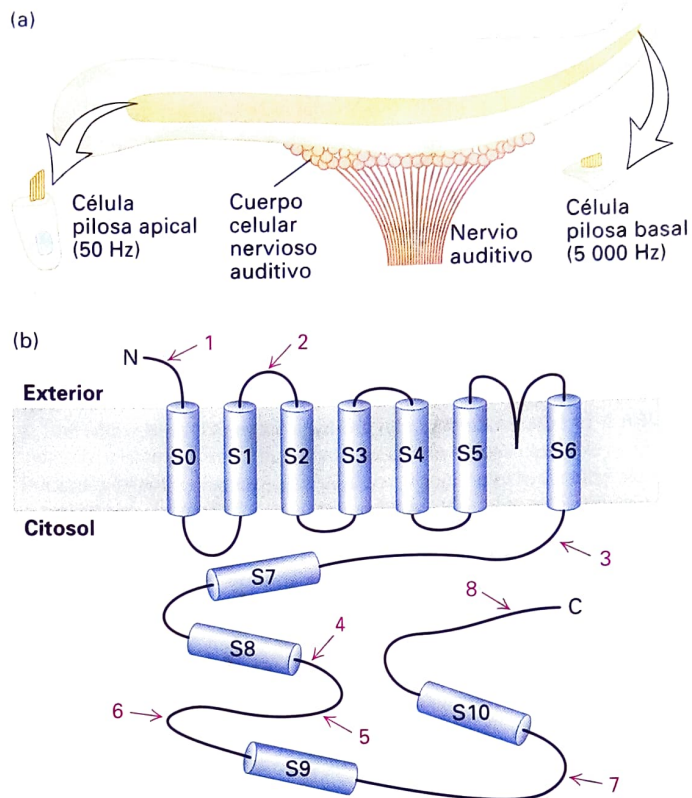


FIGURA 8-18 Función del corte y empalme alternativo en la percepción de los sonidos de diferentes frecuencias. (a) La cóclea del pollo, un tubo de 5 mm de longitud, contiene un epitelio de células pilosas auditivas que se sintonizan con un gradiente de frecuencias vibratorias desde 50 Hz en el extremo apical (izquierda) hasta 5 000 Hz en el extremo basal (derecha). (b) El canal de Ca^{2+} activado por K^+ contiene siete hélices o transmembranas (S0-S6), que se asocian para formar el canal. El dominio citosólico, que incluye cuatro regiones hidrófobas (S7-S10), regula la apertura del canal en respuesta al Ca^{2+} . Isoformas del canal, codificadas por formas alternativas de los mRNA producidos a partir del transcrito primario, se abren a diferentes concentraciones de Ca^{2+} y por lo tanto responden a diferentes frecuencias. Los números rojos se refieren a regiones donde el corte y empalme alternativo produce diferentes secuencias de aminoácidos en varias isoformas. (Adaptado de K. P. Rosenblatt y cols., 1997, *Neuron*, **19**:1061.)



En las neuronas de los vertebrados se han observado muchos ejemplos de genes similares a los que codifican el canal de K^+ coclear; mRNA procesados de manera alternativa, coexpresados a partir de un gen específico en un tipo de neurona, son expresados a diferentes concentraciones correlativas en distintas regiones del sistema nervioso central. Las expansiones en el número de repeticiones de microsatélites dentro de las regiones transcritas de genes expresados en las neuronas, pueden causar una alteración en las concentraciones relativas de los mRNA procesados alternativamente transcritos a partir de múltiples genes. En el Capítulo 6, se analizó cómo el deslizamiento hacia atrás durante la replicación del DNA puede llevar a la expansión de una repetición de microsatélite (véase la Fig. 6-5). Al menos 14 tipos diferentes de enfermedades neurológicas, se producen a partir de la expansión de las regiones de microsatélites dentro de las unidades de transcripción expresadas en las neuronas. Las regiones largas resultantes de las secuencias simples repetidas en los RNA nu-

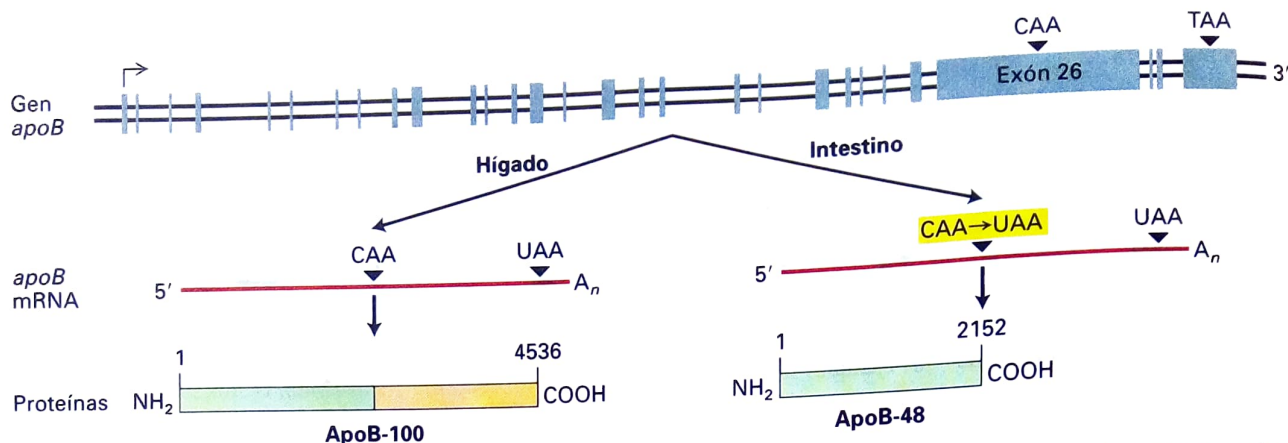


FIGURA 8-19 Edición del RNA del pre-mRNA apo-B. El mRNA apoB producido en el hígado tiene la misma secuencia que los exones en el transcrito primario. Este mRNA es traducido a apoB-100, que tiene dos dominios funcionales: un dominio N-terminal (verde) que se asocia con lípidos y un dominio C-terminal (anaranjado) que se une a los receptores LDL sobre las membranas

celulares. En el mRNA apo-B producido en el intestino, el codón CAA en el exón 26 es editado a un codón de terminación UAA. Como resultado, las células intestinales producen apoB-48, que corresponde al dominio N-terminal de apoB-100. (Adaptado de P. Hodges y J. Scott, 1992, *Trends Biochem. Sci.* 17:77.)

cleares de estas neuronas, dan como resultados anomalías en las concentraciones relativas de los mRNA procesados alternativamente. Por ejemplo, la más común de este tipo de enfermedades, la distrofia miotónica, se caracteriza por parálisis, discapacidad cognitiva y trastornos de la personalidad y del comportamiento. La distrofia miotónica es el resultado del aumento de las copias de las repeticiones CUG en un transcrito para algunos pacientes, o de las repeticiones CCUG en otro transcrito para otros pacientes. Cuando el número de estas repeticiones aumenta a 10 o más veces del número normal de repeticiones en estos genes, las anomalías se observan al nivel de dos proteínas hnRNP que se unen a estas secuencias repetitivas. Esto probablemente se debe a que dichas hnRNP se unen por la concentración anormalmente alta de esta secuencia de RNA en el núcleo de las neuronas en tales pacientes. Se cree que las concentraciones anómalas de estas proteínas hnRNP conducen a las alteraciones en la velocidad del proceso de corte y empalme de diferentes sitios de corte y empalme alternativo, en los múltiples pre-mRNA normalmente regulados por estas proteínas hnRNP. ■

Expresión de las isoformas *Dscam* en las neuronas retinales de *Drosophila* El ejemplo más extremo de procesamiento del RNA alternativo regulado revelado hasta el momento, tiene lugar en la expresión del gen *Dscam* en *Drosophila*. Las mutaciones en este gen interfieren con las conexiones sinápticas hechas entre los axones y las dendritas durante el desarrollo del vuelo. El análisis del gen *Dscam* mostró que contiene 95 exones procesados de manera alternativa, los cuales podrían ser empalmados para generar ¡38 016 isoformas posibles! Resultados recientes demuestran que los mutantes de *Drosophila* con una versión del gen que puede ser procesada en solo alrededor de 22 000 diferentes formas, tienen defectos específicos en la conectividad entre las neuronas. Estos resultados indican que la expresión de la mayoría de las posibles isoformas *Dscam* por medio del corte y empalme regulado del RNA, ayuda a especificar las decenas de millones de diferentes conexiones sinápticas entre las neuronas en el cerebro de *Drosophila*. En otras palabras, el correcto cableado de neuronas en el cerebro requiere del proceso de corte y empalme regulado del RNA.

La edición del RNA altera las secuencias de algunos pre-mRNA

A mediados de la década de 1980, la secuenciación de numerosos clones de cDNA y su DNA genómico correspondiente a partir de múltiples organismos llevó a la inesperado descubrimiento de otro tipo de procesamiento del pre-mRNA. En este tipo de procesamiento, denominado **edición del RNA**, se altera la secuencia de un pre-mRNA; como resultado, el correspondiente mRNA maduro difiere de los exones que lo codifican en el DNA genómico.

La edición del RNA está muy difundida en las mitocondrias de los protozoos y las plantas y también en los cloroplastos. En las mitocondrias de ciertos tripanosomas patógenos, más de la mitad de la secuencia de algunos mRNA está alterada respecto de la secuencia correspondiente en los transcritos primarios. A las adiciones y deleciones de números específicos de U siguen los moldes proporcionados por el apareamiento de bases de RNA "guías" cortos. Estos RNA están codificados por miles de minimoléculas de DNA mitocondrial circulares concatenados, a muy pocas moléculas de DNA mitocondrial grandes. Es incierta la razón para este mecanismo barroco de codificar proteínas mitocondriales en tales protozoos. Pero este sistema representa un punto diana potencial para fármacos que inhiban el complejo procesamiento de enzimas esenciales para el microbio, las cuales no existen en las células de los seres humanos o de otros huéspedes vertebrados.

En los eucariontes superiores, la edición del RNA es mucho más rara y por lo tanto hasta ahora únicamente se han observado cambios de una sola base. Sin embargo, tales ediciones menores revelaron tener consecuencias funcionales significativas en algunos casos. Un ejemplo importante de la edición del RNA en los mamíferos involucra al gen *apoB*. Este gen codifica dos formas alternativas de una proteína sérica central en la captación y al transporte del colesterol. En consecuencia, es importante en los procesos patológicos que llevan a la *ateroesclerosis*, la enfermedad arterial que constituye la principal causa de muerte en los países desarrollados. El gen *apoB* expresa tanto la proteína sérica apolipoproteína B-100 (apoB-100) en los hepatocitos (el principal tipo celular en el hígado) y la apoB-48, expresada en las células intestinales epiteliales. La apoB-48 de ~ 240 kDa corresponde a la región N-

terminal de la apoB-100 de ~ 500 kDa. Como se detalló en el **Capítulo 10**, ambas proteínas apoB son componentes de complejos lipoproteicos grandes que transportan lípidos en el suero. Sin embargo, solo los complejos de lipoproteína de baja densidad (LDL) que contienen la apoB-100 en sus superficies distribuyen el colesterol a los tejidos del cuerpo, mediante su unión al receptor LDL presente en todas las células.

La expresión específica del tipo de célula de las dos formas de apoB es el resultado de la edición del pre-mRNA *apoB*, de manera tal que cambia el nucleótido en la posición 6666 en la secuencia de una C a una U. Esta alteración, que se produce solo en las células intestinales, convierte al codón CAA para la glutamina en UAA (un codón de detención) que lleva a la síntesis de la apoB-48 más corta (**Fig. 8-19**). Estudios con la enzima parcialmente purificada que efectúa la desaminación postranscripcional de C₆₆₆₆ a U, muestran que puede reconocer y editar un RNA tan corto como de 26 nucleótidos con la secuencia que rodea la C₆₆₆₆ en el transcrito primario de *apoB*.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 8.2

Regulación del procesamiento del pre-mRNA

- Debido al corte y empalme alternativo de los transcritos primarios, al uso de promotores alternativos y a la escisión en diferentes sitios poli(A), se pueden expresar diferentes mRNA a partir de un mismo gen en distintos tipos celulares o en diversos estadios del desarrollo (véanse las **Figs. 6-3 y 8-16**).
- El corte y empalme alternativo puede ser regulado por las proteínas de unión al RNA que se unen a secuencias específicas cerca de los sitios de corte y empalme. Los represores pueden bloquear de manera estérica la unión de los factores de corte y empalme a sitios específicos en los pre-mRNA o inhibir sus funciones. Los activadores del corte y empalme amplifican dicho corte y empalme mediante la interacción con factores del corte y empalme, promoviendo de esta manera sus asociaciones con un sitio de corte regulado. Las secuencias de RNA unidas por los represores del corte y empalme se denominan silenciadores del corte y empalme exónico o intrónicos, dependiendo de sus localizaciones en un exón o en un intrón. Las secuencias unidas por los activadores del corte y empalme se denominan potenciadores del corte y empalme intrónico o exónico.
- En la edición del RNA, la secuencia nucleotídica de un pre-mRNA se altera en el núcleo. En los vertebrados, este proceso es bastante raro y comprende la desaminación de una única base en la secuencia del mRNA, dando como resultado un cambio en el aminoácido especificado por el correspondiente codón y la producción de una proteína funcionalmente diferente (véase la **Fig. 8-19**).

8.3 Transporte del mRNA a través de la envoltura nuclear

Los mRNA totalmente procesados en el núcleo permanecen unidos a las proteínas hnRNP en los complejos denominados como *mRNP nucleares*. Antes de que un mRNA pueda ser traducido a la proteína que codifica, debe ser transportado fuera del núcleo al citoplasma. La

envoltura nuclear es una membrana doble que separa el núcleo del citoplasma (véase la **Fig. 9-32**). Al igual que la membrana plasmática alrededor de las células, cada membrana nuclear consiste en una bicapa fosfolipídica impermeable al agua y con múltiples proteínas asociadas. Los mRNP y otras macromoléculas, incluyendo los tRNA y las subunidades ribosómicas, atraviesan la envoltura nuclear a través de los *poros nucleares*. Esta sección se centrará en la exportación de los mRNP a través del poro nuclear y los mecanismos que permiten algún nivel de regulación de este paso. El transporte de otras cargas a través del poro nuclear se analiza en el **Capítulo 13**.

Las macromoléculas entran y salen del núcleo a través de los complejos del poro nuclear

Los **complejos del poro nuclear (CPN)** son estructuras simétricas, grandes, compuestas de múltiples copias de aproximadamente 30 proteínas diferentes llamadas **nucleoporinas**. Embebidas en la envoltura nuclear, los CPN tienen forma cilíndrica con un diámetro de ~ 30 nm (**Fig. 8-20a**). Una clase especial de nucleoporinas, llamadas nucleoporinas FG, alinean el canal central a través del CPN. Las nucleoporinas FG forman una barrera semipermeable la cual permite que pequeñas moléculas se difundan libremente, pero restringe el paso de moléculas grandes. El dominio globular de la nucleoporina FG ancla la proteína en la matriz NPC. A partir de estos anclajes, segmentos largos de enrollamientos al azar se extienden dentro del canal. Estas extensiones están compuestas por secuencias de aminoácidos hidrófilos separados por *repeticiones FG* hidrófobas, secuencias cortas ricas en fenilalanina (F) y glicina (G) hidrófobas. Estos dominios de repeticiones FG integran una nube de cadenas polipeptídicas en el canal central y se extienden hacia el nucleoplasma y el citoplasma, limitando efectivamente la difusión libre de las macromoléculas a través del canal. El agua, los iones, los metabolitos y las pequeñas proteínas globulares de hasta ~ 40-60 kDa pueden difundir a través de la nube de dominios con repeticiones FG. Sin embargo, los dominios FG en el canal central forman una barrera que restringe la difusión de las macromoléculas más grandes entre el citoplasma y el núcleo.

Las proteínas y las RNP más grandes de ~ 40-60 kDa deben ser transportadas de manera selectiva a través de la envoltura nuclear, con la asistencia de proteínas transportadoras solubles que se unen a ellas y también interactúan de manera reversible con las repeticiones FG de las nucleoporinas FG. Como consecuencia de estas interacciones reversibles con los dominios FG, el transportador y su carga establemente unida pueden pasar de dominio FG en dominio FG, permitiendo que ambos difundan a favor del gradiente de concentración desde el núcleo hasta el citoplasma.

Los mRNP son transportados a través de los CPN mediante los *exportadores de mRNP*, un heterodímero que consiste en una subunidad grande, llamada factor de exportación nuclear 1 (NXF1) y una subunidad pequeña, el transportador de exportación nuclear 1 (NXT1) (**Fig. 8-20b**). El NXF1 se une a los mRNP nucleares a través de asociaciones tanto con RNA como con otras proteínas en el complejo mRNP. Uno de los más importantes de estos es el REF (factor de exportación de RNA), un componente de los complejos exón-unión analizados anteriormente, que se une a aproximadamente 20 nucleótidos en la dirección 5' de la unión exón-exón (véase la **Fig. 8-21**). El exportador de mRNP NXF1/NXT1 también se asocia con las proteínas SR unidas a los potenciadores del corte y empalme exónicos. Por lo tanto, las proteínas SR asociadas con los exones funcionan en dirigir tanto el corte

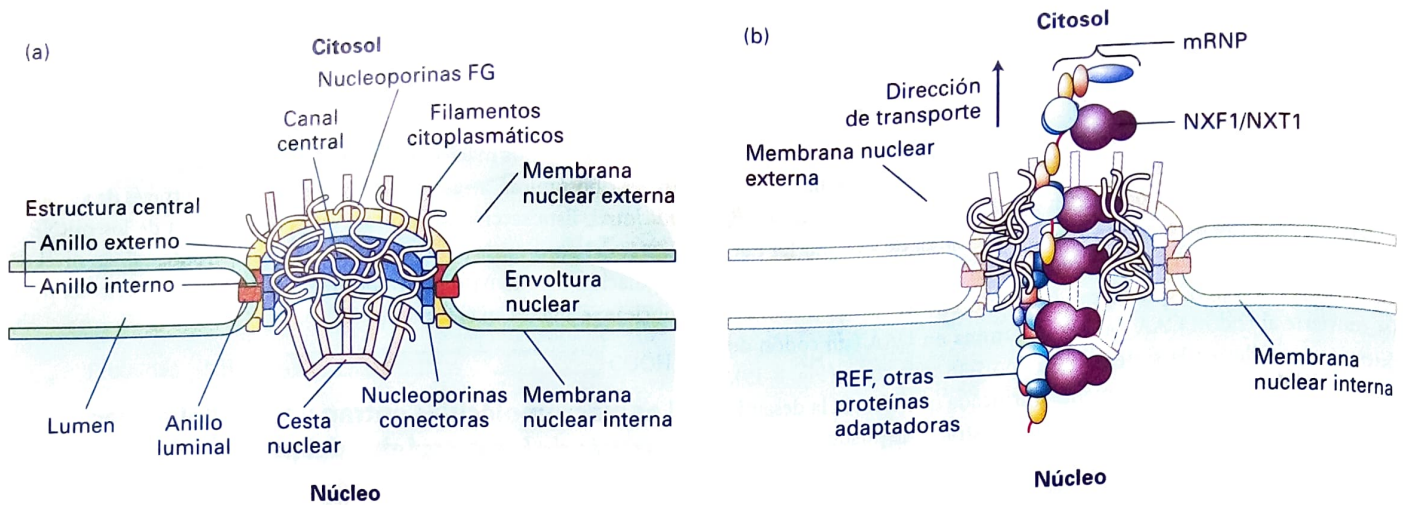


FIGURA 8-20 Modelo del paso del transportador a través del complejo del poro nuclear (NPC). (a) Diagrama para la estructura del NPC. La envoltura nuclear formada por bicapas lipídicas se representa en verde. Las proteínas transmembranas representadas en rojo forman un anillo luminal, alrededor del cual se pliega la membrana para constituir las membranas nucleares interna y externa. Los dominios transmembrana de estas proteínas están conectados a los dominios globulares en el interior del poro al cual se unen otras nucleoporinas, formando la estructura central. Los dominios globulares de las nucleoporinas FG se muestran en púrpura. Los dominios FG de las nucleoporinas FG

(formas de gusanos en color tostado) tienen una conformación aleatoria extendida, que forma una nube molecular de polipéptido aleatorio que se mueve continuamente. (b) Los transportadores nucleares (NXF1/NXT1) tienen regiones hidrófobas sobre sus superficies que se unen de manera reversible a los dominios FG en las nucleoporinas FG. Como consecuencia, ellos pueden penetrar la nube molecular en el canal central del NPC y difundirse hacia adentro y hacia afuera del núcleo. (Adaptado de D. Grünwald, R. H. Singer y M. Rout, 2011, *Nature* 475:333.)

y empalme de los pre-mRNA, como en la exportación de los mRNA completamente procesados a través de los CPN al citoplasma. Los mRNP probablemente se unen a lo largo de sus longitudes mediante los exportadores de mRNP NXF1/NXT1, los cuales interactúan con los dominios FG de las nucleoporinas FG para facilitar la exportación de los mRNP a través del canal central del CPN (Fig. 8-20b).

Los filamentos proteicos se extienden desde el centro hacia el nucleoplasma formando una “cesta nuclear” (véase la Fig. 8-20a). Los filamentos proteicos también se extienden hacia el citoplasma. Estos filamentos asisten en la exportación de mRNP. Gle2, una proteína adaptadora que se une reversiblemente a NXF1 y a una nucleoporina en la cesta nuclear, trae a los mRNP nucleares hacia el poro en prepara-

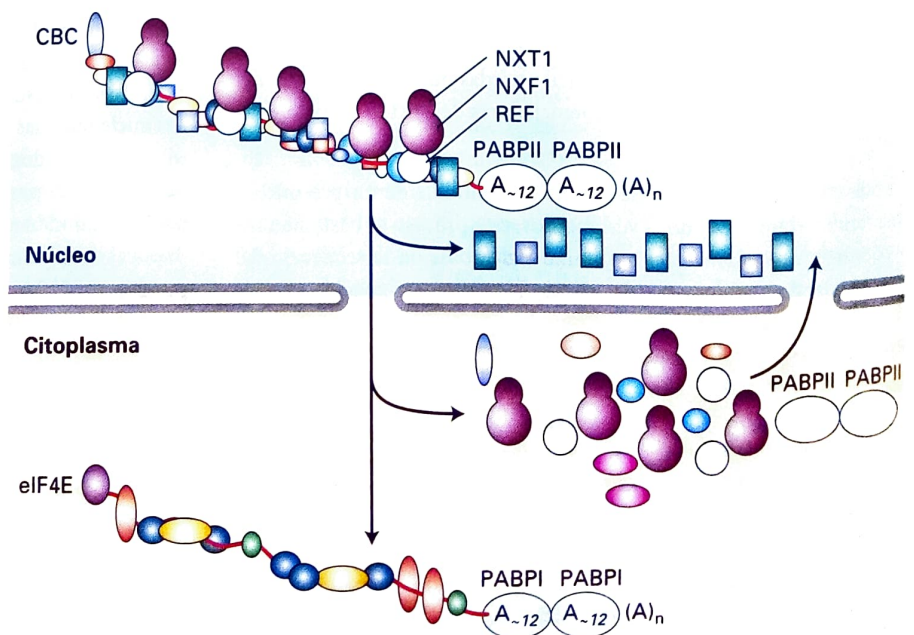


FIGURA 8-21 Remodelación de los mRNP durante la exportación nuclear. Algunas proteínas mRNP (rectángulos) se disocian de los complejos mRNP nucleares antes de ser exportadas a través de los NPC. Algunas (ovales) son exportadas a través del NPC asociadas con el mRNP, pero se disocian en el citoplasma y son transportadas de vuelta al núcleo a través de un NPC. En el citoplasma, el factor de iniciación de la traducción eIF4E reemplaza a CBC unido a la caperuza 5' y PABPI reemplaza a PABPII.

ción para la exportación. Una nucleoporina en los filamentos citoplasmáticos del CPN se une a una RNA helicasa (Dbp5), que funciona en la disociación de NXF1/NXT1 y otras proteínas hnRNP del mRNP a medida que alcanza el citoplasma.

En un proceso llamado *remodelación del mRNP*, las proteínas asociadas con un mRNA en el complejo mRNP nuclear están intercambiadas por un grupo diferente de proteínas, a medida que el mRNP es transportado a través del CPN (Fig. 8-21). Algunas proteínas mRNP se disocian temprano en el transporte, permaneciendo en el núcleo hasta unir otro pre-mRNA naciente recién sintetizado. Otras proteínas mRNP nucleares permanecen con el complejo mRNP al tiempo que atraviesan el poro y por lo tanto, no se disocian del mRNP hasta que el complejo alcanza el citoplasma. Las proteínas en esta categoría incluyen el exportador de mRNP NXF1/NXT1, el complejo de unión a la caperuza unido a la caperuza 5' y la PABPII unida a la cola de poli(A). Ellos se disocian del mRNP en el lado citoplasmático del CPN a través de la acción de la RNA helicasa Dbp5 que se asocia con los filamentos citoplasmáticos del CPN, como se describió antes. Estas proteínas luego son importadas de regreso al núcleo, como se analizó para otras proteínas nucleares en el **Capítulo 13**, donde pueden funcionar en la exportación de otro mRNP. En el citoplasma, el factor de iniciación de la traducción de unión a la caperuza eIF4E reemplaza al CPN unido a la caperuza 5' de los mRNP (Fig. 4-24). En los vertebrados, la proteína de unión a poli(A) nuclear PABPII es reemplazada con la proteína de unión a poli(A) citoplasmática PABPI (también denominada así debido a que fue descubierta antes que PABPII). Solo una PABP se encuentra en las levaduras en gemación, tanto en el núcleo como en el citoplasma.

Proteína SR de levadura Estudios de *S. cerevisiae* indican que la dirección de exportación de mRNP del núcleo al citoplasma está controlada por la fosforilación y desfosforilación de las proteínas adaptadoras mRNP, como la REF que asiste en la unión del exportador NXF1/NXT1 a los mRNP. En un caso, una proteína de levadura SR (Npl3) funciona como una proteína adaptadora que promueve la unión del exportador de levadura mRNP (Fig. 8-22). La proteína SR inicialmente se une al pre-mRNA en sus formas fosforiladas. Cuando el corte 3' y la poliadenilación se han completado, la proteína adaptadora es desfosforilada por una proteína fosfatasa nuclear específica esencial para la exportación de mRNP. Solo la proteína adaptadora desfosforilada puede unirse al exportador mRNP, acoplando así la exportación mRNP a la poliadenilación correcta. Esta es una forma de "control de calidad" del mRNA. Si el mRNP naciente no está correctamente procesado, no es reconocido por la fosfatasa que desfosforila Npl3. En consecuencia, no es unido por el exportador mRNA y no es exportado desde el núcleo. En su lugar es degradado por el exosoma, el complejo multiproteína que degrada los RNA desprotegidos en el núcleo y en el citoplasma (véase la Fig. 8-1).

Después de la exportación al citoplasma, la proteína SR Npl3 es fosforilada por una proteincinasa citoplasmática específica. Esto causa su disociación del mRNP, junto con el exportador mRNP. De esta forma, la desfosforilación de las proteínas adaptadoras mRNP en el núcleo, la desfosforilación de las proteínas adaptadoras mRNP en el núcleo una vez que se ha completado el procesamiento del RNA y sus fosforilaciones y la disociación resultante en el citoplasma, producen una mayor concentración de complejos mRNP-exportador de mRNP en el núcleo, donde se forman y una menor concentración de estos complejos en el citoplasma, donde se disocian. Como resultado, la dirección de la exportación de mRNP puede ser impulsada por difusión simple

a favor de un gradiente de concentración del transporte competente del complejo exportador de mRNP-mRNP a través del CPN, desde el núcleo (donde la concentración es más elevada) hasta el citoplasma (donde es más baja).

Exportación nuclear de los mRNP de los anillos de Balbiani Las glándulas salivales del insecto *Chironomus tentans* proporcionan un buen sistema modelo para los estudios de microscopía electrónica de la formación de los hnRNP y sus exportaciones a través de los CPN. En esta larva, los genes en los grandes engrosamientos cromosómicos (llamados anillos de Balbiani) se transcriben de manera abundante a pre-mRNA nacientes que se asocian con proteínas hnRNP y son procesados a mRNP enrolladas con un mRNA final de longitud ~ 75 kb (Figs. 8-23a, b). Estos mRNA gigantes codifican grandes proteínas adherentes que fijan la larva en desarrollo a una hoja. Después del procesamiento del pre-mRNA en los hnRNP de los anillos de Balbiani, los mRNP resultantes se mueven a través de los poros nucleares hasta el citoplasma. Las microfotografías electrónicas de las secciones de estas células muestran que los mRNP parecen desenrollarse durante su paso a través de los poros nucleares y luego se unen a los ribosomas, a medida que entran en el citoplasma. Este desenrollamiento probablemente sea una consecuencia de la remodelación de los mRNP, como resultado de la fosforilación de las proteínas mRNP por las cinasas citoplasmáticas y la acción de la RNA helicasa asociada con los filamentos citoplasmáticos del CPN, según se analizó en la sección anterior. La observación de que los mRNP se asocian con los ribosomas durante el transporte indica que el extremo 5' se abre camino a través del complejo del poro nuclear. Estudios detallados por microscopía electrónica acerca del transporte de los mRNP del anillo de Balbiani a través de los complejos del poro nuclear, condujo al modelo que se describe en la **Figura 8-23c**.

Los pre-mRNA en los espliceosomas no son exportados desde el núcleo

Es muy importante que solo los mRNA maduros totalmente procesados sean exportados desde el núcleo, debido a que la traducción de los pre-mRNA incompletamente procesados contiene intrones que podrían producir proteínas defectuosas, las cuales pueden interferir con el funcionamiento de la célula. Para evitar esto, a los pre-mRNA asociados con los snRNP en los espliceosomas se les suele impedir que sean transportados al citoplasma.

En un tipo de experimento que demuestra esta restricción, un gen que codifica un pre-mRNA con un único intrón que normalmente es eliminado se mutó para introducirle desviaciones de las secuencias de consenso del sitio de corte y empalme. La mutación de cualquiera de las bases invariantes de los sitios de corte y empalme 5' y 3' en los extremos del intrón, da como resultado que los pre-mRNA son unidos por las snRNP para formar los espliceosomas; sin embargo, se bloqueó el proceso de corte y empalme y los pre-mRNA se retuvieron en el núcleo. Por el contrario, las mutaciones de *ambos* sitios de corte y empalme 5' y 3' en el mismo pre-mRNA dio como resultado la exportación del pre-mRNA no procesado, aunque menos eficientemente que para el mRNA cortado. Cuando ambos sitios de corte y empalme están mutados, los pre-mRNA no se unen de manera eficiente a las snRNP y por consiguiente, no se bloquea su exportación.

Estudios recientes en levadura, demostraron que una proteína nuclear que se asocia con una nucleoporina en la cesta nuclear del CPN

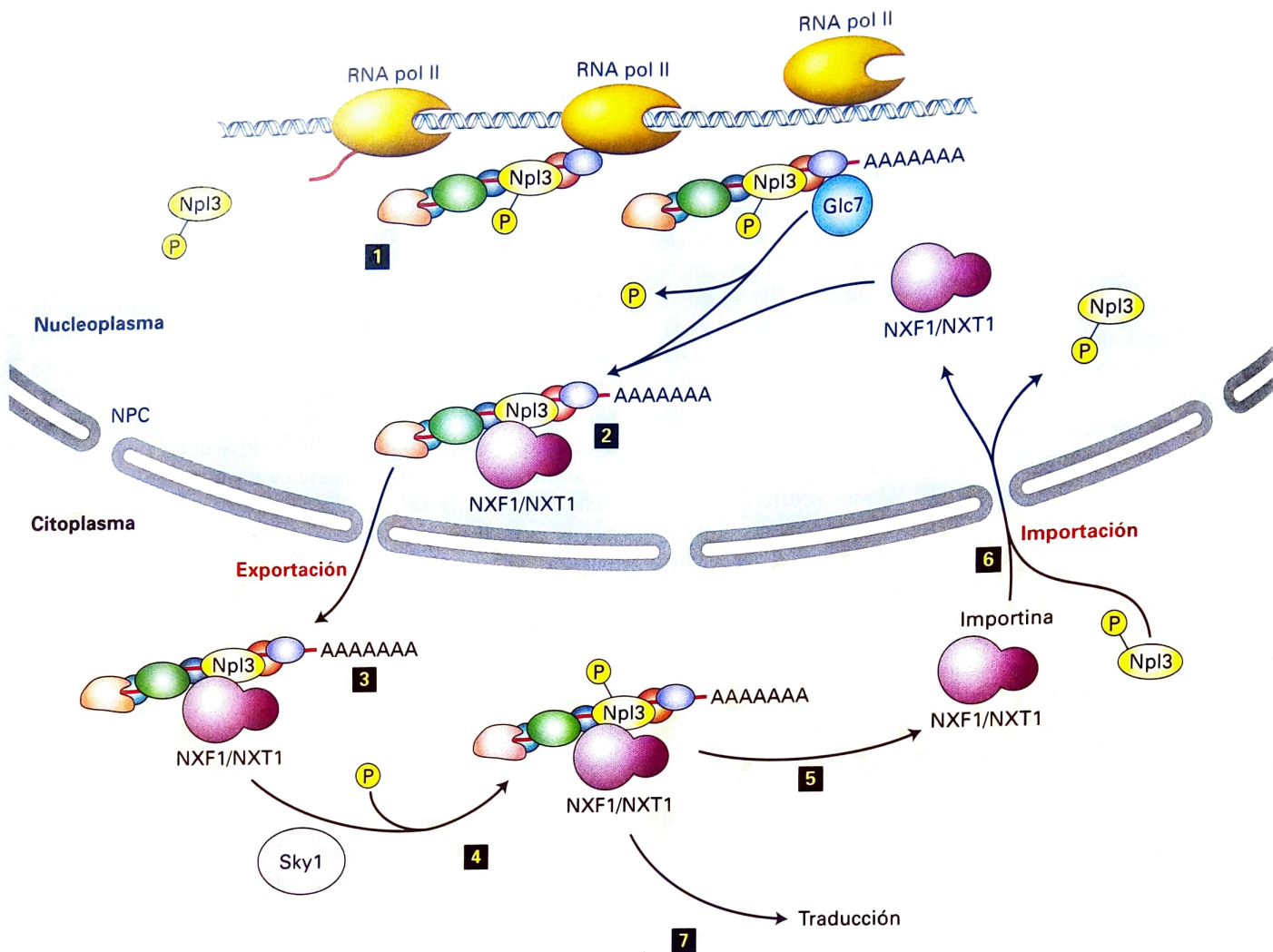


FIGURA 8-22 Fosforilación reversible y dirección de la exportación nuclear de mRNP. Paso **1**: la proteína SR de levadura Npl3 se une a los pre-mRNA nacientes en su forma fosforilada. Paso **2**: cuando la poliadenilación se produjo de forma exitosa, la fosfatasa nuclear Glc7 esencial para la exportación del mRNP desfosforila a Npl3, promoviendo la unión del exportador mRNP de levadura, NXF1/NXT1. Paso **3**: el exportador mRNP permite la difusión del complejo mRNP a través del canal central del complejo del poro nuclear (NPC).

Paso **4**: la proteína cinasa citoplasmática Sky1 fosforila a Npl3 en el citoplasma, causando **5** la disociación del exportador de mRNP y Npl3 fosforilado, probablemente a través de la acción de una RNA helicasa asociada con los filamentos citoplasmáticos NPC. **6** El transportador de mRNA y el Npl3 fosforilado son llevados de regreso al núcleo a través de los NPC. **7** El mRNA transportado está disponible para la traducción en el citoplasma. (De E. Izaurralde, 2004, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**:210-212. Véase W. Gilbert y C. Guthrie, 2004, *Mol. Cell* **13**:201-212.)

es necesaria para retener los pre-mRNA asociados a las snRNP en el núcleo. Si se elimina esta proteína o la nucleoporina a la cual se une, se exportan los pre-mRNA sin procesar.

La proteína Rev regula el transporte de los mRNA virales no procesados

Como se analizó anteriormente, el transporte de los mRNP conteniendo los mRNA funcionales y maduros desde el núcleo hasta el citoplasma comprenden un mecanismo complejo, el cual es crítico para la expresión génica (véanse las Figs. 8-21, 8-22 y 8-23). La regulación de este transporte teóricamente podría proporcionar otro significado del control génico, aunque parece ser relativamente raro. En efecto, los únicos ejemplos conocidos de exportación de mRNA regulado se producen durante la respuesta celular a las condiciones (p. ej., choque térmico) que causan la desnaturalización de proteínas, o durante la infección

 Muchos casos de talasemia, una enfermedad hereditaria que es el resultado de concentraciones anormalmente bajas de proteínas de globinas, se deben a mutaciones en los sitios de corte y empalme del gen de globina las cuales disminuyen la eficiencia de dicho proceso de corte y empalme, pero no evitan la asociación del pre-mRNA con las snRNP. Los pre-mRNA de globina sin procesar son retenidos en los núcleos de los reticulocitos y degradados rápidamente. ■

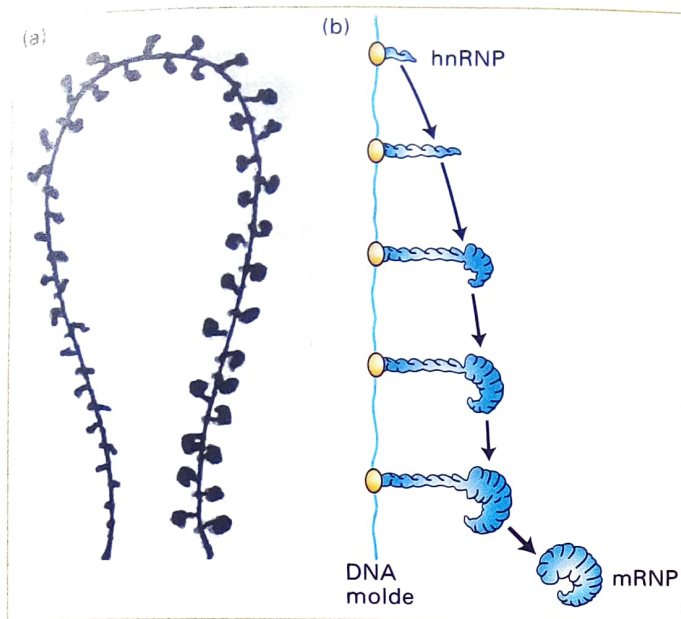
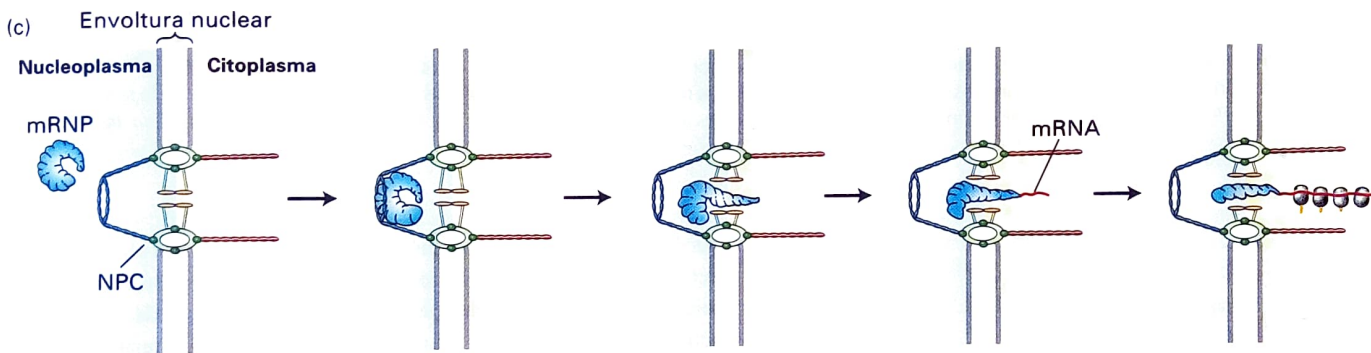


FIGURA 8-23 Formación de las partículas de ribonucleoproteína heterogénea (hnRNP) y exportación de los mRNP desde del núcleo.

(a) Modelo de un lazo de transcripción de cromatina y ensamblado del mRNP anillo del Balbiani en *Chironomus tentans*. Los transcritos de RNA nacientes producidos a partir del DNA molde rápidamente se asocian con proteínas, formando las hnRNP. El incremento gradual en tamaño de las hnRNP refleja la longitud creciente de los transcritos de RNA a distancias mayores desde el sitio de inicio de la transcripción. El modelo se reconstruyó a partir de microfotografías electrónicas de cortes finos seriados de células de glándulas salivales. (b) Diagrama esquemático de la biogénesis de las hnRNP. Siguiendo con el procesamiento del pre-mRNA, la partícula de ribonucleoproteína resultante es denominada como mRNP. (c) Modelo para el transporte de los mRNP BR a través del complejo del poro nuclear (NPC) sobre la base de estudios de microscopía electrónica. Nótese que los mRNP curvados parecen desenrollarse a medida que pasan a través de los poros nucleares. A medida que el mRNA entra al citoplasma, rápidamente se asocia con los ribosomas, indicando que el extremo 5' pasa a través del primer NPC. (Parte [a] de C. Ericson y cols., 1989, *Cell* **56**:631; cortesía de B. Daneholt. Partes [b] y [c] adaptado de B. Daneholt, 1997, *Cell* **88**:585. Véase también B. Daneholt, 2001, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* **98**:7012.)



viral cuando las alteraciones inducidas por el virus en el transporte nuclear maximizan la replicación viral. Aquí describiremos la regulación de la exportación del mRNP mediada por una proteína codificada por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV).

Un retrovirus (HIV), integra una copia de DNA de su genoma RNA en el DNA de la célula huésped (véase la Fig. 4-49). El DNA viral integrado (o provirus) contiene una única unidad de transcripción, que es transcrita a un único transcrito primario mediante la RNA polimerasa celular II. El transcrito HIV puede ser cortado y empalmado en formas alternativas para dar tres clases de mRNA: un mRNA no procesado de ~ 9-kb; mRNA de ~ 4 kb formados por eliminación de un intrón; y mRNA de ~ 2 kb formados por eliminación de dos o más intrones (Fig. 8-24). Después de sus síntesis en el núcleo de la célula huésped, las tres clases de mRNA del HIV son transportadas hasta el citoplasma y traducidas a proteínas virales; alguno de los RNA sin procesar de 9 kb se usa como genoma viral en los viriones progenie que se desprenden por gemación desde la superficie celular.

Puesto que los mRNA del HIV de 9 kb y de 4 kb contienen sitios de corte y empalme, pueden ser vistos como mRNA procesados de manera incompleta. Como se analizó anteriormente, la asociación de tales mRNA incompletamente procesados con las snRNP en los espliceosomas normalmente bloquean sus exportaciones desde el núcleo. Así el HIV, al igual que otros retrovirus, debe tener algunos mecanismos

para superar este bloqueo, permitiendo la exportación de los mRNA virales más largos. Algunos retrovirus han desarrollado una secuencia denominada *elemento de transporte constitutivo (CTE)*, la cual se une al exportador mRNP NXF1/NXT1 con mayor afinidad, permitiendo así la exportación del RNA retroviral sin procesar al citoplasma. El HIV resolvió el problema de manera diferente.

Estudios con mutantes HIV demostraron que el transporte desde el núcleo hasta el citoplasma de los mRNA virales no procesados de 9 kb, así como del procesado una vez de 4 kb, requiere la proteína Rev codificada por el virus. Experimentos bioquímicos posteriores demostraron que Rev se une a elementos de respuesta Rev (RRE) presentes en el RNA del HIV. En las células infectadas con mutantes de HIV que carecen del RRE, los mRNA virales sin procesar y los procesados una vez permanecen en el núcleo, demostrando que el RRE es necesario para la estimulación mediada por Rev del exportador nuclear. Al comienzo de una infección antes de que se sintetice la proteína Rev, solo se pueden exportar los mRNA de 2 kb con múltiples cortes y empalmes. Uno de estos mRNA de 2 kb codifica para Rev, el cual contiene una señal de exportación nuclear rica en leucina que interactúa con el transportador Exportina 1. Como se analizará en el Capítulo 13, la traducción y la importación nuclear de Rev da como resultado la exportación del mRNA del HIV más largo sin procesar y de los procesados una vez, a través del complejo del poro nuclear.

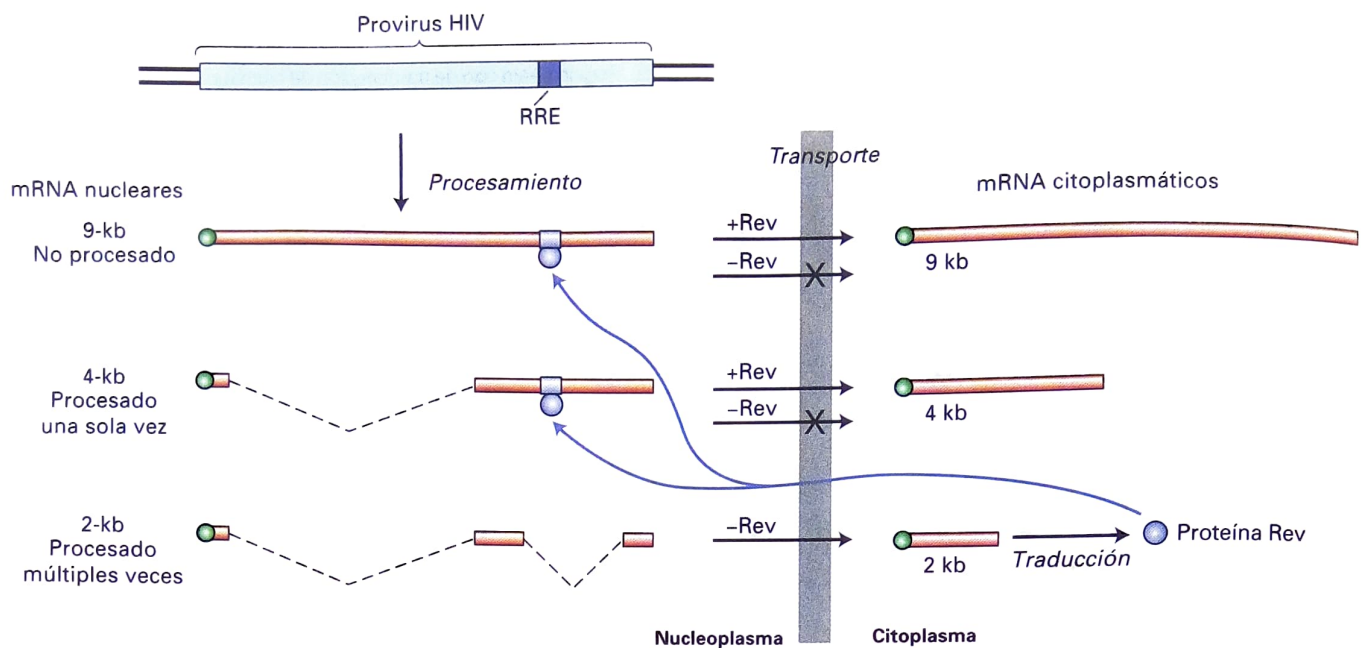


FIGURA 8-24 Transporte de los mRNA HIV desde el núcleo hasta el citoplasma. El genoma HIV, que contiene diversas regiones codificadoras, se transcribe a un único transcrito primario de 9 kb. Diversos mRNA ~ 4 kb resultan a partir del corte y eliminación de cualquiera de los variados intrones (líneas discontinuas) y diversos mRNA ~ 2 kb del corte y eliminación de dos o más

intrones alternativos. Después del transporte al citoplasma, las distintas especies de RNA son traducidas a diferentes proteínas virales. La proteína Rev, codificada por un mRNA de 2 kb, interactúa con el elemento de respuesta a Rev (RRE) en los mRNA no procesados y procesados una sola vez, estimulando sus transportes al citoplasma. [Adaptado de B. R. Cullen y M. H. Malim, 1991, *Trends Biochem. Sci.* **16**:346.]

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 8.3

Transporte del mRNA a través de la envoltura nuclear

- La mayoría de los mRNP son exportados desde el núcleo por un exportador mRNP heterodimérico que interactúa con las repeticiones FG de las nucleoporinas FG (véase la Fig. 8-20). La dirección de transporte (núcleo → citoplasma) puede resultar en la disociación del complejo exportador-mRNP en el citoplasma, a través de la fosforilación de las proteínas mRNP mediante cinasas citoplasmáticas y la acción de una RNA helicasa asociada con los filamentos citoplasmáticos de los complejos del poro nuclear.
- El exportador mRNP se une a la mayoría de los mRNA de forma cooperativa con las proteínas SR unidas a los exones y con REF asociada a los complejos de unión-exón, los cuales se ligan a los mRNA a continuación del corte y empalme del RNA, así como se une a proteínas mRNP adicionales.
- Los pre-mRNA unidos por un espliceosoma normalmente no son exportados desde el núcleo, asegurando que solo los mRNA funcionales completamente procesados alcancen el citoplasma para su traducción.

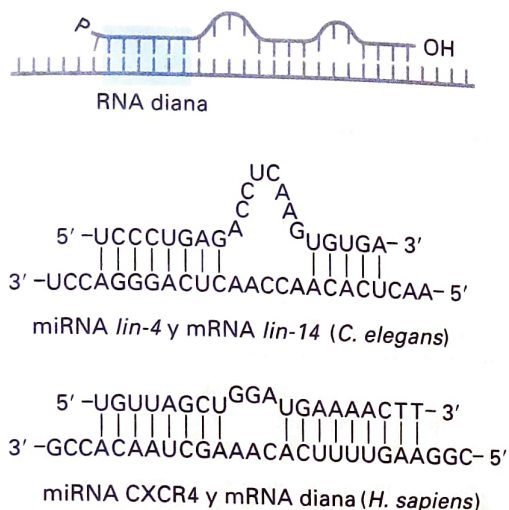
8.4 Mecanismos citoplasmáticos de control postranscripcional

Antes de avanzar, repasemos rápidamente los pasos en la expresión génica en los cuales se ejerce control. En los capítulos anteriores vimos

que la regulación de la iniciación de la transcripción y la elongación de la traducción en la región proximal al promotor, son los mecanismos iniciales para el control de la expresión génica en la vía de la expresión génica DNA → RNA → proteína. En las secciones anteriores de este capítulo, aprendimos que la expresión de las isoformas de proteína está controlada por la regulación del corte y empalme alternativo del RNA y la escisión y poliadenilación de los sitios de poli(A) alternativos. Aunque la exportación nuclear de los mRNP total y correctamente procesados al citoplasma en raras ocasiones está regulada, se evita la exportación de los pre-mRNP procesados inadecuadamente o remodelados de manera aberrante, y tales transcritos anómalos son degradados por el exosoma. Sin embargo los retrovirus, incluyendo al HIV, han desarrollado mecanismos que permiten que los pre-mRNA que retienen sitios de corte y empalme sean exportados y traducidos.

En esta sección se considerarán otros mecanismos de control postranscripcional para regular la expresión de algunos genes. La mayoría de estos mecanismos funcionan en el citoplasma, controlando la estabilidad o la localización del mRNA o su traducción en proteína. Comenzamos con el análisis de dos mecanismos de control génico relacionados, recientemente descubiertos, los cuales proporcionan nuevas técnicas poderosas para la manipulación de la expresión de genes específicos para propósitos terapéuticos y experimentales. Estos mecanismos están controlados por los RNA de una hélice, cortos, de ~ 22 nucleótidos, llamados **micro-RNA (miRNA)** y **RNA de interferencia o inhibidor pequeño (siRNA)**. Ambos forman apareamiento de bases con los mRNA diana específicos, ya sea inhibiendo sus traducciones (miRNA) o causando sus degradaciones (siRNA). Los seres humanos expresan ~ 500 miRNA. La mayoría de estos se expresan en tipos celulares específicos en momentos particulares durante la embriogénesis y después del nacimiento. Muchos miRNA se pueden dirigir a más de un

(a) miRNA → inhibición de la traducción



(b) siRNA → escisión del RNA

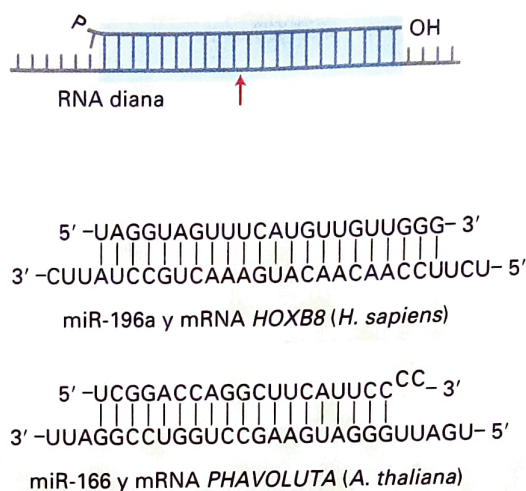


FIGURA 8-25 El apareamiento de bases con los RNA dianas distingue a los miRNA y los siRNA. (a) Los miRNA se hibridan de manera imperfecta con sus mRNA diana, reprimiendo la traducción del mRNA. Los nucleótidos 2 a 7 de un miRNA (resaltado en celeste) son los más importantes para seleccionar un

mRNA específico. (b) El siRNA se hibrida perfectamente con su mRNA diana, causando un corte del mRNA en la posición indicada por la flecha roja, desencadenando su rápida degradación. (Adaptado de P. D. Zamore y B. Haley, 2005, *Science* 309:1519.)

mRNA. En consecuencia, estos mecanismos recientemente descubiertos contribuyen significativamente a la regulación de la expresión génica. Los siRNA, involucrados en el proceso llamado interferencia por RNA, también son defensas celulares importantes contra la infección viral y la excesiva transposición por parte de los transposones.

Los micro-RNA reprimen la traducción de mRNA específicos

Los micro-RNA (miRNA) se descubrieron por primera vez durante el análisis de mutaciones en los genes *lin-4* y *let-7* del nematodo *C. elegans*, que influye en el desarrollo del organismo. La clonación y el análisis de *lin-4* y *let-7* de tipo silvestre revelaron que ellos no codifican productos proteicos, sino más bien RNA de solo 21 y 22 nucleótidos de longitud, respectivamente. Los RNA se hibridan a las regiones 3' no traducidas de los mRNA diana específicos. Por ejemplo, el miRNA del *lin-4*, que se expresa temprano en la embriogénesis, se hibrida a las regiones 3' no traducidas tanto de los mRNA del *lin-14* como del *lin-28* en el citoplasma, reprimiendo de esta forma sus traducciones mediante un mecanismo analizado a continuación. La expresión del miRNA *lin-4* cesa más tarde en el desarrollo, permitiendo la traducción de los mRNA de *lin-14* y *lin-28* recién sintetizados. La expresión del miRNA del *let-7* se produce en momentos comparables durante la embriogénesis de todos los animales con simetría bilateral.

La regulación de la traducción de miRNA parece estar ampliamente distribuida en todas las plantas y animales multicelulares. En los últimos años se han aislado, clonado y secuenciado RNA pequeños de 20-26 nucleótidos, de varios tejidos de múltiples organismos modelo. Estimaciones recientes sugieren que la expresión de un tercio de todos

los genes humanos está regulada por ~ 500 miRNA humanos aislados de varios tejidos. El potencial de regulación de múltiples mRNA por un miRNA es formidable, debido a que el apareamiento de bases entre el miRNA y la secuencia en los extremos 3' de los mRNA que ellos regulan no necesita ser perfecta (Fig. 8-25). En efecto, la considerable experimentación con miRNA sintéticos demostró que la complementariedad entre seis o siete nucleótidos de un miRNA y su región 3' no traducida del mRNA diana son cruciales para la selección de un mRNA diana.

La mayoría de los miRNA son procesados a partir de los transcritos de la RNA polimerasa II de varios cientos a miles de nucleótidos de longitud, llamados pri-miRNA (por transcrito *primario*) (Fig. 8-26). Los pri-miRNA pueden contener la secuencia de uno o más miRNA. Los miRNA también son procesados a partir de algunos intrones escindidos y a partir de las regiones 3' no traducidas de algunos pre-mRNA. Dentro, estos transcritos largos tienen secuencias que se pliegan en estructuras con forma de horquilla de ~ 70 nucleótidos de longitud, con apareamientos de bases imperfectos en el tallo. Una RNasa nuclear específica para RNA doble hebra llamada *Drosha*, actúa con una proteína de unión a RNA doble hebra llamada DGCR8 en los seres humanos (Pasha en *Drosophila*), y corta y elimina la región del bucle del precursor de RNA generando un pre-miRNA. Los pre-miRNA son reconocidos y unidos por un transportador nuclear específico, *Exportina 5*, que interactúa con los dominios FG de las nucleoporinas, permitiendo que el complejo difunda a través del canal interior del complejo de poro nuclear, como se describió antes (véanse la Fig. 8-20 y el Cap. 13). Una vez en el citoplasma, una RNasa específica de RNA doble hebra llamada *Dicer* actúa con una proteína de unión a RNA doble hebra citoplasmática llamada TRBP en los seres humanos (por proteína de unión a Tar; denominada *Loquacious* en *Drosophila*), para procesar aún más al pre-miRNA en

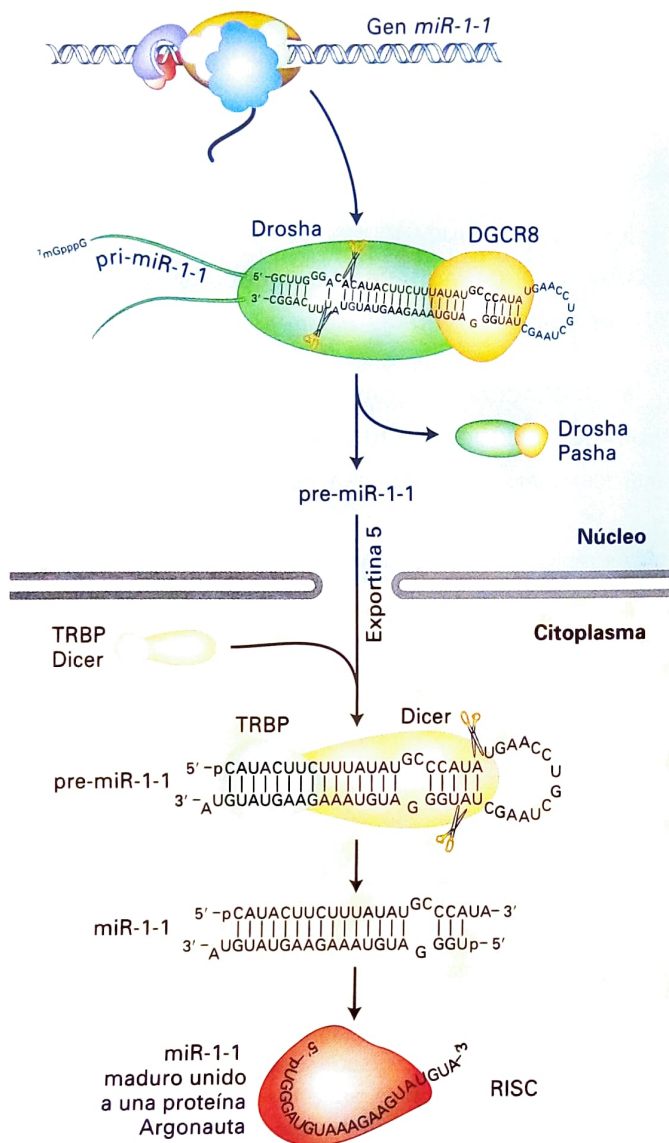


FIGURA 8-26 Procesamiento del miRNA. Este diagrama muestra la transcripción y procesamiento del *miR-1-1* miRNA. El transcrito primario de miRNA (*pri-miRNA*) es transcrito por la RNA polimerasa II. La endorribonucleasa nuclear Drosha, específica de RNA doble hebra, con su compañera la proteína DGCR8 de unión a RNA doble hebra (Pasha en *Drosophila*), realiza los cortes iniciales en el *pri-miRNA*, generando un *pre-miRNA* de ~ 70 nucleótidos que es exportado al citoplasma por el transportador nuclear Exportina 5. El *pre-miRNA* es posteriormente procesado aún más en el citoplasma a un *miRNA* doble hebra con un extremo 3' de una hélice de 2 bases, en conjunción con la proteína de unión a RNA doble hélice TRBP (Loquacious en *Drosophila*). Finalmente, una de las dos hebras es incorporada al complejo RISC, donde se une a la proteína Argonauta. (Adaptado de P. D. Zamore y B. Haley, 2005, *Science* 309:1519.)

un miRNA doble hebra. El miRNA doble hebra tiene una longitud aproximada a dos vueltas de una hélice de RNA de la forma A, con hebras de 21-23 nucleótidos de largo y dos nucleótidos 3' desapareados en cada extremo. Finalmente, se selecciona una de las dos hebras para ensamblarla en un **complejo silenciador inducido por RNA (RISC)**, el cual contiene un miRNA maduro de una hélice unido mediante una proteína Argonauta multidominio, un miembro de una familia de proteínas con una secuencia conservada reconocible. Diversas proteínas Argonautas se expresan en algunos organismos, en especial en plantas y se encuentran en distintos complejos RISC con diferentes funciones.

Los complejos miRNA-RISC se asocian con las mRNP diana mediante apareamiento de bases entre el miRNA maduro unido a Argonauta y a zonas complementarias a las regiones 3' no traducidas (3' UTR) de los mRNA diana (véase la Fig. 8-25). La inhibición de la traducción del mRNA diana requiere la unión de dos o más complejos RISC para distinguir las regiones complementarias en la región 3' UTR del mRNA diana. Se ha sugerido que esto puede permitir la regulación combinatoria de la traducción del mRNA mediante la regulación separada de la transcripción de dos o más *pri-miRNA* diferentes, los cuales son procesados a los miRNA requeridos en la combinación para suprimir la traducción de un mRNA diana específico.

La unión de diversos complejos RISC a un mRNA inhibe la iniciación de la traducción mediante un mecanismo que se está analizando en la actualidad. La unión de los complejos RISC causa la unión de los mRNP para asociarse con dominios citoplasmáticos densos, muchas veces del tamaño de un ribosoma, llamados cuerpos de procesamiento del RNA citoplasmático o simplemente cuerpos P. Los **cuerpos P**, que se describirán con mayor detalle a continuación, son sitios de degradación del RNA que no contienen ribosomas o factores de traducción, lo cual podría explicar la inhibición de la traducción. La asociación con los cuerpos P también puede explicar por qué la expresión de un miRNA suele disminuir la estabilidad de un mRNA diana.

Como se mencionó anteriormente, se han observado aproximadamente ~ 500 miRNA humanos diferentes, muchos de ellos expresados solo en tipos celulares específicos. La determinación de la función de estos miRNA es en la actualidad un área de investigación muy activa. En un ejemplo, un miRNA específico llamado *miR-133* es inducido cuando los mioblastos se diferencian a células musculares. El *miR-133* elimina la traducción de PTB, un factor de corte y empalme regulador que funciona de modo similar a Sxl en *Drosophila* (véase la Fig. 8-16). El PTB se une a la región del sitio de corte y empalme 3' en los *pre-mRNA* de muchos genes, llevando a la omisión del exón o a utilizar sitios de corte y empalme 3' alternativos. Cuando *miR-133* se expresa en los mioblastos en proceso de diferenciación, la concentración de PTB disminuye sin reducir de modo significativo la concentración del mRNA de PTB. Como resultado, se expresan isoformas alternativas de múltiples proteínas importantes para la función de la célula muscular en las células diferenciadas.

Se están descubriendo otros ejemplos de regulación de miRNA en diversos organismos a un ritmo rápido. La inactivación (noqueo de genes) del gen *dicer* elimina la generación de miRNA en los mamíferos. Esto causa la muerte embrionaria temprana en el desarrollo del ratón. Sin embargo, cuando *dicer* se elimina en los primordios de las extremidades, se puede observar la influencia del miRNA en el desarrollo de las extremidades no esenciales (Fig. 8-27). Aunque los principales tipos de células se diferencian y los aspectos fundamentales del patrón de las extremidades se mantienen, el desarrollo es anormal, lo cual demues-

De tipo silvestre



Mutante Dicer

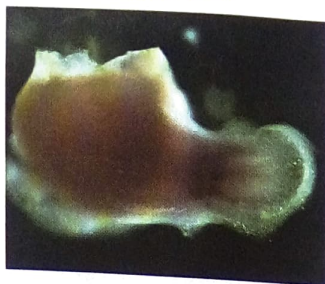


FIGURA EXPERIMENTAL 8-27 Función del miRNA en el desarrollo de los miembros. Las microfotografías comparan el miembro normal (izquierda) y el silenciamiento de Dicer (derecha) de embriones murinos de 13 días de desarrollo con inmunotinción de la proteína Gd5, un marcador de formación articular. Dicer está silenciada en los embriones murinos en desarrollo por la expresión condicional de Cre que induce delección del gen Dicer solo en estas células (véase la Fig. 5-42). (De B. D. Harfe y cols., 2005, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:10898.)

tra la importancia de los miRNA en la regulación adecuada del nivel de traducción de múltiples mRNA. De los ~ 500 miRNA humanos, el 53% parece ser único de los primates. Parece probable que los nuevos miRNA surgieron rápidamente durante la evolución por duplicación de un gen pri-mRNA, seguido por la mutación de bases que codificaba el miRNA maduro. Los miRNA son particularmente abundantes en las plantas: se han caracterizado más de 1,5 millones de miRNA diferentes en *Arabidopsis thaliana*!

La interferencia por RNA induce la degradación de los mRNA perfectamente complementarios

La **interferencia de RNA (RNAi)** se descubrió de manera inesperada durante intentos de manipular experimentalmente la expresión de genes específicos. Los investigadores trataron de inhibir la expresión de un gen en *C. elegans* mediante microinyección de un RNA complementario de una hélice, que podría hibridarse al mRNA codificado y evitar su traducción, un método llamado inhibición antisentido. Pero en los experimentos control, el RNA doble hebra perfectamente apareado unos pocos cientos de pares de bases de longitud, fue mucho más eficaz en la inhibición de la expresión del gen que la hebra antisentido sola (véase la Fig. 5-45). En las plantas se observó similar inhibición de la expresión génica por un RNA doble hebra introducido. En cada caso, el RNA doble hebra indujo la degradación de todos los RNA celulares, conteniendo una secuencia que fue exactamente la misma que una de las hebras de la doble hebra de RNA. Debido a la especificidad de la interferencia de RNA en los mRNA diana para la destrucción, esta se ha tornado una herramienta experimental para el estudio de la función génica.

Posteriormente estudios bioquímicos con extractos de embriones de *Drosophila*, mostraron que un RNA doble hebra largo que media la interferencia es inicialmente procesado a un RNA de interferencia corto doble hebra (siRNA). Estas hebras en el siRNA contienen 22-23 nucleótidos hibridados entre sí, de manera tal que las dos bases en

el extremo 3' de cada hebra son hélice sencilla. Estudios posteriores revelaron que la ribonucleasa específica de RNA doble hebra citoplasmática que corta el RNA doble hebra largo en siRNA, es la misma enzima Dicer involucrada en el procesamiento de los pre-miRNA después de sus exportaciones del núcleo al citoplasma (véase la Fig. 8-26). Este hallazgo llevó a descubrir que la interferencia de RNA y la represión de la traducción mediada por miRNA son procesos relacionados. En ambos casos, el RNA simple hebra corto maduro, ya sea siRNA maduro o miRNA maduro, está ensamblado en complejos RISC en los cuales los RNA cortos están unidos a una proteína Argonauta. Lo que distingue a un complejo RISC que contiene un siRNA de uno que contiene un miRNA, es que el siRNA forma apareamientos de bases más extensos con sus RNA diana e induce su escisión, mientras que un complejo RISC asociado con un miRNA reconoce su diana a través del apareamiento imperfecto y da como resultado la inhibición de la traducción.

La proteína Argonauta es responsable del corte del RNA diana; un dominio de la proteína Argonauta es homóloga a las enzimas RNasa H que degradan el RNA de un híbrido de RNA-DNA (véase la Fig. 6-14). Cuando el extremo 5' del RNA corto de un complejo RISC se aparea precisamente con un mRNA diana a una distancia de una vuelta de una hélice de RNA (10-12 pares de bases), este dominio de Argonauta corta el enlace fosfodiéster del RNA diana a través de los nucleótidos 10 y 11 del siRNA (véase la Fig. 8-25). Los RNA cortados son liberados y posteriormente degradados por exosomas citoplasmáticos y exorribonucleasas 5'. Si el apareamiento de bases no es perfecto, el dominio Argonauta no corta o libera el mRNA diana. En efecto, si varios complejos RISC-miRNA se asocian con un mRNA diana, se inhibe su traducción y el mRNA se asocia con los cuerpos P, donde como se mencionó antes, es probable que sea degradado por un mecanismo más lento y diferente que la vía de degradación iniciada por la escisión de RISC de un RNA diana perfectamente complementario.

Cuando el RNA doble hebra es introducido en el citoplasma de células eucariontes, entra a la vía para el ensamblado de los siRNA en un complejo RISC debido a que es reconocido por la enzima citoplasmática Dicer y la proteína de unión al RNA doble hebra TRBP (véase la Fig. 8-26). Este proceso de interferencia de RNA se cree que es una defensa celular ancestral contra ciertos virus y elementos genéticos móviles, tanto en plantas como en animales. Las plantas con mutaciones en los genes que codifican las proteínas Dicer y RISC exhiben sensibilidad incrementada a la infección por virus RNA y movimiento aumentado de **transposones** dentro de sus genomas. Se cree que los intermediarios de RNA de doble hélice generados durante la replicación de los virus de RNA son reconocidos por las ribonucleasas Dicer, induciendo una respuesta RNAi que en última instancia degrada los mRNA virales. Durante la transposición, los transposones se insertan dentro de genes celulares en una orientación aleatoria y sus transcripciones a partir de diferentes promotores producen los RNA complementarios que se pueden hibridar entre sí, iniciando el sistema RNAi que luego interfiere con la expresión de las proteínas transposónicas necesarias para las transposiciones adicionales.

En las plantas y en *C. elegans* la respuesta por RNAi se puede inducir en todas las células del organismo mediante introducción de RNA doble hebra en solo unas pocas células. Tal inducción que abarca todo el organismo requiere la producción de una proteína que es homóloga a la RNA replicasa de los virus de RNA. Se ha revelado que los siRNA doble hebra son replicados y luego transferidos a otras células en estos organismos. En las plantas, la transferencia de

siRNA podría ocurrir a través de los **plasmodesmos**, las conexiones citoplasmáticas entre las células vegetales que atraviesan las paredes celulares entre ellas (véase la Fig. 20-38). La inducción en todo el organismo de la interferencia de RNA no ocurre en *Drosophila* o en mamíferos, presumiblemente debido a que sus genomas no codifican homólogos de RNA replicasa.

En las células de mamífero, la introducción de las moléculas dúplex RNA-RNA largas en el citoplasma da como resultado la inhibición generalizada de la síntesis de proteína a través de la vía PKR, analizada más adelante. Esto limita en gran medida el uso de los RNA doble hebra largos para inducir experimentalmente una respuesta RNAi contra un mRNA diana específico. Afortunadamente, los investigadores descubrieron que una hebra de los siRNA doble hebra de 21-23 nucleótidos de longitud con regiones de dos bases de hélice sencilla en 3' lleva a la generación de complejos RISC siRNA, sin inducir la inhibición generalizada de síntesis de proteína. Esto ha permitido a los investigadores el uso de los siRNA doble hebra sintéticos para "inactivar" la expresión de genes específicos en las células humanas, así como también en otros mamíferos. Este método de **silenciamiento génico por siRNA** ahora es ampliamente usado en estudios de diversos procesos, incluyendo la vía RNAi en sí misma.

La poliadenilación citoplasmática estimula la traducción de algunos mRNA

Además de la represión de la traducción por parte de los miRNA, otros controles de traducción mediados por proteína ayudan a regular la expresión de algunos genes. Las secuencias reguladoras (o elementos) en los mRNA que interactúan con proteínas específicas para controlar la traducción, generalmente están presentes en la región no traducida (UTR) en el extremo 3' o 5' de un mRNA. Aquí se analiza un tipo de control de traducción mediado por proteína que involucra los elementos reguladores 3'. Más adelante se analiza un mecanismo diferente que involucra proteínas de unión al RNA, las cuales interactúan con los elementos reguladores 5'.

La traducción de muchos mRNA eucariontes está regulada por proteínas de unión a RNA específicos de secuencia, que se unen de manera cooperativa a sitios vecinos en las UTR 3'. Esto les permite funcionar de modo combinatorio, similar a la unión cooperativa de los factores de transcripción a sitios reguladores en una región promotora. En la mayoría de los casos estudiados, la traducción es reprimida por una unión proteica a los elementos regulatorios 3' y la regulación se produce a partir de la desrepresión en el momento o lugar adecuado en una célula o embrión en desarrollo. El mecanismo de tal represión se comprende mejor para los mRNA que deben sufrir **poliadenilación citoplasmática** antes de que puedan ser traducidos.

La poliadenilación citoplasmática es un aspecto crucial de la expresión génica en el embrión temprano de animales. Las células huevo (ovocitos) de los animales multicelulares contienen muchos mRNA, que codifican numerosas proteínas diferentes las cuales no se traducen después de que el óvulo es fecundado por un espermatozoide. Algunos de estos mRNA "almacenados" tienen una cola de poli(A) corta, que tiene sólo ~ 20-40 residuos de A, a la cual se pueden unir apenas unas pocas moléculas de proteínas de unión poli (A) (PABPI). Como se analizó en el Capítulo 4, múltiples moléculas de PABPI que se unen a la larga cola de poli(A) de un mRNA interactúan con el factor de iniciación eIF4G, el cual es necesario para la iniciación de

la traducción (véase la Fig. 4-24). Debido a que esta estabilización no se puede producir con los mRNA que tienen colas de poli(A) cortas, tales mRNA almacenados en los ovocitos no se traducen eficientemente. En el momento adecuado, durante la maduración del ovocito o después de la fecundación de una célula huevo, generalmente en respuesta a una señal externa aproximadamente 150 residuos de A se añaden a las colas de poli(A) cortas en estos mRNA en el citoplasma, estimulando sus traducciones.

Los estudios con los mRNA almacenados en ovocitos de *Xenopus* han ayudado a elucidar el mecanismo de este tipo de control de traducción. Los experimentos en los cuales los mRNA con cola corta son inyectados en los ovocitos, han demostrado que dos secuencias en sus 3' UTR son necesarias para sus poliadenilaciones en el citoplasma: la señal poli(A) AAUAAA que también es requerida para la poliadenilación nuclear de los pre-mRNA y una o más copias de un **elemento de poliadenilación citoplasmático** rico en U en dirección 5'. Este elemento regulador se une a una **proteína de unión a CPE** (CPEB) altamente conservada que contiene un dominio RRM y un dominio dedo de cinc.

De acuerdo al modelo actual, en ausencia de una señal estimuladora, CPEB se une al CPE rico en U e interactúa con la proteína Maskin, que a su vez se une al eIF4E asociado con la caperuza 5' del mRNA (Fig. 8-28, izquierda). Como resultado, el eIF4E no puede interactuar con otros factores de iniciación y con la subunidad ribosómica 40S, por lo que se bloquea la iniciación de la traducción. Durante la maduración del ovocito se fosforila una serina CPEB específica, causando que Maskin se disocie del complejo. Esto permite que las formas citoplasmáticas del factor de especificidad de corte y poliadenilación (CPSF) y la poli(A) polimerasa se unan al mRNA de manera cooperativa con CPEB. Una vez que la poli(A) polimerasa cataliza la adición de los residuos de A, la PABPI se pueden unir a la cola de poli(A) alargada, llevando a la interacción estabilizada de todos los factores necesarios para iniciar la traducción (Fig. 8-28, derecha; véase la Fig. 4-24). En el caso de la maduración del ovocito de *Xenopus*, la proteincinasa que fosforila a CPEB es activada en respuesta a la hormona progesterona. Así, la sincronización de la traducción de los mRNA almacenados que codifican proteínas necesarias para la maduración del ovocito está regulada por esta señal externa.

Es considerable la evidencia que indica que un mecanismo similar de control de la traducción cumple una función en el aprendizaje y la memoria. En el sistema nervioso central, los axones de alrededor de miles de neuronas pueden hacer conexiones (sinapsis) con las dendritas de una única neurona postsináptica (Fig. 22-23). Cuando uno de estos axones está estimulado, la neurona postsináptica "recuerda" cuál de estas miles de sinapsis fue estimulada. La siguiente vez que la sinapsis es estimulada, la fuerza de la respuesta desencadenada en la célula postsináptica difiere de la primera vez. Se ha demostrado que este cambio en la respuesta resulta en gran parte de la activación de la traducción de los mRNA almacenados en la región de la sinapsis, llevando a la síntesis local de nuevas proteínas que incrementen de tamaño la sinapsis y alteren las características neurofisiológicas. El hallazgo de que CPEB está presente en las dendritas neuronales ha conducido a la propuesta de que la poliadenilación citoplasmática estimula la traducción de los mRNA específicos en las dendritas, tanto como lo hacen en los ovocitos. En este caso, presumiblemente, la actividad sináptica (en lugar de una hormona) es la señal que induce la fosforilación de la CPEB y la subsiguiente activación de la traducción.

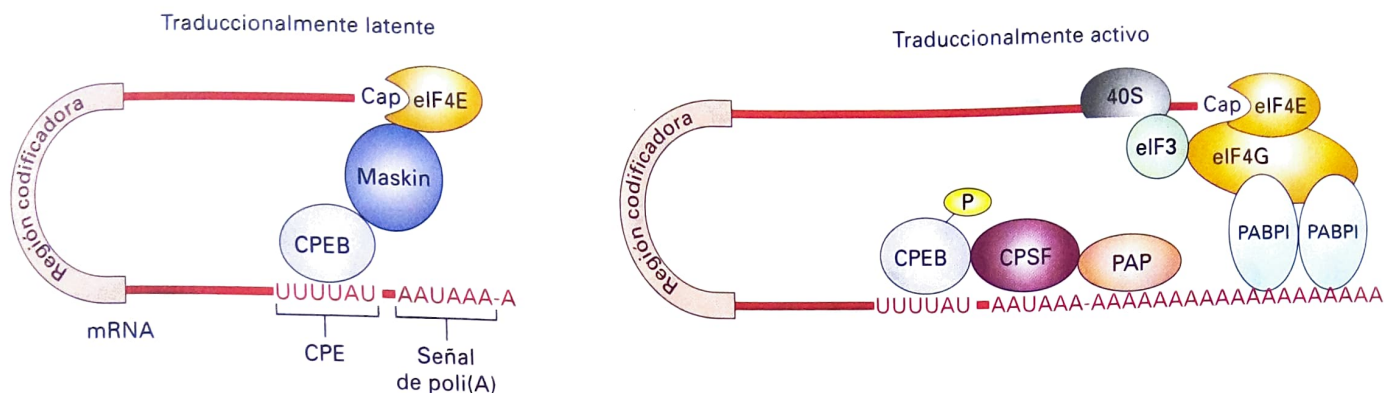


FIGURA 8-28 Modelo para el control de la poliadenilación citoplasmática y la iniciación de la traducción. (Izquierda) En los ovocitos inmaduros, los mRNA que contienen el elemento de poliadenilación citoplasmático (CPE) rico en U tienen colas de poli(A) cortas. La proteína de unión a CPE (CPEB) media la represión de la traducción a través de las interacciones descritas, que evitan el ensamblaje de un complejo de iniciación en el extremo 5' del mRNA. (Derecha) La estimulación hormonal de los ovocitos activa a la proteína cinasa que fosforila a CPEB, causando la liberación de Maskin. El factor de especificidad de corte y

poliadenilación (CPSF) luego se une al sitio de poli(A), interactuando tanto con CPEB unida como con la forma citoplasmática de la poli(A) polimerasa (PAP). Después de que se ha alargado la cola de poli(A), se pueden unir múltiples copias de la proteína de unión a poli(A) citoplasmática I (PABPI) e interactúa con eIF4G, que funciona junto con otros factores de iniciación para unir la subunidad ribosómica 40S e iniciar la traducción (Adaptado de R. Méndez y J. D. Richter, 2001, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2:521).

La degradación de los mRNA en el citoplasma se produce por medio de diversos mecanismos

La concentración de un mRNA es una función tanto de su velocidad de síntesis como de su velocidad de degradación. Por esta razón, si dos genes se transcriben a la misma velocidad, la concentración en estado estacionario del mRNA correspondiente que es más estable será más elevada que la concentración del otro. La estabilidad de un mRNA también determina cuán rápidamente se puede detener la síntesis de la proteína codificada. Para un mRNA estable, la síntesis de la proteína codificada persiste largo tiempo después de que la transcripción del gen se ha reprimido. La mayoría de los mRNA bacterianos ajustan la síntesis de las proteínas para acomodar cambios en el ambiente celular. La mayoría de las células en los organismos multicelulares, por el otro lado, existen en un ambiente bastante constante y llevan a cabo un conjunto específico de funciones durante periodos de días a meses o incluso el tiempo de vida del organismo (por ejemplos, las células nerviosas). Por consiguiente, la mayoría de los mRNA de los eucariontes superiores tienen vidas medias de muchas horas.

Sin embargo, algunas proteínas en las células eucariontes son necesarias solo durante periodos cortos de tiempo y deben expresarse en picos. Por ejemplo, como se analizó en la introducción del capítulo, ciertas moléculas de señalización llamadas **citocinas**, que están involucradas en la respuesta inmunitaria de los mamíferos, son sintetizadas y secretadas en ráfagas cortas (véase el Capítulo 23). De manera similar, muchos de los factores de transcripción que regulan el inicio de la fase S del ciclo celular, como c-Fos y c-Jun, son sintetizados sólo por breves periodos (Capítulo 19). La expresión de tales proteínas se produce en ráfagas cortas debido a que la transcripción de sus genes puede rápidamente encenderse y apagarse, y sus mRNA tienen vidas medias inusualmente cortas, del orden de los 30 minutos o menos.

Los mRNA citoplasmáticos son degradados por una de las tres vías que se muestran en la Fig. 8-29. La mayoría de los mRNA siguen la *vía dependiente de desadenilación*: la longitud de la cola de poli(A) disminuye gradualmente con el tiempo a través de la acción de una nucleasa desadenilante. Cuando se ha acortado lo suficiente, las moléculas de PABPI no pueden unirse más y estabilizar la interacción de la caperuza 5', así como los factores de iniciación de la traducción (véase la Fig. 4-24). La caperuza expuesta luego se elimina por una enzima específica (Dcp1/Dcp2 en *S. cerevisiae*) y el mRNA desprotegido es degradado por una exonucleasa 5' → 3' (Xrn1 en *S. cerevisiae*). La eliminación de la cola de poli(A) también torna a los mRNA susceptibles a la degradación por parte de los exosomas citoplasmáticos, que contienen exonucleasas 3' → 5'. Las exonucleasas 5' → 3' predominan en las levaduras y los exosomas 3' → 5' predominan en las células de mamíferos. Las enzimas que llevan a cabo la eliminación de la caperuza y las exonucleasas 5' → 3' están concentradas en los cuerpos P, las regiones del citoplasma de densidad inusualmente elevada.

Algunos mRNA son degradados principalmente por una *vía de eliminación de la caperuza independiente de la desadenilación* (véase la Fig. 8-29). Esto se debe a que ciertas secuencias en el extremo 5' de un mRNA parecen tornar sensitiva la caperuza a la enzima que lleva a cabo su eliminación. Para estos mRNA, la velocidad a la cual se les elimina la caperuza controla la velocidad a la cual son degradados, debido a que una vez que se elimina el casquete 5' el RNA es rápidamente hidrolizado por la exonucleasa 5' → 3'.

La velocidad de la desadenilación del mRNA varía inversamente con la frecuencia de iniciación de la traducción para un mRNA: cuanto más alta es la frecuencia de iniciación de la traducción para un mRNA, más lenta es la velocidad de desadenilación. Esta relación probablemente se debe a las interacciones recíprocas entre los factores de iniciación de la traducción unidos a la caperuza 5' y la PABPI unida a la cola poli(A). Para un mRNA que se traduce a una alta velocidad, los factores de iniciación están unidos a la caperuza gran parte del tiempo, estabili-

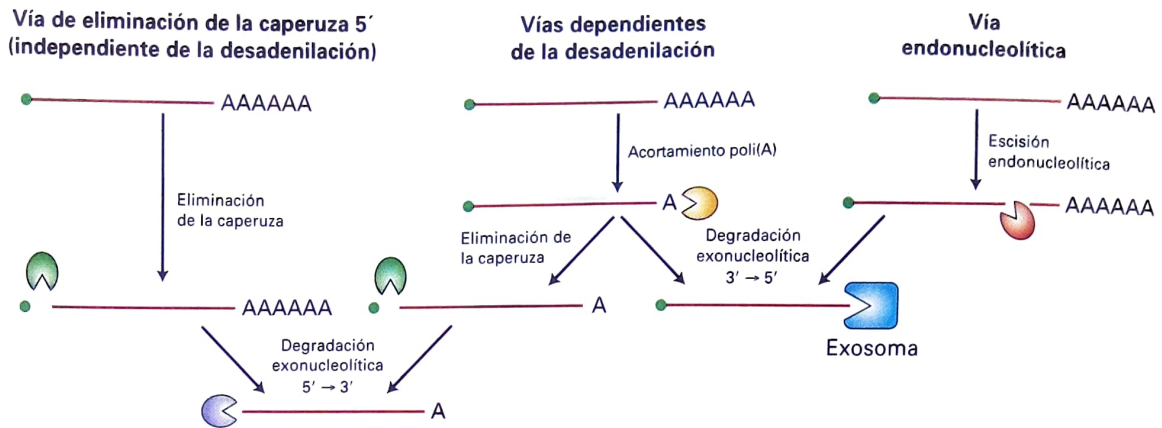


FIGURA 8-29 Vías para la degradación de los mRNA eucariontes. En las vías dependientes de la desadenilación (*centro*), la cola poli(A) es acortada progresivamente por una desadenilasa (anaranjado) hasta que alcanza una longitud de 20 residuos A o menos, punto en el cual se desestabiliza la interacción con PABPI, llevando a interacciones debilitadas entre los factores de iniciación de la traducción y la caperuza 5'. El mRNA desadenilado luego puede (1) ser modificado para eliminarle la caperuza 5' y ser degradado por una exonucleasa

5' → 3' o (2) ser degradado por una exonucleasa 3' → 5' en los exosomas citoplasmáticos. Algunos mRNA (*derecha*) son escindidos internamente por una exonucleasa y los fragmentos degradados por un exosoma. A otros mRNA (*izquierda*) se les elimina la caperuza 5' antes de que sean desadenilados y luego degradados por una exonucleasa 5' → 3'. [Adaptado de M. Tucker y R. Parker, 2000, *Ann. Rev. Biochem.* 69:571.]

zando la unión de PABPI y por ende protegiendo la cola de poli(A) de la desadenilación por exonucleasa.

Muchos mRNA de vida corta en células de mamífero contienen múltiples copias a veces superpuestas de la secuencia AUUUA en sus regiones 3' no traducidas. Se han encontrado proteínas de unión al RNA específicas, que se unen tanto a estas secuencias 3' ricas en AU que interaccionan con una enzima desadenilante, como con el exosoma. Esto causa la desadenilación rápida y la posterior degradación 3' → 5' de estos mRNA. En este mecanismo, la velocidad de la degradación del mRNA está desacoplada de la frecuencia de traducción. Por ende, los mRNA que contienen la secuencia AUUUA pueden ser traducidos a una elevada frecuencia y también degradados rápidamente, permitiendo que las proteínas codificadas se expresen en ráfagas cortas.

Como se mostró en la *Figura 8-29*, algunos mRNA son degradados por una *vía endonucleolítica* que no involucra la eliminación de la caperuza o la desadenilación significativa. Un ejemplo de este tipo de vía es la del RNAi, analizada anteriormente (véase la *Fig. 8-25*). Cada complejo siRNA-RISC puede degradar miles de moléculas de RNA diana. Los fragmentos generados por escisión interna luego son degradados por exonucleasas.

Cuerpos P Como se mencionó anteriormente, los cuerpos P son sitios para la represión de la traducción de los mRNA unidos por los complejos miRNA-RISC. Ellos también son los principales sitios de la degradación del mRNA en el citoplasma. Estas regiones densas del citoplasma contienen la enzima que elimina la caperuza (Dcp1/Dcp2 en levadura), los activadores de la eliminación de la caperuza (Dhh, Pat1, Lsm1-7 en levadura), la principal exonucleasa 5' → 3' (Xrn1), así como los mRNA densamente asociados. Los cuerpos P son estructuras dinámicas que crecen y se reducen en tamaño dependiendo de la velocidad a la cual se asocian los mRNP con ellos, la velocidad a la cual se degradan los mRNA y la velocidad a la cual los mRNP dejan los cuerpos P y reingresan al grupo de mRNP traducidos. Los mRNA cuyas traducciones se inhiben por apareamiento de bases imperfecto de los miRNA (*Fig. 8-25*) son los componentes principales de los cuerpos P.

La síntesis de proteína se puede regular de manera global

Al igual que las proteínas involucradas en otros procesos, los factores de iniciación de la traducción y las proteínas ribosómicas se pueden regular mediante modificaciones postraduccionales como la fosforilación. Tales mecanismos afectan la velocidad de traducción de la mayoría de los mRNA y por ende, la velocidad global de la síntesis de proteína.

Vía TOR La vía TOR se descubrió a través de la investigación del mecanismo de acción de la rapamicina, un antibiótico producido por una cepa de la bacteria *Streptomyces*, que es útil para la supresión de la respuesta inmunitaria en los pacientes con trasplante de órganos. La TOR (*target of rapamycin*) se identificó mediante el aislamiento de mutantes de levadura resistentes a la inhibición del crecimiento celular por rapamicina. La TOR es una proteínasina grande (~ 2 400 residuos de aminoácidos) que regula diversos procesos celulares en las células de levadura, en respuesta al estado nutricional. En los eucariontes multicelulares, la TOR de metazoos (*mTOR*) también responde a múltiples señales procedentes de las proteínas de señalización de la superficie celular para coordinar el crecimiento celular con programas de desarrollo, así como también el estado nutricional.

En la *Fig. 8-30* se resume la información actual de la vía mTOR. La mTOR en estado activo estimula la velocidad global de la síntesis de proteína mediante fosforilación de dos proteínas cruciales que regulan directamente la traducción; asimismo, también activa los factores de transcripción que controlan la expresión de componentes ribosómicos, de tRNA y factores de traducción, activando aún más la síntesis de proteína y el crecimiento celular.

Recuérdese que el primer paso en la traducción de un mRNA eucarionte es la unión del complejo de iniciación eIF4 a la caperuza 5', a través de su subunidad de unión a cap eIF4E (véase la *Fig. 4-24*). La concentración de eIF4E activa está regulada por una familia pequeña homóloga, *proteínas de unión a eIF4E (4E-BP)*, que inhibe la interacción de eIF4E con las caperuzas 5' de los mRNA. Las 4E-BP son dianas di-

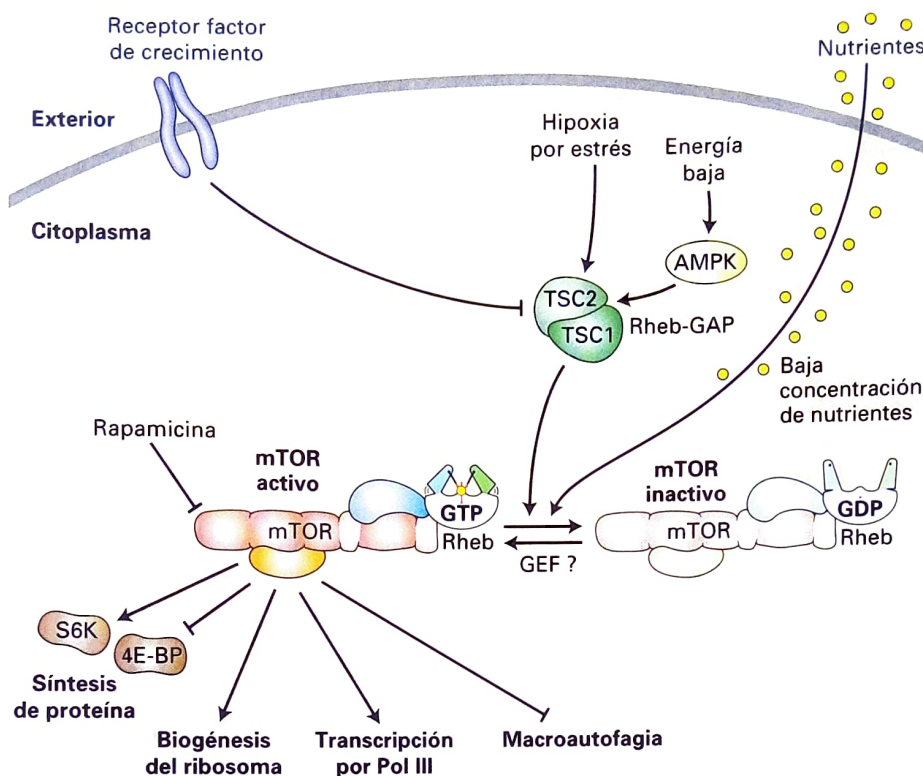


FIGURA 8-30 Vía mTOR. mTOR es una proteincinasa activa cuando está unida a un complejo de Rheb y un GTP (abajo a la izquierda). Por el contrario, mTOR es inactiva cuando está unida a un complejo Rheb asociado con GDP (abajo a la derecha). Cuando está activa, la proteína activadora de TSC1/TSC2 Rheb-GTPasa (Rheb-GAP) causa la hidrólisis del GTP unido a Rheb a GDP, inactivando de esta manera a mTOR. El TSC1/TSC2 Rheb-GAP es activado (flechas) mediante fosforilación por una AMP cinasa (AMPK) cuando la carga de energía celular es baja y por otras respuestas al estrés celular. Las vías de transducción de señal activadas por los receptores de factores de crecimiento llevan a la fosforilación de sitios inactivantes en TSC1/TSC2, inhibiendo su actividad GAP. En consecuencia, estos llevan a una mayor fracción de Rheb celular en la conformación GTP que activa la

actividad proteincinasa de mTOR. La baja concentración de nutrientes también regula la actividad Rheb GTPasa, mediante un mecanismo que no requiere TSC1/TSC2. mTOR activa fosforila a 4E-BP, causando la liberación de eIF4E, estimulando la iniciación de la traducción. También fosforila y activa a la cinasa S6 (S6K), que a su vez fosforila a proteínas ribosómicas, estimulando la traducción. mTOR activada también activa factores de transcripción para la RNA polimerasa I, II y III, llevando a la síntesis y el ensamblaje de ribosomas, tRNA y factores de traducción. En ausencia de actividad mTOR, todos estos procesos se encuentran inhibidos. Por el contrario, mTOR activada inhibe la autofagia, que es estimulada en las células cuando mTOR está inactiva. (Adaptado de S. Wullschlegel et al., 2006, *Cell*, 124:471.)

rectas de mTOR. Cuando 4E-BP es fosforilada por mTOR libera eIF4E, estimulando la iniciación de la traducción; mTOR también fosforila y activa otra proteincinasa (S6K) que fosforila la proteína S6 de la subunidad ribosómica pequeña y probablemente sustratos adicionales, conduciendo a un incremento adicional de la velocidad de síntesis proteica.

La traducción de un subgrupo específico de mRNA que tienen una cadena de pirimidinas en las regiones 5' no traducidas (llamado mRNA TOP por tramo de oligopirimidina), es estimulada de un modo particularmente fuerte por mTOR. Los mRNA TOP codifican proteínas ribosomales y factores de elongación de la traducción; mTOR también activa al factor de transcripción de la RNA polimerasa I, TIF-1A, que estimula la traducción de un precursor de rRNA largo (véase la Fig. 7-52).

mTOR también activa la transcripción por parte de la RNA polimerasa III mediante fosforilación y por lo tanto, activando las proteincinasas que fosforilan a MAF1, un inhibidor proteico de la transcripción de la RNA polimerasa III. La fosforilación de MAF1 provoca que sea exportado desde el núcleo, aliviando la represión de la transcripción por parte de la RNA polimerasa III. Cuando la actividad de mTOR disminuye, MAF1 en el citoplasma es rápidamente desfosforilado

lado e importado al núcleo donde reprime la transcripción de la RNA polimerasa III.

Además, mTOR activa dos activadores de la RNA polimerasa II que estimulan la transcripción de genes de proteínas ribosómicas y factores de traducción. Finalmente, mTOR estimula el procesamiento del precursor de rRNA (Sección 8.5). Como consecuencia de la fosforilación de estos diversos sustratos de mTOR se incrementa en gran medida la síntesis y el ensamblaje de los ribosomas, así como también la síntesis de factores de traducción y de los tRNA. Alternativamente, cuando la actividad cinasa de mTOR está inhibida, estos sustratos se desfosforilan, disminuyendo mucho la velocidad de síntesis proteica y la producción de ribosomas, los factores de traducción, y los tRNA, interrumpiendo el crecimiento celular.

La actividad de mTOR está regulada por una proteína **G monomérica pequeña** de la familia de proteínas Ras llamada Rheb. Al igual que otras proteínas G pequeñas, Rheb está en su conformación activa cuando está unida a GTP. Rheb-GTP se une al complejo mTOR, estimulando la actividad cinasa de mTOR, probablemente al inducir un cambio de conformación en su dominio cinasa. Rheb a su vez está regulado por un heterodímero compuesto de las subunidades TSC1 y

TSC2, nombradas por estar involucradas en el síndrome clínico complejo de esclerosis tuberosa (del inglés tuberous sclerosis complex), como se analizó anteriormente. En la conformación activa, el heterodímero TSC1/TSC2 funciona como una proteína activadora GTPasa para Rheb (Rheb-GAP), causando la hidrólisis del GTP unido a Rheb a GDP. Esto convierte a Rheb a su conformación con GDP unida, que se une al complejo mTOR e inhibe su actividad cinasa. Finalmente, la actividad de TSC1/TSC2 Rheb-GAP está regulada por diversas señales, permitiendo a la célula integrarse en diferentes vías de señalización celular para controlar la velocidad global de la síntesis proteica. La señalización a partir de los receptores de superficie de factores de crecimiento conduce a la fosforilación de TSC1/TSC2 en sitios inhibitorios, causando un incremento en Rheb-GTP y la activación de la actividad cinasa de mTOR. Este tipo de regulación a través de receptores de la superficie celular conecta el control del crecimiento celular con los procesos del desarrollo controlados por las interacciones célula-célula.

La actividad de mTOR también es regulada en respuesta al estado nutricional. Cuando la energía de los nutrientes no es suficiente para el crecimiento, el descenso resultante en la relación de las concentraciones de ATP respecto de AMP es detectado por la AMP cinasa (AMPK). La AMP cinasa fosforila a TSC1/TSC2 en los sitios de activación, estimulando su actividad Rheb-GAP y en consecuencia inhibiendo la actividad mTOR cinasa y la velocidad global de traducción. La hipoxia y otros estreses celulares también activan la Rheb-GAP del TSC1/TSC2. Finalmente, la concentración de nutrientes en el espacio extracelular también regula a Rheb, mediante un mecanismo desconocido que no requiere del complejo TSC1/TSC2.

Además de regular la velocidad global de la síntesis de proteína celular y la producción de ribosomas, los tRNA y los factores de traducción, mTOR regula al menos otro proceso involucrado en la respuesta a las bajas concentraciones de nutrientes: la macroautofagia (o simplemente **autofagia**). Las células privadas de nutrientes degradan los constituyentes citoplasmáticos, incluyendo orgánulos enteros, para suministrar energía y precursores a los procesos celulares esenciales. Durante este proceso una estructura de membrana doble, grande, engulle una región del citoplasma para formar un autofagosoma, que luego se fusiona con un lisosoma donde las proteínas, los lípidos y otras macromoléculas atrapadas son degradados, completando el proceso de macroautofagia. mTOR activado inhibe la macroautofagia en las células en crecimiento cuando los nutrientes son abundantes. La macroautofagia está estimulada cuando la actividad mTOR disminuye en las células privadas de nutrientes.



Los genes que codifican los componentes de la vía mTOR están mutados en muchos cánceres humanos, dando como resultado en el crecimiento celular en la ausencia de señales de crecimiento normales. TSC1 y TSC2 (véase la Fig. 8-30) fueron inicialmente identificados debido a que una u otra de las proteínas es mutante en un síndrome genético humano raro: el complejo de esclerosis tuberosa. Los pacientes con este trastorno desarrollan tumores benignos en múltiples tejidos. La enfermedad resulta de la inactivación de TSC1 o TSC2 que elimina la actividad Rheb-GAP del heterodímero TSC1/TSC2, dando como resultado la concentración desregulada y anormalmente elevada de Rheb-GTP y la actividad desregulada y elevada resultante de mTOR. Las mutaciones en los componentes de las vías de transducción de señales a través de receptores de la superficie celular que llevan a la inhibición de la actividad de Rheb-GAP del TSC1/TSC2, también son comunes en los tumores humanos y contribuyen

al crecimiento celular y a la replicación en ausencia de señales normales para el crecimiento y la proliferación.

La actividad proteínica elevada de mTOR en los tumores se correlaciona con un pronóstico clínico desfavorable. En consecuencia, en la actualidad se están evaluando inhibidores de mTOR en ensayos clínicos a fin de probar su eficacia para tratar cánceres en conjunción con otros modos de terapia. La rapamicina y otros inhibidores de mTOR relacionados son supresores potentes de la respuesta inmunitaria, debido a que inhiben la activación y la replicación de linfocitos T en respuesta a antígenos extraños (Cap. 23). Diversos virus codifican proteínas que activan mTOR pronto después de la infección viral. La estimulación de la traducción resultante tiene una ventaja selectiva obvia para estos parásitos celulares. ■

Cinasas eIF2 Las cinasas también regulan la velocidad global de la síntesis de proteínas celulares. La Fig. 4-24 resume los pasos en la iniciación de la traducción. El factor de iniciación de la traducción eIF2 trae el tRNA iniciador cargado hasta el sitio P de la subunidad ribosómica pequeña; eIF2 es una **proteína G trimérica** y en consecuencia existe en su conformación con un GTP unido o con un GDP unido. Solo la forma de eIF2 con GTP unido es capaz de integrar el tRNA iniciador cargado y asociarse con la subunidad ribosómica pequeña. La subunidad pequeña con el factor de iniciación unido y el tRNA iniciador cargado, luego interactúa con el complejo eIF4 unido a la caperuza 5' de un mRNA a través de su subunidad eIF4E. A continuación la subunidad ribosómica pequeña se mueve rastreando en la dirección 3' del mRNA en busca del codón de iniciación AUG, que puede formar apareamiento de bases con el tRNA iniciador en su sitio P. Cuando esto ocurre, el GTP unido por eIF2 es hidrolizado a GDP y se libera el complejo eIF2-GDP resultante. La hidrólisis GTP da como resultado un paso de "corrección de prueba" irreversible, que prepara la subunidad ribosómica pequeña para asociarse con la subunidad grande solo cuando un tRNA iniciador es adecuadamente unido al sitio P y se aparea de manera correcta con el codón de inicio AUG. Antes de que eIF2 pueda participar en otro ciclo de iniciación, su GDP unido debe ser reemplazado con GTP. Este proceso está catalizado por el factor de iniciación de la traducción eIF2B, un factor de intercambio de nucleótido de guanina (GEF) específico para eIF2.

Un mecanismo para la inhibición de la síntesis proteica en general de las células estresadas involucra la fosforilación de la subunidad α de eIF2 en una serina específica. La fosforilación en este sitio no interfiere con la función eIF2 en la síntesis de proteína directamente. En su lugar, el eIF2 fosforilado tiene una muy alta afinidad para el factor de intercambio de nucleótido guanina eIF2, eIF2B, que no puede liberar el eIF2 fosforilado y en consecuencia está bloqueado para catalizar el intercambio de GTP de factores adicionales eIF2. Puesto que existe un exceso de eIF2 respecto de eIF2B, la fosforilación de una fracción de eIF2 da como resultado la inhibición de todo el eIF2B celular. El resto de eIF2 se acumula en su forma de GDP unido, que no puede participar en la síntesis proteica, inhibiendo así casi toda la síntesis de proteína celular. Sin embargo, algunos mRNA tienen regiones 5' que permiten la iniciación de la traducción a la concentración de eIF2-GTP, que resulta de la fosforilación de eIF2. Estos mRNA incluyen aquellos para proteínas chaperonas que funcionan para volver a plegar las proteínas celulares desnaturalizadas como resultado del estrés celular, proteínas adicionales que ayudan a la célula a lidiar con el estrés y los factores de transcripción que activan la transcripción de los genes que codifican las proteínas inducidas por estrés.

Las células humanas contienen cuatro cinasas eIF2 que fosforilan la misma serina de inhibitoria eIF2 α . Cada una de estas está regulada por un tipo diferente de estrés celular, inhibiendo la síntesis de proteína y permitiendo a las células repartir la gran fracción de recursos celulares usualmente utilizados para la síntesis de proteína en las células en crecimiento, para que sean usados en responder al estrés.

La cinasa GCN2 eIF2 (control general no desreprimible 2) es activada por la unión de los tRNA sin carga. La concentración de los tRNA sin carga aumenta cuando las células están privadas de aminoácidos, activando la actividad cinasa de GCN2 eIF2 e inhibiendo en gran medida la síntesis de proteína.

La PEK (cinasa pancreática eIF2) se activa cuando las proteínas translocadas al interior del retículo endoplasmático (RE) no se pliegan adecuadamente, debido a anomalías en el ambiente del interior del RE. Los inductores, incluyendo concentraciones elevadas de hidratos de carbono debido a que estos inhiben la glucosilación de muchas proteínas del RE y las mutaciones inactivantes en una chaperona del RE, son necesarias para el adecuado plegamiento de muchas proteínas del RE (Caps. 13 y 14).

El inhibidor hemirregulado (HRI) es activado en los eritrocitos en desarrollo cuando el suministro del grupo prostético hemo es demasiado bajo para acomodar la velocidad de la síntesis de la proteína globina. Este ciclo de retroalimentación negativa disminuye la velocidad de síntesis de la proteína globina hasta que coincide con la velocidad de síntesis del grupo hemo. HRI también se activa en otros tipos de células en respuesta al estrés oxidativo o al choque térmico.

Finalmente, la proteincinasa activada por RNA (PKR) es activada por los RNA doble hebra más largos que ~ 30 pares de bases. En circunstancias normales en las células de mamífero, tales RNA doble hebra solo se producen durante una infección viral. Largas regiones de RNA doble hebra se generan en los intermediarios de replicación de virus de RNA o a partir de la hibridación de regiones complementarias de RNA, que se transcriben a partir de ambas hebras de los genomas de virus de DNA. La inhibición de la síntesis de proteína evita la producción de progenie de viriones, protegiendo células vecinas de la infección. De manera interesante, los adenovirus desarrollaron una defensa contra la PKR: ellos expresan cantidades prodigiosas de un RNA asociado al virus (VA) de ~ 160 nucleótidos con regiones doble hebra largas en horquillas. VA RNA es transcrito por la RNA polimerasa III y exportado desde el núcleo por la exportina 5, la exportina para los pre-mRNA (véase la Fig. 8-27). El VA RNA se une a la PKR con afinidad elevada, inhibiendo su actividad proteincinasa y evitando la inhibición de la síntesis de proteína observada en las células infectadas con un adenovirus mutante a partir del cual se eliminó el gen VA.

Las proteínas de unión al RNA de secuencia específica controlan la traducción del mRNA específico

En contraste a la regulación global del mRNA, los mecanismos también han evolucionado para controlar la traducción de ciertos mRNA. Esto lo suelen realizar proteínas de unión a RNA de secuencia específica que se unen a una secuencia particular o estructura de RNA en el mRNA. Cuando la unión es en la región 5' no traducida (5' UTR) de un mRNA, se bloquea la capacidad de un ribosoma de realizar una búsqueda para detectar el primer codón de iniciación, inhibiendo la iniciación de la traducción. La unión en otras regiones puede promover o inhibir la degradación del mRNA.

El control de la concentración de hierro intracelular por parte de la proteína de unión a elementos de respuesta al hierro (IRE-BP) es un ejemplo sofisticado de una única proteína que regula la traducción de un mRNA y la degradación de otro. La regulación precisa de la concentración del hierro celular es crucial para la célula. Múltiples enzimas y proteínas contienen Fe²⁺ como cofactor, tales como las enzimas del ciclo de Krebs (véase la Fig. 12-10) y las proteínas de transporte de electrones involucradas en la generación de ATP en las mitocondrias y cloroplastos (Cap. 12). Por el otro lado, el exceso de Fe²⁺ genera radicales libres que reaccionan con las macromoléculas celulares y las dañan. Cuando los almacenamientos de hierro intracelular son bajos, funciona un sistema de control dual para incrementar las concentraciones de hierro celular; si hay hierro en exceso, el sistema funciona para evitar la acumulación de niveles tóxicos de iones hierro libres.

Un componente en este sistema es la regulación de la producción de ferritina, una proteína de unión a hierro intracelular que se une y almacena el exceso de hierro celular. La región 5' no traducida de mRNA ferritina contiene elementos de respuesta al hierro (IRE) que tienen una estructura de tallo y bucle. La proteína de unión a IRE (IRE-BP) reconoce cinco bases específicas en el bucle IRE y en la naturaleza dúplex del tallo. A concentraciones bajas de hierro, la IRE-BP se encuentra en su conformación activa que se une a las IRE (Fig. 8-31a). La unión de IRE-BP bloquea la subunidad pequeña del ribosoma para el codón de inicio AUG (véase la Fig. 4-24), inhibiendo así la iniciación de la traducción. La disminución resultante en la ferritina significa que hay menos hierro formando complejo con la ferritina y por ende, se encuentra más hierro disponible para las enzimas que lo requieren. A concentraciones elevadas de hierro, la IRE-BP se encuentra en una conformación inactiva que no se une a los IRE 5', por lo tanto puede proceder la iniciación de la traducción. Las ferritinas recién sintetizadas luego se unen a los iones hierro libre, evitando su acumulación hasta concentraciones perjudiciales.

La otra parte de este sistema regulador controla la importación del hierro al interior de las células. En los vertebrados, la ingesta de hierro es transportada a través del sistema circulatorio unido a una proteína denominada transferrina. Después de la unión al receptor de transferrina (TfR) en la membrana plasmática, el complejo transferrina-hierro es introducido al interior de las células mediante endocitosis mediada por receptor (Cap. 14). La región 3' no traducida del mRNA TfR contiene IRE cuyos tallos tienen secuencias desestabilizadoras ricas en AU (Fig. 8-31b). A concentraciones elevadas de hierro, cuando la IRE-BP está en la conformación inactiva, no unida, estas secuencias ricas en AU promueven la degradación del mRNA TfR por el mismo mecanismo que lleva a la rápida degradación de otros mRNA de vida corta, como se describió anteriormente. La disminución resultante en la producción del receptor transferrina rápidamente reduce la importación de hierro, protegiendo así a la célula del exceso de hierro. A concentraciones de hierro bajas, sin embargo, IRE-BP puede unirse a los IRE 3' en el mRNA de TfR. La IRE-BP unida bloquea el reconocimiento de las secuencias desestabilizadoras ricas en AU mediante las proteínas que de otra manera podrían degradar rápidamente los mRNA. Como resultado, se incrementa la producción del receptor transferrina y se lleva más hierro al interior de la célula.

Otras proteínas de unión al RNA reguladas también pueden actuar en el control de la traducción o la degradación del mRNA, al igual que la IRE-BP de doble acción. Por ejemplo, una proteína de unión al RNA sensible al hemo controla la traducción del mRNA que codifica la aminolevulinato sintasa (ALA), una enzima clave en la síntesis del hemo.

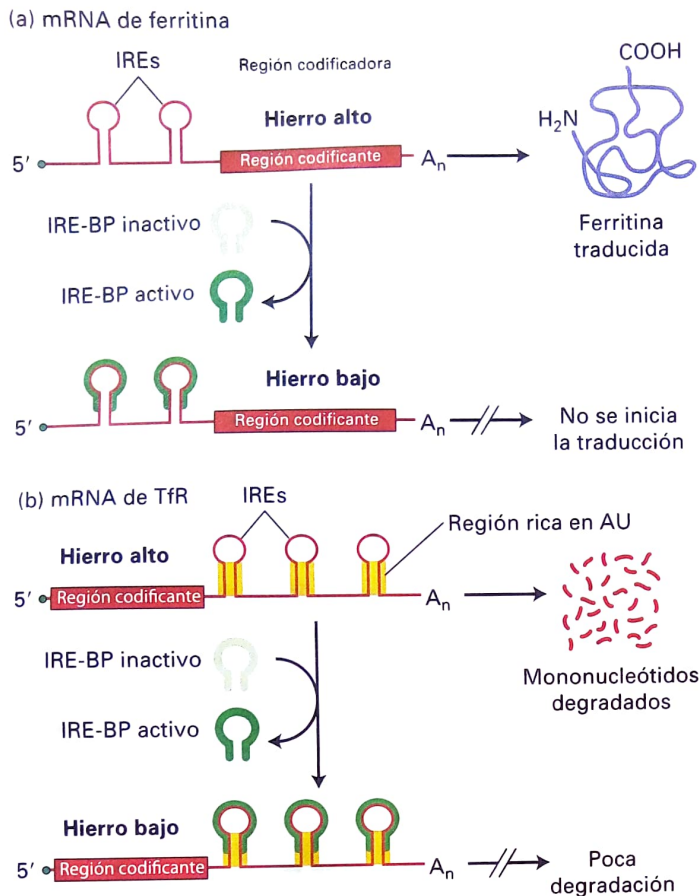


FIGURA 8-31 Regulación dependiente de hierro de la traducción y degradación de mRNA. La proteína de unión a los elementos de respuesta al hierro (IRE-BP) controla (a) la traducción de mRNA ferritina y (b) la degradación de mRNA del receptor de transferrina (TfR). Una concentración de hierro intracelular baja IRE-BP se une a los elementos de respuesta a hierro (IRE) en la región 5' o 3' no traducida de estos mRNA. A altas concentraciones de hierro, IRE-BP sufre un cambio en la conformación y no puede unir los mRNA. El control dual por parte de IRE-BP regula precisamente la concentración de iones de hierro libre dentro de las células. Véase el texto para mayor detalle.

De manera similar, estudios *in vitro* han demostrado que el mRNA que codifica la proteína de la leche caseína está estabilizada por la hormona prolactina y rápidamente se degrada en su ausencia.

Mecanismos de vigilancia evitan la traducción de los mRNA procesados inadecuadamente

La traducción de un mRNA procesado de manera inadecuada podría llevar a la producción de una proteína anormal, que interfiere con la función normal del gen. Este efecto es equivalente al que resulta de las mutaciones dominantes negativas, analizadas en el Capítulo 5 (Fig. 5-44). Diversos mecanismos colectivamente denominados **vigilancia del mRNA** ayudan a la célula a evitar la traducción de las moléculas de mRNA procesadas de manera inadecuada. Previamente se mencionaron dos de tales mecanismos de vigilancia: el reconocimiento de los pre-mRNA procesados inadecuadamente en el núcleo y sus degradaciones por el exosoma, y la restricción general contra la exportación nuclear de los pre-mRNA procesados de forma incompleta que permanecen asociados con un espliceosoma.

Otro mecanismo llamado *degradación mediada por mutaciones sin sentido* causa la degradación de los mRNA, en los cuales uno o más exones han sido cortados y empalmados de manera incorrecta. Tal procesamiento incorrecto suele alterar el marco abierto de lectura de la región 3' de la unión exón inadecuada, dando como resultado la introducción de una mutación con sentido alterado fuera de marco y un codón de terminación incorrecto. Para casi todos los mRNA cortados correctamente, el codón de terminación está en el exón final. Esta degradación mediada por mutaciones sin sentido da como resultado la rápida degradación de los mRNA con los codones de terminación, que se producen antes de la última unión cortada y empalmada en el mRNA puesto que en la mayoría de los casos, tales mRNA surgen por errores en el proceso de corte y empalme del RNA. Sin embargo, la degradación mediada por mutaciones sin sentido también tiene lugar a partir de una mutación que crea un codón de terminación dentro de un gen o una delección o inserción con corrimiento del marco de lectura. Este mecanismo de degradación se descubrió inicialmente durante el estudio de pacientes con talasemia β^0 , quienes producen una concentración baja de proteína globina asociada con una concentración baja de mRNA β -globina (Fig. 8-32a, b).

Una búsqueda de posibles señales moleculares que podrían indicar las posiciones de las uniones empalmadas en un mRNA procesado, llevó al descubrimiento de los complejos de unión de exones. Como ya se mencionó, estos complejos de diversas proteínas (incluyendo Y14, Magoh, eIF4III, UPF2, UPF3 y REF), unen ~ 20 nucleótidos 5' a una unión exón-exón a continuación del proceso de corte y empalme del RNA (Fig. 8-32c), estimulando la exportación de los mRNP desde el núcleo mediante interacción con el mRNA exportador (véase la Fig. 8-21). El análisis de mutantes de levadura indicó que una de las proteínas en los complejos de unión de exones (UPF3) funciona en la degradación mediada por mutaciones sin sentido. En el citoplasma, este componente de complejos de unión de exones interactúa con una proteína (UPF1) y una proteína (SMG1) que fosforila UPF1, causando que el mRNA se asocie con los cuerpos P, reprimiendo la traducción del mRNA. Una proteína adicional (UPF2) asociada con el complejo mRNP, se une a un cuerpo P asociado con la desanilasa que rápidamente elimina la cola de poli(A) de un mRNA asociado, llevando a la rápida eliminación de la caperuza 5' y a la degradación del cuerpo P asociado a la exonucleasa 5' → 3' (véase la Fig. 8-29). En el caso de los mRNA adecuadamente procesados, el complejo unión-exón se asocia con el complejo de unión a la caperuza nuclear (CBP80, CBP20) a medida que el mRNP es transportado a través de un complejo del poro nuclear, protegiendo así al mRNA de la degradación. Se cree que los complejos de unión de exones son desprendidos del mRNA al pasar por el primer ribosoma "pionero" para traducir el mRNA. Sin embargo, para los mRNA con un codón de terminación antes de la unión de los exones finales, uno o más complejos de unión de exones permanece asociado con el mRNA, dando como resultado la degradación mediada por mutaciones sin sentido (Fig. 8-32).

Localización de los mRNA que permiten la producción de proteínas en regiones específicas dentro del citoplasma

Muchos procesos celulares dependen de la localización de proteínas particulares en estructuras o regiones específicas de la célula. En los últimos capítulos se analizará cómo algunas proteínas son transpor-

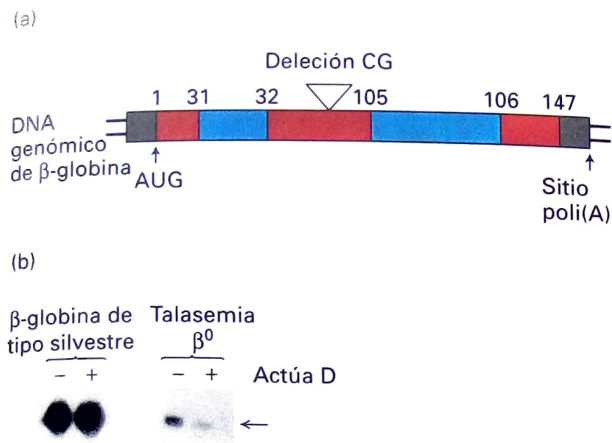
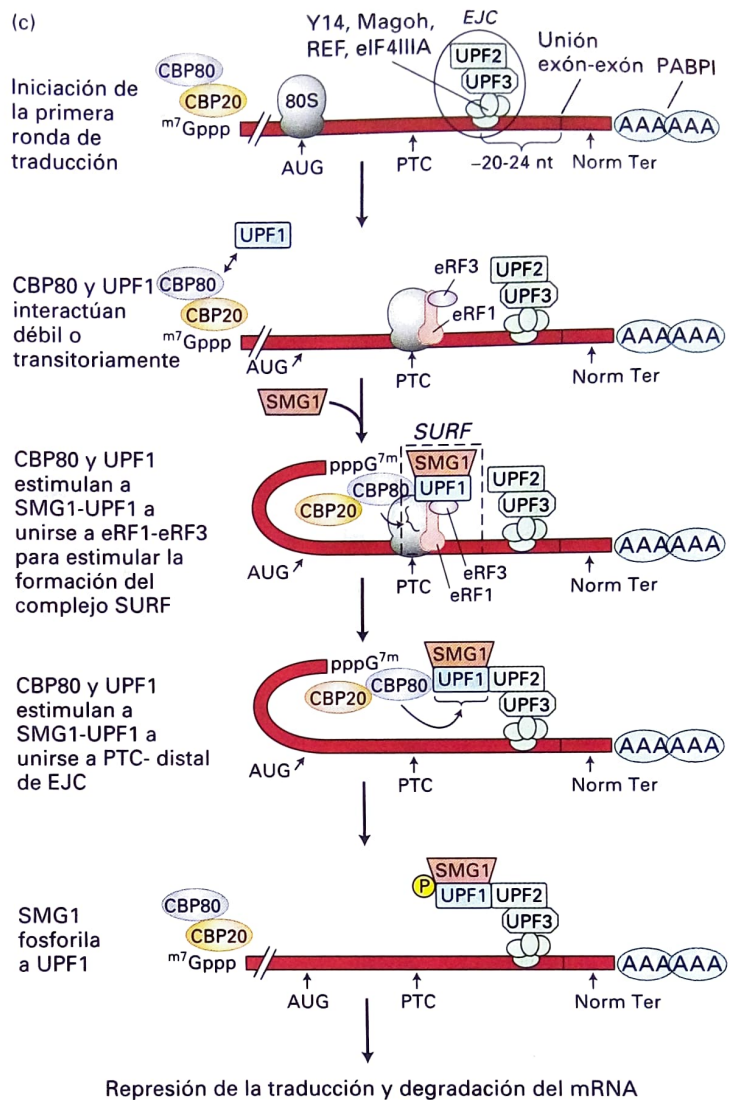


FIGURA 8-32 Descubrimiento de la degradación del mRNA mediada por mutaciones sin sentido. (a) Los pacientes con talasemia β⁰ expresan muy bajas concentraciones de mRNA β-globina. Una causa común de este trastorno es una delección de un único par de bases en el exón 1 o en el exón 2 del gen de la β-globina. Los ribosomas que traducen el mRNA mutante leen fuera del marco de lectura a continuación de la delección y se encuentran con un codón de terminación erróneo en el marco abierto de lectura antes de que traduzcan la última unión de exón en el mRNA. En consecuencia, no reemplazan un complejo exón-unión (EJC) del mRNA. Las proteínas citoplasmáticas se asocian con EJC e inducen degradación del mRNA. (b) Se obtuvo médula ósea de un paciente con un gen de β-globina de tipo silvestre y de un paciente con talasemia β⁰. Se aisló el RNA a partir de las células de médula ósea poco tiempo después de la recolección, o 30 minutos después de su transcripción. Se midió la cantidad de Actinomicina D, un fármaco que inhibe la transcripción. Se midió la cantidad de

tadas después de sus síntesis a sus localizaciones celulares apropiadas. De modo alternativo, la localización de proteína se puede lograr mediante localización de los mRNA en regiones específicas del citoplasma, en las cuales funcionan las proteínas codificadas. En la mayoría de los casos analizados hasta el momento, tal localización del mRNA está especificada por las secuencias en la región 3' no traducida del mRNA. Un estudio a nivel genómico reciente de la localización del mRNA en

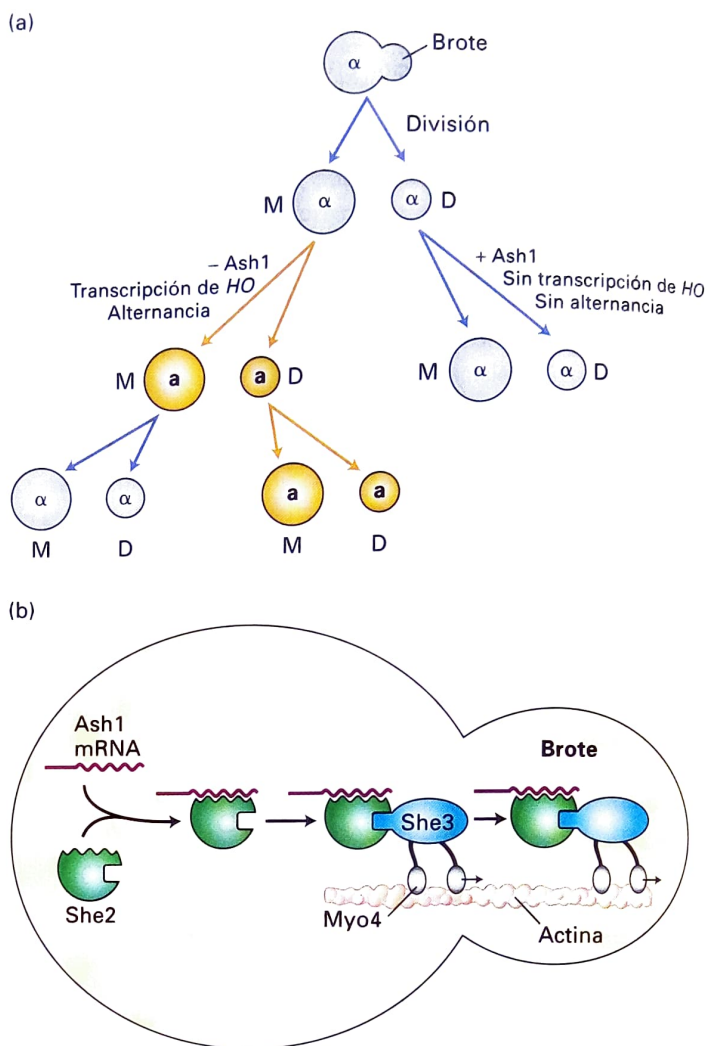


RNA β-globina usando un método de protección con nucleasa S1 (flecha). El paciente con talasemia β⁰ tenía mucho menos mRNA β-globina que el paciente con el gen β-globina de tipo silvestre (- Act D). El mRNA β-globina mutante se degradó rápidamente cuando se inhibió la transcripción (+ Act D), mientras que el mRNA de β-globina de tipo silvestre permaneció estable. (c) Un modelo actual de NMD. PTC, el codón de terminación prematuro. Norm term, el codón de terminación normal. SURF, complejo de proteínas SMG1, UPF1 y los factores de terminación de la traducción eRF1 y eRF3. La formación del complejo SURF lleva a la fosforilación de UPF1 y a la asociación de fosfo-UPF1 con el complejo UPF2-UPF3 unido a cualquiera de los complejos de unión exón-exón que no fueron desplazados del mRNA por el primer ribosoma pionero en traducir el mensaje. Esto lleva a la asociación del mRNA que contiene PTC con cuerpos P, eliminando la cola de poli(A) y la degradación del mRNA. (Parte [b] de L. E. Maquat y cols., 1981, *Cell* 27:543. Parte [c] adaptado de J. Hwang y cols., 2010, *Mol. Cell* 39:396.)

embriones de *Drosophila* reveló que el ~ 70% de los 3 000 mRNA analizados se localizaron en regiones subcelulares específicas, elevando la posibilidad de que esto sea un fenómeno mucho más general de lo apreciado anteriormente.

Localización de los mRNA en el brote en *S. cerevisiae* El ejemplo mejor comprendido acerca de la localización del mRNA se produce

FIGURA 8-33 Alternancia del tipo de apareamiento en células de levadura haploides. (a) La división por gemación forma una gran célula madre (M) y células hijas pequeñas (D), ambas de las cuales tienen el mismo tipo de apareamiento que la célula original (α en este ejemplo). La célula madre puede alternar el tipo de apareamiento durante G1 del siguiente ciclo celular y luego se vuelve a dividir, produciendo células del tipo de apareamiento opuesto (a en este ejemplo). El cambio depende de la transcripción del gen *HO*, que se produce solo en ausencia de la proteína Ash1. Las células hijas más pequeñas, que producen la proteína Ash1, no pueden cambiar; después de crecer en tamaño en la interfase, se dividen para formar una célula madre y una célula hija. (b) Modelo para la restricción de la alternancia del tipo de apareamiento para las células madres en *S. cerevisiae*. La proteína Ash1 evita que una célula transcriba el gen *HO* cuya proteína codificada inicia el reordenamiento del DNA que produce la alternancia del tipo de apareamiento de α a α o de α a α . La alternancia se produce únicamente en la célula madre, después de que se separa de una célula hija que brotó recientemente, debido a que la proteína ASH1 está presente solo en la célula hija. La base molecular para esta localización diferencial de Ash1 es el transporte unidireccional del mRNA de ASH1 al brote. Una proteína conectora, She2, se une a secuencias específicas 3' no traducidas en el mRNA de *ASH1* y también se une a la proteína She3. Esta proteína a su vez se une a un motor de miosina, Myo4, que se mueve a lo largo de los filamentos de actina hacia el interior del brote. [Véase S. Koon y B. J. Schnapp, 2001, *Curr. Biology* 11:R166.]



en las levaduras *S. cerevisiae*. Como se analizó en el Capítulo 7, el tipo de apareamiento α o α que exhibe una célula de levadura haploide está determinado por los genes α o α presentes en el locus *MAT* expresado en el cromosoma III (véase la Fig. 7-33). El proceso que transfieren los genes α o α desde el locus de tipo de apareamiento silencioso al locus *MAT* expresado, es iniciado por una endonucleasa específica de secuencia llamada *HO*. La transcripción del gen *HO* es dependiente del complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF (véase el Cap. 7, Sección 7.5). Las células de levadura hijas que surgen por gemación a partir de las células madre contienen un represor transcripcional llamado Ash1 (por Síntesis asimétrica de *HO*), el cual evita el reclutamiento del complejo SWI/SNF al gen *HO*, evitando por ende su transcripción. La ausencia de Ash1 de las células madre les permite transcribir el gen *HO*. Como consecuencia las células madre cambian sus tipos de apareamiento, mientras que las células hijas generadas por gemación no (Fig. 8-33a).

La proteína Ash1 se acumula solo en las células hijas debido a que el mRNA que la codifica se localiza en las células hijas. El proceso de localización requiere tres proteínas: She2 (por expresión de SWI dependiente de *HO*), una proteína de unión al RNA que se une concretamente a una señal de localización con una estructura de RNA específica en el mRNA ASH1; Myo4, una proteína motora de miosina que mueve carga sobre los filamentos de actina (véase el Cap. 17); y She3, que se une a She2 y por lo tanto el mRNA ASH1 a Myo4 (Fig. 8-33b). El mRNA ASH1 se transcribe en el núcleo de la célula madre antes de la mitosis. El movimiento de Myo4 con su mRNA ASH1 unido a lo largo de los filamentos de actina que se extienden desde la célula madre al interior del brote, lleva el mRNA ASH1 al interior del brote en crecimiento antes de la división celular.

Se encontraron al menos otros 23 mRNA que son transportados por She2, She3, y el sistema Myo4. Todos tienen una señal de localización a la cual se une She2, en general en sus 3' UTR. El proceso se puede visualizar en las células vivas mediante el experimento que se muestra en la Figura 8-34. Los RNA se pueden marcar con fluorescencia al in-

cluir en sus secuencias sitios de unión de alta afinidad para las proteínas de unión a RNA, como la proteína MS2 de la cubierta proteica del bacteriófago y la proteína λ N del bacteriófago que se une a diferentes tallos bucle de secuencia específica (Fig. 8-34a). Cuando tales mRNA genéticamente modificados son expresados en las células de levadura en gemación, junto a las proteínas del bacteriófago fusionadas con las proteínas que fluorescen en diferentes colores, las proteínas de fusión se unen a sus secuencias de RNA específicas marcando de esta manera con diferentes colores a los mRNA que las contienen. En el experimento mostrado en la Figura 8-34b, el mRNA ASH1 se marcó por la unión de la proteína verde fluorescente fusionada a λ N. Otro mRNA localizado en el brote mediante este sistema, el IST2 mRNA que codifica un componente de la membrana del brote en crecimiento, se marcó mediante la unión de una proteína de color rojo fluorescente fusionada a la proteína de la cubierta MS2. El video de una célula en gemación demostró que los diferentes mRNA ASH1 e IST2 se acumularon en la misma partícula RNP citoplasmática grande, conteniendo múltiples mRNA en el citoplasma de la célula madre, como se puede ver a partir de la combinación de las señales verde y rojo fluorescentes. La partícula RNP luego fue transportada al interior del brote aproximadamente en un minuto.

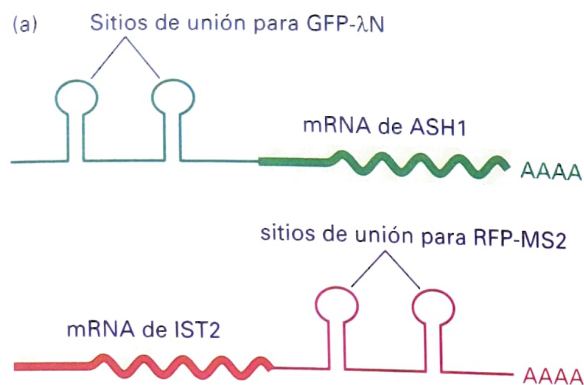
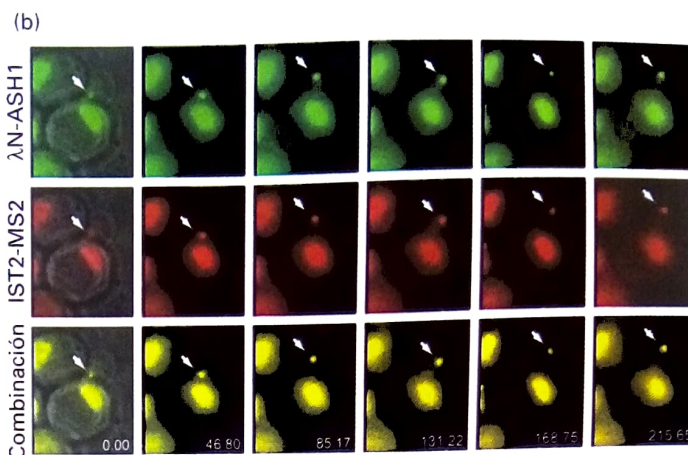


FIGURA EXPERIMENTAL 8-34 Transporte de las partículas desde una célula madre al interior de un brote. (a) Se modificaron genéticamente células de levadura para que expresen mRNA ASH1 con sitios de unión para la proteína λN del bacteriófago en su región 5' no traducida y un mRNA IST2 con sitios de unión para la proteína MS2 de la cubierta del bacteriófago en su región 3' no traducida. También se expresó en las mismas células una fusión de proteína verde fluorescente con la proteína λN (GFP-λN) y una fusión de proteína roja fluorescente con la proteína de la cubierta MS2 (RFP-MS2). En otros experimentos, se demostró que estas proteínas de unión a secuencias específicas de RNA marcadas se unen a sus propios sitios de unión específicos, modificados genéticamente para los mRNA de ASH1 e IST2 y no a los sitios de unión de los demás. Ambas proteínas marcadas con fluorescencia también contenían una señal de localización nuclear, de manera tal que las proteínas fluorescentes que no se unieron a sus sitios de unión de alta afinidad en estos mRNA fueron transportadas a los núcleos a través de los complejos del poro nuclear (véase el Cap. 13). Esto fue necesario para evitar una alta fluorescencia



del exceso de GFP-λN y RFP-MS2 en el citoplasma. A la derecha, se visualizó de manera independiente a GFP-λN y RFP-MS2 mediante el uso de excitación láser con milisegundos de alternancia de GFP y RFP. (b) Se muestran imágenes de un video de células fluorescentes. El núcleo al lado de la vacuola grande en la célula madre cerca del centro de las microfotografías, así como también los núcleos en las células vecinas, se observaron por fluorescencia verde y roja como se muestra con las flechas en la parte superior y central. En la parte inferior se muestra una combinación de dos imágenes, que también indica el tiempo transcurrido entre las imágenes. Una partícula de RNP conteniendo ambos mRNA ASH1 con sitios de unión λN y el mRNA IST2 con sitios de unión MS2, se observó en el citoplasma de la célula madre en la columna izquierda de las imágenes (flecha). La partícula incrementó su intensidad entre 0,00 y 46,80 segundos, lo cual indica que hay más de estos mRNA unidos a la partícula RNP. La partícula RNP se transportó al brote entre los 46,80 y 85,17 segundos y luego se localizó en el extremo del brote. [De S. Lange y cols., 2008, *Traffic* 9:1256. Véase este artículo para visualizar el video.]

Localización de los mRNA en las sinapsis en el sistema nervioso de mamífero Como se mencionó anteriormente, en las neuronas la localización de mRNA específicos en las sinapsis alejadas del núcleo en el cuerpo celular cumple una función esencial en el aprendizaje y la memoria (Fig. 8-35). Al igual que los mRNA localizados en levadura, estos mRNA contienen señales de localización de RNA en sus regiones 3' no traducidas. Algunos de estos mRNA son sintetizados inicialmente con colas de poli(A) cortas que no permiten la iniciación de la traducción. Una vez más, se forman grandes partículas de RNP conteniendo múltiples mRNA portando señales de localización en el citoplasma cerca del

núcleo celular. En este caso, las partículas de RNP son transportadas por el axón hasta la sinapsis mediante proteínas motoras cinetinas que viajan por los microtúbulos que se extienden a lo largo de la longitud del axón (véase el Cap. 18). La actividad eléctrica en una sinapsis dada puede entonces estimular la poliadenilación de los mRNA en la región de la sinapsis, activando la traducción de las proteínas codificadas que aumentan de tamaño y alteran las propiedades neurofisiológicas de una sinapsis, mientras que dejan sin afectar a los cientos de miles de otras sinapsis formadas por la neurona.

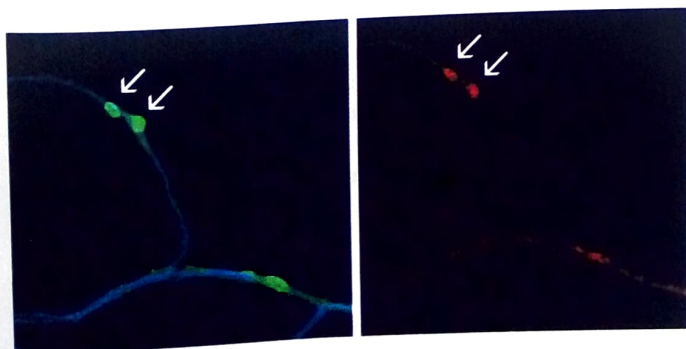


FIGURA EXPERIMENTAL 8-35 Un mRNA neuronal específico se localiza en las sinapsis. Se cultivaron neuronas sensitivas de la babosa de mar *Aplysia californica* con neuronas motoras diana, de manera tal que los procesos de las neuronas sensitivas formen sinapsis con los procesos de las neuronas motoras. La microfotografía a la izquierda muestra los procesos de la neurona motora visualizados con un colorante azul fluorescente. La GFP-VAMP (verde) se expresó en las neuronas sensitivas y marca la localización de las sinapsis formadas entre los procesos de neurona sensitiva y motora (flechas). La microfotografía de la derecha muestra fluorescencia roja de la hibridación *in situ* de una sonda de mRNA antisensorina. La sensorina es un neurotransmisor expresado por la neurona sensitiva sola: los procesos de la misma no se visualizan en esta preparación, pero se encuentran adyacentes a los procesos de la neurona motora. El resultado de esta hibridación *in situ* indica que el mRNA sensorina se localiza en las sinapsis [De V. Lyles, Y. Zhao, y K. C. Martin, 2006, *Neuron* 49:323.]

CONCEPTOS CLAVE de la sección 8.4

Mecanismos citoplasmáticos de control postranscripcional

- La transcripción se puede reprimir mediante los micro-RNA (miRNA), que forman híbridos imperfectos con las secuencias en la región 3' no traducida (UTR) de mRNA diana específicos.
- El fenómeno relacionado de interferencia por RNA, que probablemente evolucionó como un sistema de defensa primitivo contra virus y transposones, condujo a la degradación de los mRNA que forman híbridos perfectos con los RNA de interferencia cortos (siRNA).
- Tanto los miRNA como los siRNA contienen 21-23 nucleótidos, son generados a partir de moléculas precursoras más largas y son unidos por una proteína Argonauta, ensamblándose en un complejo multiproteico silenciador inducido por RNA (RISC) que reprime la traducción de los mRNA diana o los corta (véanse las Figs. 8-25 y 8-26).
- La poliadenilación citoplasmática es necesaria para la traducción de los mRNA con una cola corta de poli(A). La unión de una proteína específica a los elementos reguladores en sus 3' UTR reprime la traducción de estos mRNA. La fosforilación de esta proteína de unión al RNA, inducida por una señal externa, conduce al alargamiento de la cola de poli(A) 3' y por lo tanto, a la traducción (véase la Fig. 8-28).
- La mayoría de los mRNA son degradados como el resultado del acortamiento gradual de sus colas de poli(A) (desadenilación) seguida por la digestión 3' → 5' mediada por exosoma o la eliminación de la caperuza 5' y la digestión por una exonucleasa 3' → 5' (véase la Fig. 8-29).
- Los mRNA eucariontes que codifican proteínas que se expresan en ráfagas cortas, en general tienen copias repetidas de una secuencia rica en AU en sus 3' UTR. Proteínas específicas que se unen a estos elementos también interactúan con la enzima desadenilante y los exosomas citoplasmáticos promueven la rápida degradación del RNA.
- La unión de varias proteínas a los elementos reguladores en los 3' o 5' UTR de los mRNA regulan la traducción o degradación de muchos mRNA en el citoplasma.
- La traducción del mRNA ferritina y la degradación del mRNA del receptor de ferritina (TfR) son ambos regulados por la misma proteína de unión al RNA sensible a hierro. A baja concentración de hierro, esta proteína se encuentra en una conformación que se une a elementos específicos en los mRNA, inhibiendo la traducción del mRNA de ferritina o la degradación del mRNA TfR (véase la Fig. 8-31). Este control dual regula de manera precisa la concentración de hierro dentro de las células.
- La degradación mediada por mutaciones sin sentido y otros mecanismos de vigilancia del mRNA evitan la traducción de los mRNA procesados de manera inadecuada que codifican proteínas anómalas, las cuales podrían interferir con el funcionamiento de las proteínas normales correspondientes.
- Muchos mRNA son transportados a localizaciones subcelulares específicas mediante proteínas de unión a RNA de secuencia específica que se unen a secuencias de localización, las cuales en general se encuentran en la 3' UTR. Estas proteínas de unión al RNA luego se asocian direc-

tamente o a través de proteínas intermediarias con proteínas motoras que transportan los grandes complejos RNP, con muchos mRNA que tienen la misma señal de localización sobre fibras de actina o microtúbulos hasta localizaciones específicas en el citoplasma.

8.5 Procesamiento del rRNA y tRNA

Aproximadamente el 80% del RNA total en las células de mamífero en crecimiento rápido (p. ej., células HeLa cultivadas) es rRNA y el 15% es tRNA; así, el mRNA que codifica proteína constituye solo una pequeña porción del RNA total. Los transcritos primarios producidos a partir de la mayoría de los genes rRNA y de los genes de tRNA, como los pre-mRNA, son procesados exhaustivamente para dar las formas funcionales maduras de estos RNA.

El ribosoma es una estructura compleja, altamente evolucionada (véase la Fig. 4-23), optimizada para su función en la síntesis de proteína. La síntesis de ribosomas requiere la función y coordinación de las tres RNA polimerasas nucleares. Los rRNA 28S y 5.8S asociados con la subunidad ribosómica grande y el rRNA 18S de la subunidad menor son transcritos por la RNA polimerasa I. El rRNA 5S de la subunidad mayor es transcrito por la RNA polimerasa III y los mRNA que codifican proteínas ribosómicas son transcritos por la RNA polimerasa II. Además de los cuatro rRNA y las ~ 70 proteínas ribosómicas, al menos otros 150 RNA y proteínas interactúan transitoriamente con las subunidades ribosómicas durante sus ensamblajes a través de una serie de pasos coordinados. Aún más, múltiples bases específicas y ribosomas de los rRNA maduros son modificados para optimizar sus funciones en la síntesis proteica. Aunque la mayoría de los pasos en el ensamblaje y la síntesis de la subunidad ribosómica se producen en el **nucleólo** (un subcompartimento del núcleo no delimitado por membrana), parte se produce en el nucleoplasma durante el paso desde el nucleólo hasta los complejos del poro nuclear. Antes de la exportación nuclear se produce un paso de control de calidad, de manera tal que solo las subunidades totalmente funcionales sean exportadas al citoplasma, donde se producen los pasos finales de maduración de la subunidad ribosómica. Los tRNA también son procesados y modificados de manera extensa antes de que sean exportados al citoplasma y sean usados en la síntesis de proteína. Primero analizaremos el procesamiento y la modificación del rRNA, así como el ensamblaje y exportación nuclear de los ribosomas. Luego se considerará el procesamiento y la modificación de los tRNA.

Los genes pre-rRNA funcionan como organizadores nucleolares y son similares en todos los eucariontes

Los rRNA 28S y 5.8S se asocian con la subunidad ribosómica mayor (60S) y el rRNA 18S se asocia con la subunidad ribosómica menor (40S) en los eucariontes superiores (y los rRNA funcionalmente equivalentes en todos los demás eucariontes) están codificados por un único tipo de unidad de transcripción **pre-rRNA**. En las células humanas, la transcripción por parte de la RNA polimerasa I produce un transcrito primario (pre-rRNA) 45S (~ 13,7 kb), que es procesado para dar los rRNA maduros 28S, 18S, y 5.8S que se encuentran en los

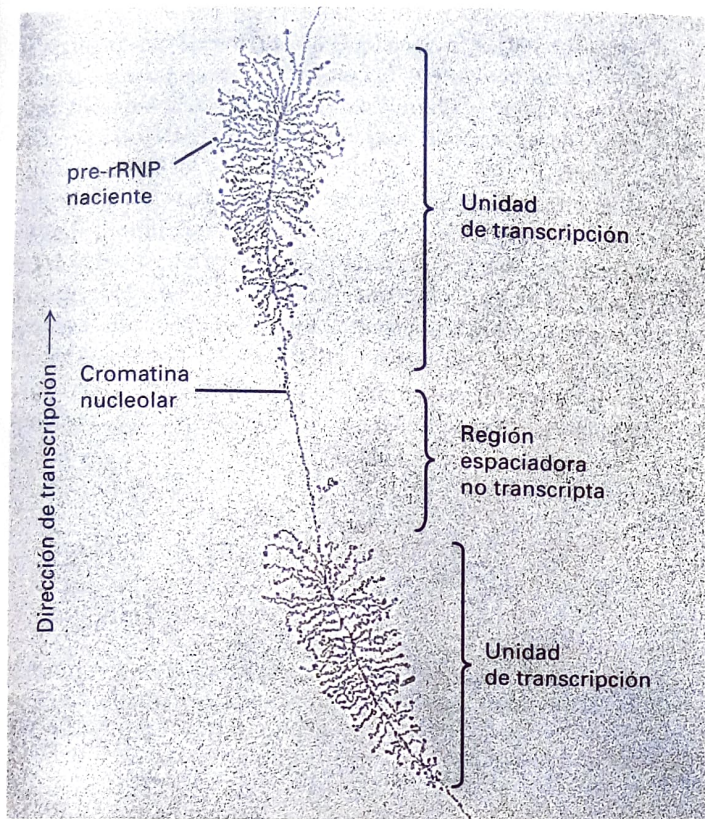


FIGURA EXPERIMENTAL 8-36 Microfotografía electrónica de las unidades de transcripción de pre-rRNA a partir del nucléolo de un ovocito de rana.

Cada "pluma" representa las múltiples moléculas de pre-rRNA asociadas con proteínas en un complejo pre-ribonucleoproteína (pre-rRNP) saliendo de una unidad de transcripción. Nótese la "protuberancia" densa en el extremo 5' de cada pre-rNP naciente que se cree es un proceosoma. Las unidades de transcripción de pre-rRNA están dispuestas en tándem, separadas por regiones espaciadoras de cromatina nucleolar no transcritas. (Cortesía de Y. Osheim y O. J. Miller, Jr.)

ribosomas citoplasmáticos. La secuenciación del DNA que codifica el pre-rRNA 45S de muchas especies demostró que este DNA comparte diversas propiedades en todos los eucariontes. Primero, los genes de pre-rRNA están organizados en disposiciones en tándem largas, separadas por regiones espaciadoras no transcritas que varían en longitud desde ~ 2 kb en las ranas, hasta ~ 30 kb en los seres humanos (Fig. 8-36). Segundo, las regiones genómicas correspondientes a los tres rRNA maduros siempre están dispuestas en el mismo orden 5' → 3': 18S, 5.8S, y 28S.

Tercero, en todas las células eucariontes (e incluso en las bacterias), el gen pre-rRNA codifica para regiones que son eliminadas durante el procesamiento y rápidamente son degradadas. Estas regiones probablemente contribuyen al plegamiento adecuado de los rRNA, pero no son necesarias una vez que se ha producido el plegamiento. La estructura general de los pre-rRNA se esquematiza en la Figura 8-37.

La síntesis y la mayoría del procesamiento del pre-rRNA se producen en el nucléolo. Cuando los genes de pre-rRNA se identificaron inicialmente en el nucléolo mediante hibridación *in situ*, no se sabía si requería cualquier otro DNA para formar el nucléolo. Los subsiguientes experimentos con cepas de *Drosophila* transgénicas demostraron que

una única unidad de transcripción de pre-rRNA completa induce la formación de un nucléolo pequeño. Por lo tanto, un único gen de pre-rRNA es suficiente para ser un *organizador nucleolar* y todos los componentes del ribosoma difunden hasta el pre-rRNA recién formado. La estructura del nucléolo observada por microscopía óptica y electrónica es el resultado del procesamiento del pre-rRNA y el ensamblaje de las subunidades ribosómicas.

Los RNA nucleolares pequeños asisten en el procesamiento de los pre-rRNA

El ensamblaje, la maduración y la exportación de las subunidades ribosómicas al citoplasma están mejor comprendidas en la levadura *S. cerevisiae*. Sin embargo, casi todas las proteínas y los RNA involucrados están altamente conservados en los eucariontes multicelulares, donde es probable que los aspectos fundamentales de la biosíntesis ribosómica sean los mismos. Al igual que para los pre-mRNA, los transcritos nacientes de pre-rRNA se unen inmediatamente a proteínas, formando partículas de ribonucleoproteína prerribosómicas (pre-rRNP). Por razones aún no comprendidas, la escisión del pre-rRNA no comienza hasta que la transcripción del pre-rRNA está casi completa. En las levaduras, se requiere aproximadamente seis minutos para transcribir un pre-rRNA. Una vez que se ha completado la transcripción se corta el rRNA y las bases y las ribosas son modificadas en alrededor de 10 segundos. En una célula de levadura de crecimiento rápido, ~ 40 pares de subunidades ribosómicas son sintetizadas, procesadas y transportadas hasta el citoplasma cada segundo. Esta velocidad extremadamente elevada de la síntesis ribosómica, a pesar del periodo aparentemente largo necesario para transcribir un pre-rRNA, es posible debido a que los genes de pre-rRNA están empaquetados con moléculas de RNA polimerasa I las cuales transcriben el mismo gen de manera simultánea (véase la Fig. 8-36) y debido a existen 100-200 de tales genes en el cromosoma XII, el organizador nucleolar de levadura.

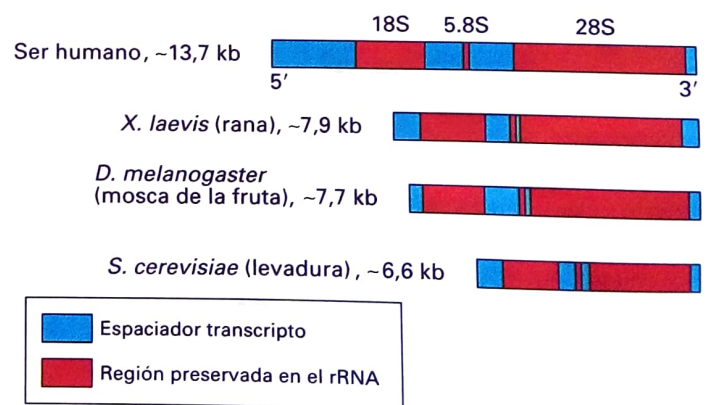


FIGURA 8-37 Estructura general de las unidades de transcripción de pre-rRNA. Las tres regiones codificadoras (rojo) codifican los rRNA 18S, 5.8S, y 28S que se encuentran en los ribosomas de los eucariontes superiores o sus equivalentes en otras especies. El orden de estas regiones codificadoras en el genoma siempre es 5' → 3'. Las variaciones en las longitudes de las regiones espaciadoras transcritas (azul) explican las principales diferencias en las longitudes de las unidades de transcripción de pre-rRNA en los diferentes organismos.

El transcrito primario de ~ 7 kb es cortado en una serie de pasos exonucleolíticos y de escisión que en última instancia producen los rRNA maduros que se encuentran en los ribosomas (Fig. 8-38). Durante el procesamiento, el pre-rRNA también es modificado de manera exhaustiva, mayormente por metilación del grupo 2'-hidroxilo de ribosas específicas y la conversión de residuos de uridina a pseudouridina. Estas modificaciones postranscripcionales del rRNA probablemente resultan importantes para la síntesis de proteína, debido a que están altamente conservadas. Virtualmente todas estas modificaciones se producen en la estructura central más conservada del ribosoma, la cual está directamente involucrada en la síntesis de proteína. Las posiciones de los sitios específicos de la 2'-O-metilación y la formación pseudouridina están determinadas por aproximadamente 150 especies de RNA restringidas al nucléolo, llamadas **RNA nucleolares** (snoRNA), que se hibridan de manera transitoria a las moléculas pre-rRNA. Al igual que los snRNA que funcionan en el procesamiento del pre-mRNA, los snoRNA se asocian con proteínas, formando partículas de ribonucleoproteína llamadas snoRNP. Una clase de más de 40 snoRNP (que contienen snoRNA cajas C + D) posicionan una enzima metiltransferasa cerca de los sitios de metilación en el pre-mRNA. Los múltiples snoRNA cajas C + D dirigen la metilación en múltiples sitios a través de un mecanismo similar. Ellos comparten secuencias comunes y características estructurales, y están unidos por un grupo de proteínas comunes. Una o dos regiones de cada uno de los snoRNA son precisamente complementarias a los sitios en el pre-rRNA y dirigen la metiltransferasa a ribosas específicas en la región híbrida (Fig. 8-39a). Una segunda clase principal de snoRNP (conteniendo snoRNA cajas H + ACA) posiciona la enzima

lares pequeños (snoRNA), que se hibridan de manera transitoria a las moléculas pre-rRNA. Al igual que los snRNA que funcionan en el procesamiento del pre-mRNA, los snoRNA se asocian con proteínas, formando partículas de ribonucleoproteína llamadas snoRNP. Una clase de más de 40 snoRNP (que contienen snoRNA cajas C + D) posicionan una enzima metiltransferasa cerca de los sitios de metilación en el pre-mRNA. Los múltiples snoRNA cajas C + D dirigen la metilación en múltiples sitios a través de un mecanismo similar. Ellos comparten secuencias comunes y características estructurales, y están unidos por un grupo de proteínas comunes. Una o dos regiones de cada uno de los snoRNA son precisamente complementarias a los sitios en el pre-rRNA y dirigen la metiltransferasa a ribosas específicas en la región híbrida (Fig. 8-39a). Una segunda clase principal de snoRNP (conteniendo snoRNA cajas H + ACA) posiciona la enzima

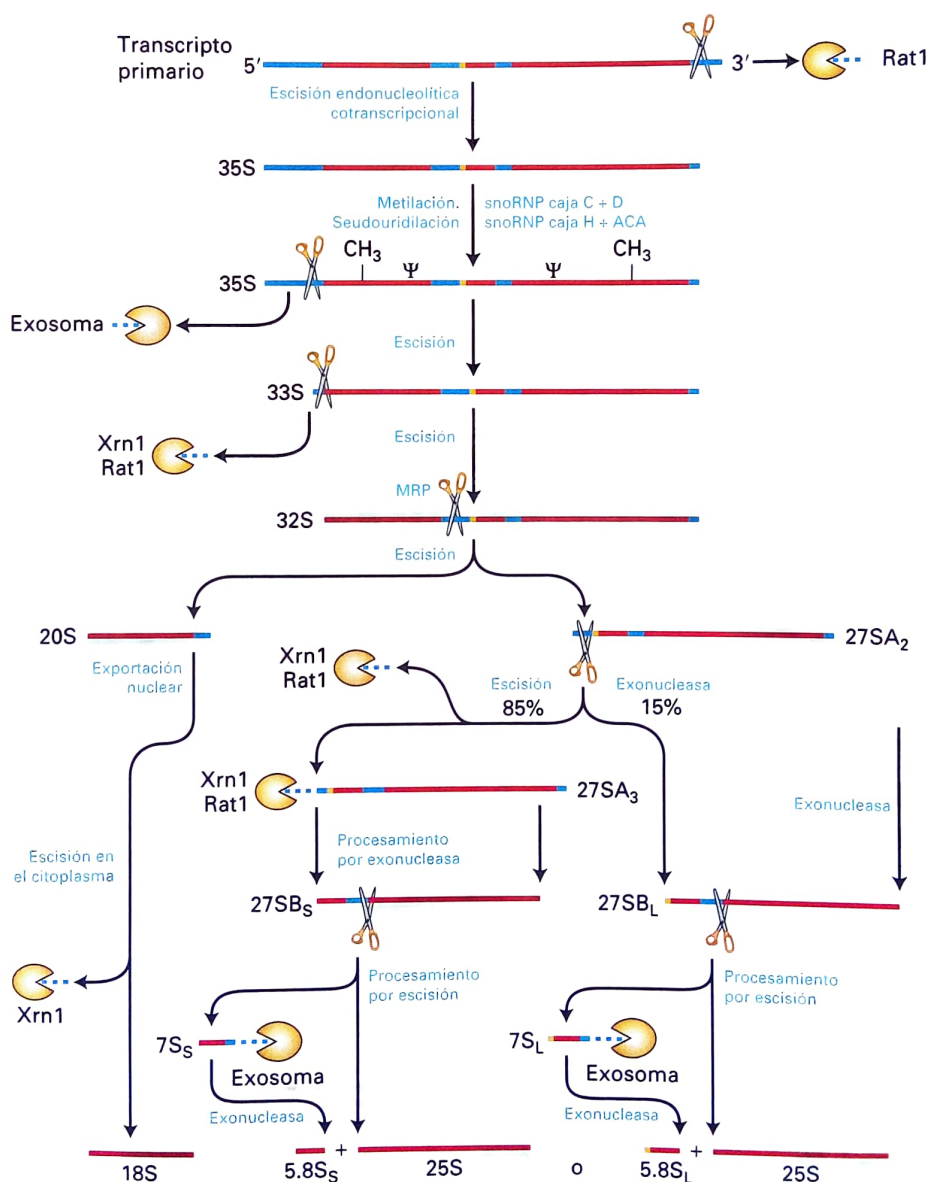


FIGURA 8-38 Procesamiento del rRNA. Las endorribonucleasas que realizan cortes internos se representan como tijeras. Las exorribonucleasas que digieren a partir de un extremo, ya sea 5' o 3', se muestran como un *pac-men*. La mayoría de la metilación (CH₃) 2'-O-ribosa y de la generación de pseudouridinas

en los rRNA se produce luego de la escisión inicial en el extremo 3', antes de la escisión inicial en el extremo 5'. Se indican las proteínas y las snoRNP conocidas que participan en estos pasos. (De J. Venema y D. Tollervay, 1999, *Ann. Rev. Genetics* 33:261)

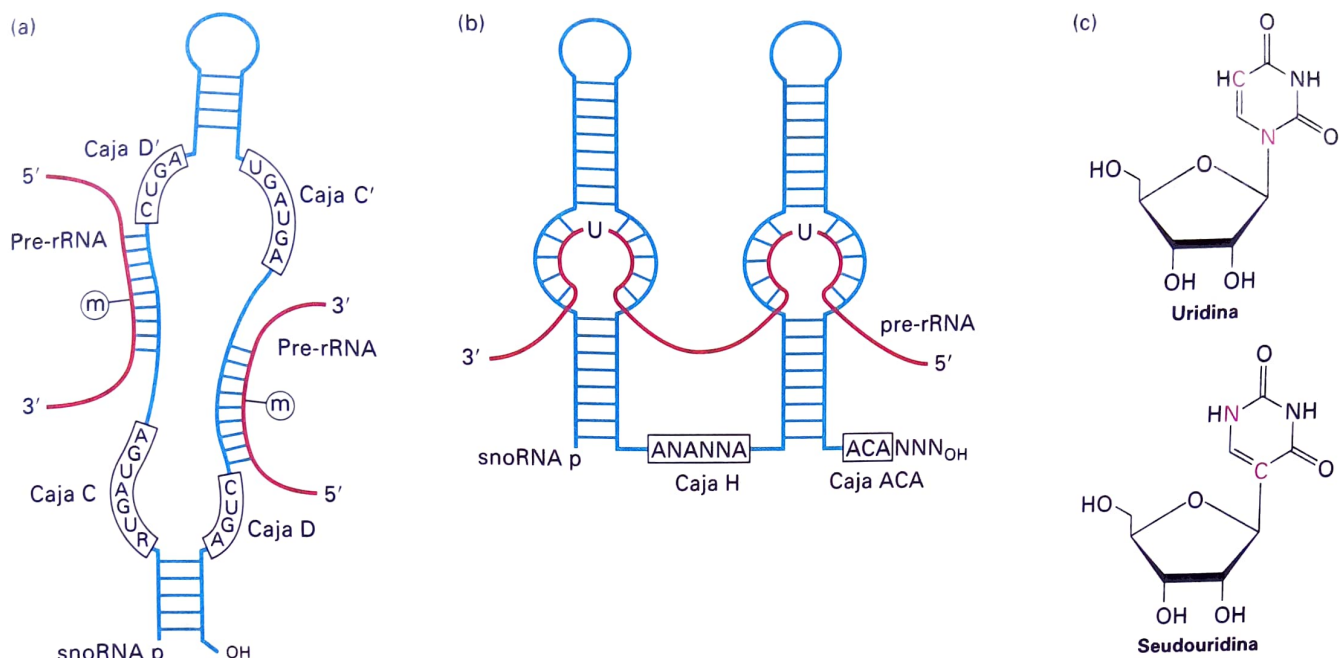


FIGURA 8-39 Modificación del pre-rRNA dirigida por snoRNP. (a) Un snoRNA llamado snoRNA caja C + D está involucrado en la 2'-O-metilación de ribosa. Las secuencias en este snoRNA se hibridan a dos regiones diferentes en el pre-rRNA, dirigiendo la metilación en los sitios indicados. (b) Los snoRNA caja H + ACA se pliegan en dos tallos lazo con protuberancia de hélice sencilla internas en

los tallos. El pre-rRNA se hibrida a las protuberancias de hélice sencilla, demarcando un sitio de pseudouridilación. (c) Conversión de uridina a pseudouridina dirigida por los snoRNA caja H + ACA de la parte (b) (Parte [a] de T. Kiss, 2001, *EMBO J.* **20**:3617. Parte [b] de U. T. Meier, 2005, *Chromosoma* **114**:1).

que convierte la uridina a pseudouridina (Fig. 8-39b). Esta conversión involucra la rotación del anillo de pirimidina (Figura 8-39c). Bases a cada lado de la uridina modificada en pre-rRNA forman un apareamiento de bases con bases en la protuberancia de un tallo en los snoRNA H + ACA, dejando que la uridina modificada sobresalga de la región doble hebra helicoidal, como el punto de ramificación A que sobresale en el corte y empalme espliceosómico del pre-mRNA (véase la Fig. 8-10). Otras modificaciones de los nucleótidos de pre-rRNA, como la desmetilación de adenina, son llevadas a cabo por proteínas sin la asistencia de los snoRNA guía.

El snoRNA U3 se ensambla en un snoRNP grande que contiene ~ 72 proteínas denominado subunidad pequeña (SSU) del proceosoma, el cual especifica el corte en el sitio A₀, el corte inicial cerca del extremo 5' del pre-rRNA (véase la Fig. 8-38). El snoRNA U3 forma apareamiento de bases con una región en la dirección 5' del pre-rRNA para especificar la localización del corte. Se cree que el proceosoma forma la "protuberancia 5'" visible en las microfotografías electrónicas de los pre-rRNA (véase la Fig. 8-36). El apareamiento de bases de otro snoRNP especifica reacciones de corte adicionales, que eliminan las regiones espaciadoras transcritas. El primer corte para iniciar el procesamiento de los rRNA 5.8S y 25S de la subunidad mayor es llevado a cabo por la RNasa MRP, un complejo de nueve proteínas con un RNA. Una vez cortado a partir de los pre-rRNA, estas secuencias son degradadas por las mismas exonucleasas 3' → 5' asociadas al exosoma, las cuales degradan los intrones procesados a partir de los pre-mRNA. Las exorribonucleasas 5' → 3' (Rat1; Xrn1) también eliminan algunas regiones del espaciador 5'.

Algunos snoRNA también son expresados a partir de sus propios promotores por la RNA polimerasa II o III. Sin embargo, de una ma-

nera notoria, la gran mayoría de los snoRNA son procesados a partir de los intrones eliminados por el proceso de corte y empalme de los genes que codifican los mRNA funcionales para proteínas involucradas en la síntesis de ribosomas o la traducción. Algunos snoRNA son procesados a partir de intrones procesados aparentemente a partir de los mRNA no funcionales. Los genes que codifican estos mRNA parecen existir únicamente para expresar los snoRNA a partir de los intrones escindidos.

A diferencia de los genes 18S, 5.8S, y 28S, los genes rRNA 5S son transcritos por la RNA polimerasa III en el nucleoplasma fuera del nucléolo. Con solo un procesamiento menor adicional a la eliminación de nucleótidos en el extremo 3', el rRNA 5S difunde hasta el nucléolo, donde se ensambla con el precursor del pre-rRNA y permanece asociado con la región que es cortada para dar el precursor de la subunidad ribosómica mayor.

La mayoría de las proteínas ribosómicas de la subunidad ribosómica menor de 40S se asocian con el pre-rRNA naciente durante la transcripción (Fig. 8-40). La escisión del pre-rRNA de longitud completa en el precursor RNP 90S libera una partícula pre-40S, que requiere solo unos pocos pasos de remodelación antes de que sea transportado al citoplasma. Una vez que la partícula pre-40S deja el nucléolo, atraviesa el nucleoplasma rápidamente y es exportado a través de los complejos del poro nuclear (NPC), como se analiza a continuación. La maduración final de la subunidad ribosómica menor se produce en el citoplasma: el procesamiento exonucleolítico del rRNA 20S en el rRNA 18S de la subunidad menor madura por la exorribonucleasas 5' → 3' Xrn1, y la dimetilación de dos adeninas adyacentes cerca del extremo 3' del rRNA 18S por parte de la enzima citoplasmática Dim1.

Al contrario que la partícula pre-40S, el precursor de la subunidad mayor requiere considerablemente más remodelación a través de mu-

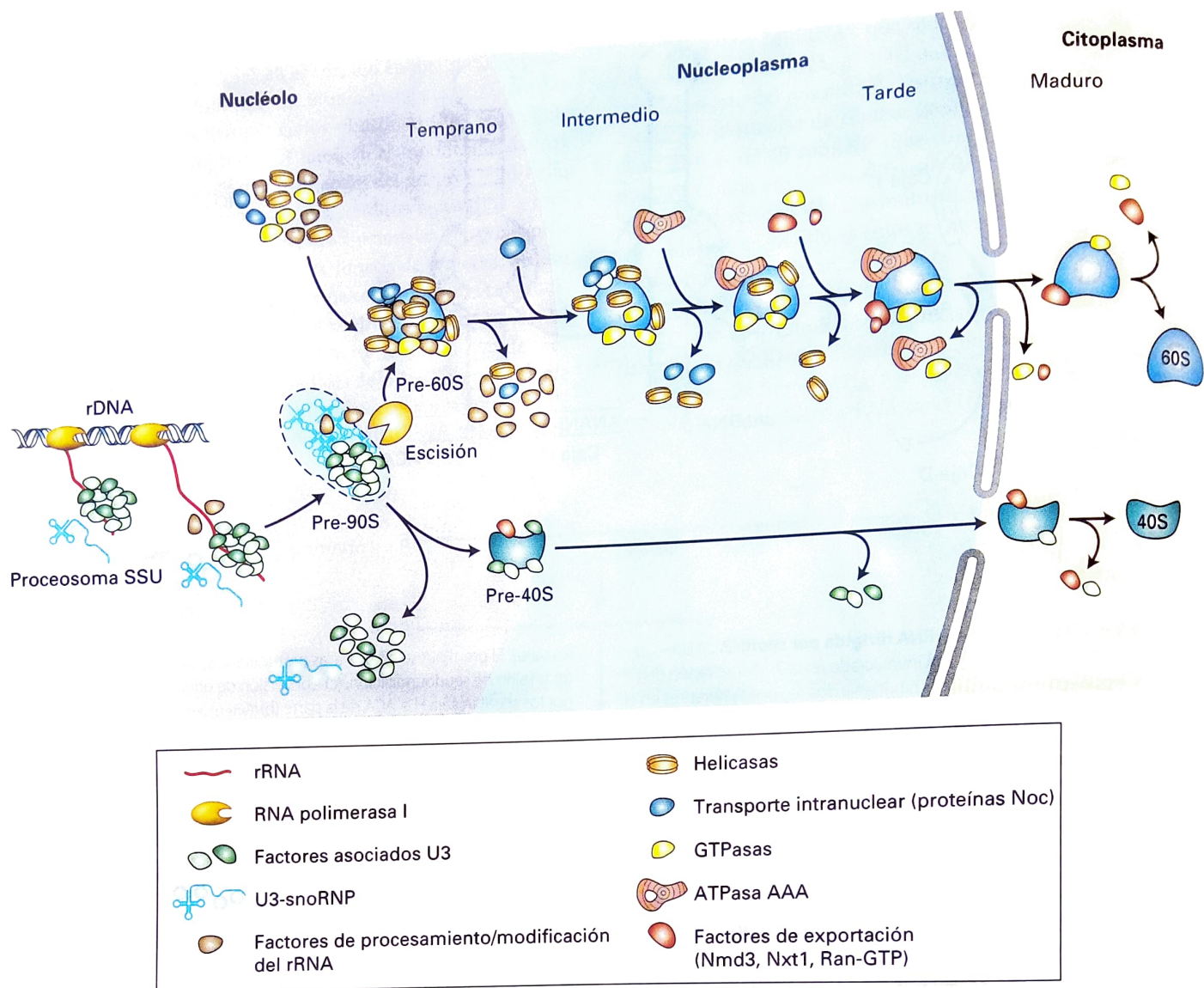


FIGURA 8-40 Ensamblaje de la subunidad ribosómica. Las proteínas ribosómicas y los RNA en las subunidades ribosómicas mayor y menor se representan en azul, con una forma similar a la de los iconos para las subunidades maduras en

el citoplasma. Otros factores que se asocian transitoriamente con las subunidades en maduración se representan en diferentes colores, como se muestra en el recuadro. (De H. Tschochner y E. Hurt, 2003, *Trends Cell Biol.* 13:255.)

chas más interacciones transitorias con las proteínas no ribosómicas, antes de que sea lo suficientemente maduro como para ser exportado al citoplasma. En consecuencia, se requiere un período considerablemente más prolongado para que la subunidad 60S en maduración salga del núcleo (30 minutos en comparación a los 5 minutos para la exportación de la subunidad 40S en células humanas cultivadas). Múltiples presuntas RNA helicasas y proteínas G pequeñas están asociadas con la maduración de las subunidades pre-60S. Algunas RNA helicasas son necesarias para desprender los snoRNP que forman un apareamiento de bases perfecto con el pre-rRNA hasta más de 30 pares de bases. Otras RNA helicasas pueden funcionar en la interrupción de interacciones proteína-RNA. El requerimiento para tantas GTPasas sugiere que existen muchos puntos de control de calidad en el ensamblaje y remodelación del RNP de la subunidad mayor, donde se debe completar un paso antes de que se active la GTPasa para permitir que se avance al siguiente paso. También se unen de manera transitoria miembros de la familia de **ATPasa AAA**. Esta clase de proteínas suelen estar involucradas en grandes movimientos moleculares

y pueden ser necesarias para el plegamiento del rRNA grande y complejo en la conformación apropiada. Algunos pasos en la maduración de la subunidad 60S se producen en el nucleoplasma, durante el paso desde el nucléolo a los complejos del poro nuclear (véase Fig. 8-40). Queda mucho por aprender acerca de este fascinante y complejo proceso de remodelación esencial que ocurre durante la formación de las subunidades ribosómicas.

La subunidad ribosómica mayor es una de las estructuras más grandes para pasar a través de los complejos del poro nuclear. La maduración de la subunidad mayor en el nucleoplasma lleva a la generación de sitios de unión para un adaptador de exportación nuclear llamado Nmd3. Nmd3 es unido por el transportador nuclear Exportina 1 (también llamado Crm1). Este es otro paso de control de la calidad, debido a que solo las subunidades ensambladas correctamente pueden unir Nmd3 y ser exportadas. La subunidad menor del exportador de mRNP (NXT1) también se asocia con la subunidad ribosómica mayor casi madura. Estos transportadores nucleares interactúan con los dominios FG de las nucleoporinas FG. Este mecanismo permite la pe-

netración de la "nube" molecular que llena la mayoría del canal central del NPC (véase la Fig. 8-20). Varias nucleoporinas específicas sin los dominios FG también son necesarias para la exportación de la subunidad ribosómica y pueden tener funciones adicionales. Estas dimensiones de las subunidades ribosómicas (~ 25-30 nm de diámetro) y el canal central del NPC son comparables, por lo tanto el pasaje puede no requerir la distorsión de cualquiera de las subunidades ribosómicas o del canal. La maduración final de la subunidad grande en el citoplasma incluye la eliminación de estos factores de exportación. Al igual que para la exportación de la mayoría de las macromoléculas desde el núcleo, incluyendo los tRNA y los pre-miRNA (pero no para la mayoría de los mRNP), la exportación de la subunidad ribosómica requiere la función de una proteína G pequeña llamada Ran, como se analiza en el Capítulo 13.

Los intrones del grupo I de autoprocésamiento fueron los primeros ejemplos del RNA catalítico

Durante la década de 1970, se descubrió que los genes pre-rRNA del protozoo *Tetrahymena thermophila* contenían un intrón. Búsquedas cuidadosas fallaron en descubrir incluso un gen pre-rRNA sin la secuencia extra, lo cual indica que el corte y empalme es necesario para producir

el rRNA maduro en estos organismos. En 1982, los estudios in vitro que mostraron que el pre-rRNA fue procesado en los sitios correctos en ausencia de cualquier proteína proporcionó el primer indicio de que ese RNA puede funcionar como un catalizador, al igual que las enzimas.

Luego se encontró toda una serie de secuencias de autoprocésamiento o autoeliminación en los pre-rRNA de otros organismos unicelulares, en los pre-rRNA de mitocondrias y cloroplastos, en diversos pre-mRNA a partir de ciertos bacteriófagos de *E. coli* y en algunos transcritos primarios de tRNA bacterianos. Las secuencias de autoprocésamiento en todos estos precursores, llamadas *intrones del grupo I*, usan guanosina como cofactor y pueden plegarse mediante apareamiento de bases internas para superponer estrechamente los dos exones que se deben unir. Como se describió antes, ciertos pre-mRNA de cloroplastos y mitocondrias y los tRNA contienen un segundo tipo de intrón de autoprocésamiento, designado grupo II.

Los mecanismos de corte y empalme usados por los intrones del grupo I, del grupo II y los espliceosomas, en general son similares e involucran dos reacciones de transesterificación, que no requieren suministro de energía (Fig. 8-41). Los estudios estructurales de los intrones del grupo I del pre-rRNA de *Tetrahymena* combinados con experimentos bioquímicos y mutacionales revelaron que el RNA se pliega en una estructura tridimensional precisa que, al igual que las enzimas proteicas, contienen surcos profundos que actúan en la catálisis. Los

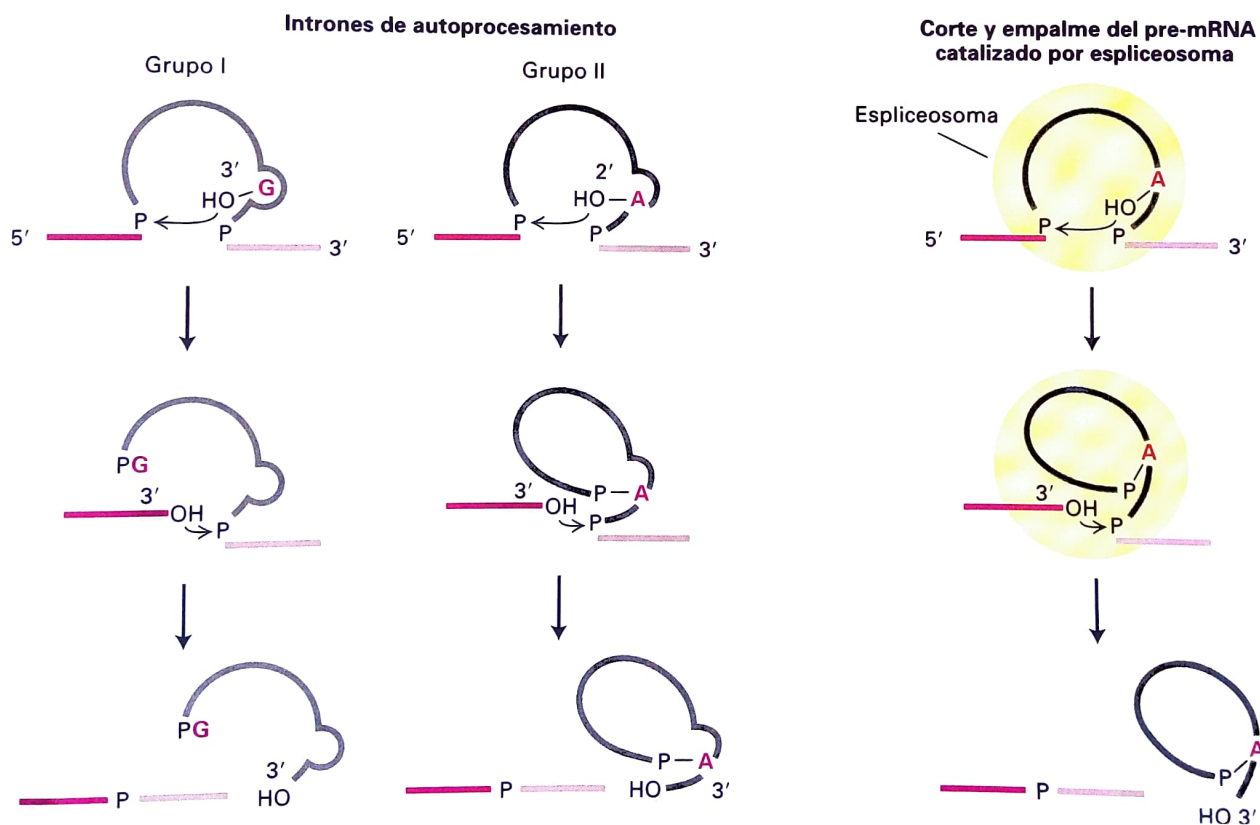


FIGURA 8-41 Mecanismos de corte y empalme de los intrones de autoprocésamiento grupo I y grupo II, y el proceso de corte y empalme del pre-mRNA catalizado por el espliceosoma. El intrón se muestra en gris, los exones a ser unidos en rojo. En los intrones del grupo I, un cofactor guanosina (G) que no es parte de la cadena de RNA se asocia con el sitio activo. El grupo 3' hidroxilo de esta guanosina participa en una reacción de transesterificación con el fosfato en el extremo 5' del intrón; esta reacción es análoga a la que involucra

los grupos 2'-hidroxilo en los sitios de ramificación A en los intrones del grupo II y los intrones del pre-mRNA procesados en los espliceosomas (véase la Figura 8-8). La posterior transesterificación que une a los exones 5' y 3' es similar en los tres mecanismos de corte y empalme. Nótese que los intrones del grupo I eliminados son estructuras lineales, a diferencia de los productos ramificados que se obtienen en los otros dos casos. (Adaptado de P. A. Sharp, 1987, *Science* 235:679.)

intrones del grupo I funcionan como una metaloenzima en orientar precisamente los átomos que participan en las dos reacciones de transesterificación adyacentes a los iones catalíticos de Mg^{2+} . En la actualidad, existe considerable evidencia que indica que el proceso de corte y empalme de los intrones del grupo II y los snRNA en el espliceosoma también involucra a los iones catalíticos de Mg^{2+} , unidos. Tanto en los intrones de autoprocesamiento del grupo I, del grupo II y probablemente en el espliceosoma, el RNA funciona como una **ribozima**, una secuencia de RNA con capacidad catalítica.

Los pre-tRNA sufren una modificación amplia en el núcleo

Los tRNA citosólicos maduros, que en promedio tienen 75-80 nucleótidos de longitud, son producidos a partir de precursores grandes (pre-tRNA) sintetizados por la RNA polimerasa III en el nucleoplasma. Los tRNA maduros también contienen numerosas bases modificadas que no están presentes en los transcritos primarios de tRNA. El corte y la modificación de base se produce durante el procesamiento de todos los pre-tRNA; algunos pre-tRNA también son cortados y empalmados durante el procesamiento. Todos estos acontecimientos de procesamiento y modificación se producen en el núcleo.

Una secuencia 5' de longitud variable que está ausente en los tRNA maduros está presente en todos los pre-tRNA (Fig. 8-42). Esto se produce debido a que el extremo 5' de los tRNA maduros es generado por un corte endonucleolítico especificado por la estructura tridimensional del tRNA mejor que en el lugar del sitio de inicio de la transcripción. Estos nucleótidos 5' extra son eliminados por la ribonucleasa P (RNasa

P), una endonucleasa ribonucleoproteica. Estudios con la RNasa P de *E. coli* indican que a elevadas concentraciones de Mg^{2+} , el componente RNA solo puede reconocer y cortar los pre-tRNA. El polipéptido RNasa P incrementa la velocidad de corte por el RNA, permitiéndole que proceda a concentraciones fisiológicas de Mg^{2+} . Una RNasa P comparable funciona en los eucariontes.

Alrededor del 10% de las bases en los pre-tRNA son modificadas enzimáticamente durante el procesamiento. Se producen tres clases de modificaciones de bases (Fig. 8-42): (1) residuos U en el extremo 3' del pre-tRNA son reemplazados con una secuencia CCA. La secuencia CCA se encuentra en el extremo 3' de todos los tRNA y es necesaria para que sean cargados por la aminoacil-tRNA sintetasa durante la síntesis de proteína. El paso en la síntesis de tRNA probablemente funciona como un punto de control de calidad, puesto que solo los tRNA adecuadamente plegados son reconocidos por la enzima de adición CCA. (2) Los grupos metil isopentenil son añadidos a los anillos heterocíclicos de bases púricas y los grupos 2'-OH en la ribosa de residuos específicos son metilados. (3) Uridinas específicas son convertidas a residuos de dihidrouridina, pseudouridina o ribotimidina. No se comprenden bien las funciones de estas modificaciones de ribosas y bases, pero puesto que están altamente conservados, probablemente tienen una influencia positiva en la síntesis proteica.

Como se muestra en la Figura 8-42, el pre-tRNA expresado a partir del gen tRNA de tirosina de levadura (tRNA^{Tyr}) contiene un intrón de 14 bases que no está presente en el tRNA^{Tyr} maduro. Algunos genes de tRNA eucariontes y algunos genes de tRNA de archaea también contienen intrones. Los intrones en los pre-tRNA nucleares son más cortos que aquellos en los pre-mRNA y carecen de las secuencias de consenso

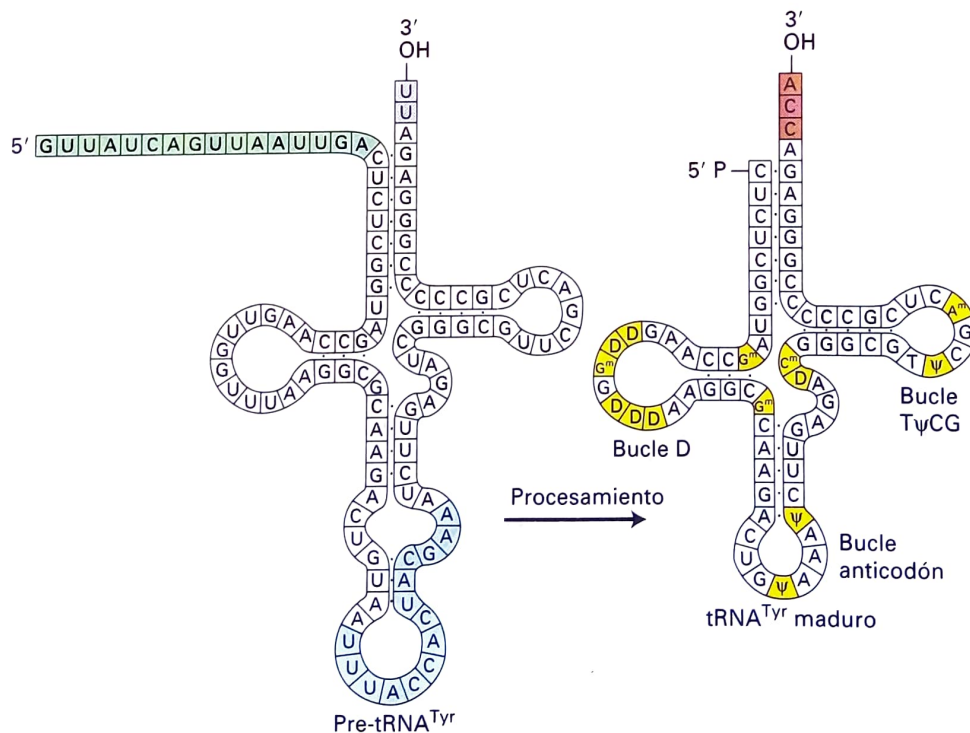


FIGURA 8-42 Cambios que se producen durante el procesamiento del pre-tRNA de tirosina. Un intrón de 14 nucleótidos (azul) en el anticodón es eliminado por corte y empalme. Una secuencia de 16 nucleótidos (verde) en el extremo 5' es escindida por la RNasa P. Residuos U en el extremo 3' son reemplazados por la secuencia CCA (rojo) encontrada en todos los tRNA maduros.

Numerosas bases en los tallos bucles son convertidas a bases modificadas características (amarillo). Nótese que no todos los pre-tRNA contienen intrones que son eliminados durante el procesamiento, pero todos sufren los otros tipos de cambios que se muestran aquí. D = dihidrouridina; ψ = pseudouridina.

del sitio de corte y empalme que se encuentran en los pre-mRNA (véase la Fig. 8-7). Los intrones pre-tRNA también se distinguen claramente de los intrones de autoprocesamiento mucho más largos del grupo I y del grupo II, que se encuentran en los pre-rRNA mitocondriales y de cloroplastos. El mecanismo de corte y empalme de los pre-tRNA difiere en tres aspectos fundamentales de los mecanismos utilizados por los intrones de autoprocesamiento y los espliceosomas (véase la Fig. 8-41). Primero, el corte y empalme de los pre-tRNA está catalizado por proteínas, no por los RNA. Segundo, un intrón pre-tRNA es cortado en un paso que comprende simultáneamente la escisión de ambos extremos del intrón. Finalmente, la hidrólisis de GTP y ATP es necesaria para unir los dos tRNA generados por el corte a ambos lados del intrón.

Después de que son procesados los pre-tRNA en el nucleoplasma, los tRNA maduros son transportados al citoplasma a través de los complejos del poro nuclear por la Exportina t, como se describió anteriormente. En el citoplasma, los tRNA son pasados entre las aminoacil-tRNA sintetasas, los factores de elongación y las ribosomas durante la síntesis de proteína (Cap. 4). Por lo tanto los tRNA en general están asociados con las proteínas y pasan poco tiempo libre en la célula, como también es el caso de los mRNA y los rRNA.

Los cuerpos nucleares son dominios nucleares funcionalmente especializados

La visualización de alta resolución del núcleo de una célula animal o vegetal, mediante microscopía electrónica y posterior tinción con anticuerpos marcados con fluorescencia, ha revelado dominios en el núcleo (además de territorios cromosómicos) y en el nucléolo. Estos dominios nucleares especializados, llamados **cuerpos nucleares**, no están rodeados por membranas pero son no obstante regiones de altas concentraciones de proteínas específicas y RNA que forman estructuras distintivas, apenas esféricas dentro de los núcleos. Los cuerpos nucleares más prominentes son los nucléolos, los sitios de síntesis y ensamblaje de la subunidad ribosómica analizados anteriormente. También se han descrito otros tipos diversos de cuerpos nucleares en los estudios estructurales.

Los experimentos con proteínas nucleares marcadas con fluorescencia han demostrado que el núcleo es un ambiente altamente dinámico, con rápida difusión de proteínas a través del nucleoplasma. Las proteínas asociadas con los cuerpos nucleares también suelen observarse a bajas concentraciones en el nucleoplasma por fuera de los cuerpos nucleares y los estudios con fluorescencia indican que ellos difunden hacia dentro y fuera de los cuerpos nucleares. Sobre la base de estas mediciones de la movilidad molecular en las células vivas, los cuerpos nucleares pueden ser modelados matemáticamente como el estado estacionario esperado para las proteínas en difusión, que interactúan con suficiente afinidad para formar regiones autoorganizadas de altas concentraciones de proteínas específicas, con suficiente baja afinidad entre sí como para ser capaces de difundirse dentro y fuera de la estructura. En las microfotografías electrónicas estas estructuras parecen ser una red esponjosa, heterogénea, de componentes que interactúan. Aquí se analizan unos pocos ejemplos de los cuerpos nucleares.

Cuerpos de Cajal Los cuerpos de Cajal son estructuras esféricas de ~0,2-1 μm que se han observado en el núcleo por más de un siglo (Fig. 8-43). La investigación actual indica que al igual que el nucléolo, los cuerpos de Cajal son centros de ensamblaje de complejos RNP para

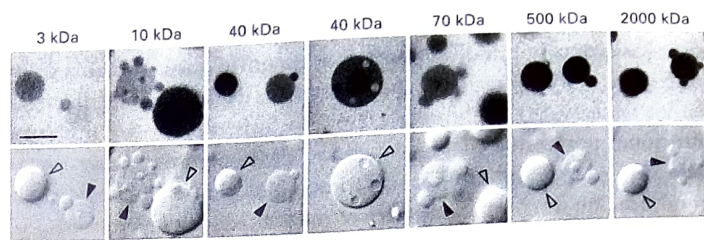


FIGURA 8-43 Los cuerpos nucleares son diferencialmente permeables a las moléculas en el centro del nucleoplasma. Cada par de panel muestra una zona única del núcleo de ovocito de *Xenopus* vivo, que fue previamente inyectado con dextrano fluorescente de la masa molecular indicada (3-2 000 kDa). Cada sección del panel superior es una imagen confocal en la cual la intensidad de fluorescencia es una medida de la concentración de dextrano (p. ej., las zonas oscuras muestran regiones donde se ha excluido el dextrano). Cada sección del panel inferior es una imagen de contraste por interferencia diferencial del mismo campo. Las puntas de flecha abiertas indican los nucléolos, las puntas de flechas rellenas muestran los cuerpos de Cajal (CB) con las motas nucleares adheridas más grandes en los ovocitos de *Xenopus* que en la mayoría de las células somáticas. Los dextranos de bajo peso molecular (p. ej., 3 kDa) penetran casi por completo los CB, pero son más excluidos de las motas nucleares y los nucléolos. La exclusión del dextrano aumenta con la masa molecular. Barra = 10 μm . (De K. E. Handwerger y cols., 2005, *Mol. Biol. Cell* 16:202.)

los snRNP de espliceosomas y otros RNP. Al igual que los rRNA, los snRNA sufren modificaciones específicas, tales como la conversión de residuos de uridina específicos a pseudouridina y la adición de grupos metilos a los grupos 2'-hidroxilo de ribosas específicas. Estas modificaciones postranscripcionales son importantes para el ensamblaje y la función adecuada de los snRNP en el corte y empalme del pre-mRNA. Dichas transformaciones se producen en los cuerpos de Cajal, donde son dirigidas por una clase de moléculas de RNA guía como las snoRNA, que se denominan *scaRNA* (RNA pequeños asociados a cuerpo de Cajal). También existe evidencia de que el cuerpo de Cajal es el sitio del ensamblaje de los complejos tri-snRNP U4/U6/U5, necesarios para el procesamiento del pre-mRNA a partir de los snRNP libres U4, U5, y U6 liberados durante la eliminación de cada intrón (véase la Fig. 8-11). Puesto que los cuerpos de Cajal también contienen una elevada concentración del snRNP U7 involucrado en el procesamiento del extremo 3' de los principales mRNA de histona, es probable que este proceso también se produzca en los cuerpos de Cajal, al igual que el ensamblaje de los RNP de telomerasa.

Manchas nucleares Las manchas o motas nucleares se observaron usando anticuerpos marcados con fluorescencia contra proteínas snRNP y otras proteínas involucradas en el procesamiento de corte y empalme del pre-mRNA, aproximadamente como 20-50 estructuras amorfas irregulares de 0,5-2 μm de diámetro, que están distribuidas a través de todo el nucleoplasma de las células de los vertebrados. Puesto que las manchas no se localizan en sitios de procesamiento del pre-mRNA co-transcripcional, se piensa que son regiones de almacenamiento para las snRNP y proteínas involucradas en el procesamiento del pre-mRNA, que son liberadas al nucleoplasma cuando son necesarias.

Cuerpos nucleares de la leucemia promielocítica (PML) El gen PML se descubrió originalmente cuando se observaron las translocaciones cromosómicas dentro del gen en las células leucémicas de pacientes con la rara enfermedad de la leucemia promielocítica (PML). Cuando

se utilizaron anticuerpos específicos para la proteína PML en estudios de microscopía inmunofluorescente, se encontró que la proteína se localizaba en ~ 10-30 regiones apenas esféricas de 0,3-1 μm de diámetro en los núcleos de las células de mamífero. Se han propuesto múltiples funciones para estos cuerpos nucleares PML, pero un consenso que está surgiendo es que funcionan como sitios para el ensamblaje y la modificación de complejos proteicos involucrados en la reparación del DNA y la inducción de apoptosis. Por ejemplo, la proteína supresora de tumores p53 parece ser modificada postraduccionalmente por fosforilación y acetilación en los cuerpos nucleares PML en respuesta al daño del DNA, incrementando su capacidad para activar la expresión de genes de respuesta al daño celular. Los cuerpos nucleares PML también son necesarios para las defensas celulares contra los virus de DNA que son inducidos por interferones, proteínas secretadas por las células infectadas con virus y por linfocitos T involucrados en la respuesta inmunitaria (véase el Cap. 23).

Los cuerpos nucleares PML también son sitios de modificaciones postraduccionales a través de la adición de una pequeña proteína similar a la ubiquitina llamada SUMO1 (de sus siglas en inglés *small ubiquitin-like moiety-1*), que puede controlar la actividad y la localización subcelular de la proteína modificada. Muchos activadores transcripcionales son inhibidos cuando se les añade la proteína SUMO1 y la mutación de sus sitios de adición incrementa la actividad en la estimulación de la transcripción. Estas observaciones indican que los cuerpos nucleares PML están involucrados en un mecanismo de represión de la transcripción que aún no se ha estudiado y entendido en profundidad.

Función nucleolar además de la síntesis de la subunidad ribosómica Los primeros cuerpos nucleares observados, los nucléolos, pueden tener regiones especializadas de subestructura que se dedican a otras funciones distintas a la biogénesis del ribosoma. Existe evidencia de que los complejos ribonucleoproteicos SRP inmaduros involucrados en la secreción proteica y en la inserción de la membrana del RE (Cap. 13), son ensamblados en los nucléolos y luego exportados hacia el citoplasma, donde se producen sus maduraciones finales. La proteína fosfatasa Cdc14 que regula los procesos en las etapas finales de la mitosis está secuestrada en los nucléolos en las células de levadura en gemación (Cap. 19). Asimismo, una proteína supresora de tumores llamada ARF, la cual está involucrada en la regulación de la proteína codificada por el gen mutado con mayor frecuencia en los cánceres humanos (p53), está secuestrada en los nucléolos y es liberada en respuesta al daño del DNA (Cap. 24). Además, la heterocromatina suele formarse en la superficie de los nucléolos (Fig. 6-33), lo cual sugiere que las proteínas asociadas con los nucléolos también participan en la formación de esta estructura de cromatina en represión.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 8.5

Procesamiento del rRNA y tRNA

- Un precursor grande de pre-rRNA (13,7 kb en los seres humanos) sintetizado por la RNA polimerasa I sufre escisión, digestión exonucleolítica y modificaciones de bases para dar los rRNA 28S, 18S, y 5.8S, que se asocian con las proteínas ribosómicas a fin de formar las subunidades ribosómicas.

- La síntesis y el procesamiento del pre-rRNA se producen en el nucléolo. El componente rRNA 5S de la subunidad ribosómica mayor es sintetizado en el nucleoplasma por la RNA polimerasa III.

- Aproximadamente 150 snoRNA, asociados con proteínas en las snoRNP, forman apareamientos de bases con sitios específicos en el pre-rRNA donde dirigen la metilación de ribosas, la modificación de uridina a pseudouridina y la escisión en sitios específicos durante el procesamiento del rRNA en el nucleolo.

- Los intrones de autoprocesamiento de los grupos I y II y probablemente los snRNA en los espliceosomas funcionan todos como ribozimas o secuencias de RNA catalíticamente activas, que llevan a cabo el procesamiento de manera análoga a las reacciones de transesterificación, requiriendo la unión de iones Mg^{2+} (véase la Fig. 8-41).

- Los pre-tRNA sintetizados por la RNA polimerasa III en el nucleoplasma son procesados para eliminar la secuencia del extremo 5', además del CCA en el extremo 3' y la modificación de múltiples bases internas (véase la Fig. 8-42).

- Algunos pre-tRNA contienen un intrón corto que es eliminado mediante un mecanismo catalizado por una proteína diferente del procesamiento de corte y empalme del pre-mRNA, así como de los intrones de autoprocesamiento.

- Todas las especies de moléculas de RNA se asocian con proteínas en varios tipos de partículas de ribonucleoproteína, ambas en el núcleo y después de la exportación al citoplasma.

- Los cuerpos nucleares son regiones funcionalmente especializadas en el núcleo donde interactúan con proteínas para formar estructuras autoorganizadas. Muchas de estas, al igual que los nucléolos, son regiones de ensamblaje de los complejos RNP.

Perspectivas para el futuro

En este capítulo y en el anterior, hemos visto que en las células eucariotas los mRNA son sintetizados y procesados en el núcleo, transportados a través de los complejos del poro nuclear al citoplasma y luego, en algunos casos, transportados a zonas específicas del citoplasma antes de ser traducidos por los ribosomas. Cada uno de estos procesos fundamentales es llevado a cabo por maquinarias macromoleculares complejas compuestas de decenas de proteínas y en muchos casos también de RNA. La complejidad de estas maquinarias macromoleculares asegura la precisión en encontrar los promotores y los sitios de corte y empalme en la longitud extensa del DNA y las secuencias de RNA, además de proporcionar varios caminos para la regulación de la síntesis de una cadena polipeptídica. Queda mucho por aprender acerca de la estructura, funcionamiento y regulación de tales maquinarias complejas como los espliceosomas y el aparato de corte/poliadenilación.

Ejemplos recientes de la regulación del corte y empalme del pre-mRNA plantean la cuestión de cómo las señales extracelulares podrían controlar tales acontecimientos, en especial en el sistema nervioso de los vertebrados. Un caso a destacar es la notable situación en el oído interno de las aves, donde múltiples isoformas del canal de K^+ activado

por Ca^{2+} llamado *Slo* son producidas por corte y empalme alternativo del RNA. Las interacciones célula-célula parecen informar a las células de sus posiciones en la cóclea, llevando a un procesamiento alternativo del pre-mRNA *Slo*. El reto que enfrentan los investigadores es descubrir cómo tales interacciones célula-célula regulan la actividad de los factores de procesamiento del RNA.

El mecanismo de transporte del mRNP a través de los complejos del poro nuclear posee muchas preguntas intrigantes. La investigación futura probablemente revelará actividades adicionales de las proteínas mRNP nuclear y hnRNP, y clarificará sus mecanismos de acción. Por ejemplo, existe una pequeña familia de genes que codifican proteínas homólogas a la subunidad grande del exportador de mRNA. ¿Cuáles son las funciones de estas proteínas relacionadas? ¿Participan ellas en el transporte de grupos superpuestos de mRNP? Algunas proteínas hnRNP contienen señales de retención nuclear, que evitan la exportación nuclear cuando están fusionadas a las proteínas hnRNP con señales de exportación nuclear (NES). ¿De qué forma son selectivamente eliminadas estas proteínas hnRNP a partir de los mRNA procesados en el núcleo, permitiendo que los mRNA sean transportados al citoplasma?

La localización de ciertos mRNA en sitios subcelulares específicos es fundamental para el desarrollo de los organismos multicelulares. Como se describe en el **Capítulo 21**, durante el desarrollo una célula individual se divide con frecuencia para dar células hijas que funcionan de manera diferente unas respecto de otras. En el lenguaje de la biología del desarrollo, se dice que las dos células hijas tienen destinos del desarrollo diferentes. En muchos casos, esta diferencia en sus destinos da como resultado la localización de un mRNA en una región de la célula antes de la mitosis, de manera tal que después de la división esté presente en una célula hija y no en la otra. Queda mucho trabajo interesante por realizar para comprender por completo los mecanismos moleculares que controlan la localización de los mRNA, los cuales son cruciales para el desarrollo normal de los organismos multicelulares.

Algunos de los descubrimientos más sorprendentes e inesperados en la biología celular y molecular en los últimos años conciernen a la existencia y función de los miRNA y el proceso de la interferencia por RNA. La interferencia de RNA (RNAi) proporciona a los biólogos moleculares y celulares un poderoso método para el estudio de la función génica. El descubrimiento de ~ 500 miRNA en los seres humanos y otros organismos sugiere que múltiples ejemplos significativos de control de la traducción por este mecanismo esperan ser caracterizados. Estudios recientes en *S. pombe* y plantas conectan RNA cortos nucleares similares con el control de la metilación del DNA y la formación de la heterocromatina. ¿Procesos similares controlarán la expresión génica a través del ensamblado de la heterocromatina en los seres humanos y otros animales? ¿Qué otros procesos reguladores podrían ser dirigidos por otras clases de pequeños RNA? Debido a que el control mediante estos mecanismos depende del apareamiento de bases entre los miRNA y los mRNA o genes diana, los métodos de genómica y de bioinformática probablemente sugerirán genes que puedan ser controlados por dichos mecanismos. ¿Qué otros procesos además del control de la traducción, la degradación del mRNA y el ensamblado de la heterocromatina podrían ser controlados por los miRNA?

Estas y otras preguntas fascinantes respecto al procesamiento, al control postranscripcional y al transporte nuclear del RNA, podrán a prueba a los biólogos celulares y moleculares en las próximas décadas. Los descubrimientos asombrosos de mecanismos completamente inesperados del control génico por parte de los miRNA nos recuerdan que es probable que en el futuro nos esperen muchas más sorpresas.

Palabras clave

caperuza 5' 349	cola de poli(A) 358
corte y empalme alternativo 361	pre-mRNA 349
complejo de	pre-rRNA 385
corte/poliadenilación 358	ribozima 390
complejo de reconocimiento	edición del RNA 364
a través del exón 356	complejo silenciador
dicer 371	inducido por RNA (RISC) 371
drosha 371	interferencia de
exosoma 359	RNA (RNAi) 373
nucleoporinas FG 365	corte y empalme de RNA 348
intrones del grupo I 357	RNA de interferencia
intrones del grupo II 357	pequeño o inhibidor
proteínas de unión al elemento de	pequeño (siRNA) 346
respuesta al hierro (IRE-BP) 379	silenciamiento génico
micro-RNA (miRNA) 370	por siRNA 374
vigilancia del mRNA 380	RNA nucleares pequeños
exportador de mRNP 365	(snoRNA) 386
complejo del	espliceosoma 353
poro nuclear (NPC) 365	proteínas SR 356

Revisión de conceptos

1. Describa tres tipos de regulación postraducciona de los genes que codifican proteína.
2. ¿Verdadero o falso? El CTD es responsable de los pasos de procesamiento del mRNA que son específicos para este y no para otras formas de RNA. Explique por qué elige verdadero o falso.
3. Existe una cantidad de secuencias conservadas que se encuentran en un mRNA, las cuales dictaminan dónde se produce el corte y empalme. ¿Dónde se encuentran dichas secuencias en relación a las uniones exón/intrón? ¿Cuál es el significado de estas secuencias en el proceso de corte y empalme? Una de estas importantes regiones es el punto de ramificación A que se encuentra en el intrón. ¿Cuál es la función del punto de ramificación A en el proceso de corte y empalme, y se puede lograr esto con el grupo OH ya sea en el carbono 2' o 3'?
4. ¿Cuál es la diferencia entre los hnRNA, snRNA, miRNA, siRNA, y snoRNA?
5. ¿Cuáles son las similitudes mecánicas entre los intrones de auto-procesamiento del grupo II y el corte y empalme espliceosómico? ¿Cuál es la evidencia de que puede existir una relación evolutiva entre los dos?
6. Usted obtiene la secuencia de un gen que contiene 10 exones, 9 intrones y una secuencia de consenso de poliadenilación que contiene 3' UTR. El quinto intrón también contiene un sitio de poliadenilación. Para evaluar si ambos sitios de poliadenilación son usados, usted aísla mRNA y encuentra un transcrito más largo a partir de tejido muscular y un transcrito más corto a partir de todos los otros tejidos. Especule acerca del mecanismo involucrado en la producción de estos diferentes transcritos.
7. La edición del RNA es un proceso común que se produce en la mitocondria de tripanosomas y plantas, en los cloroplastos y en raros casos

en los eucariontes superiores. ¿Qué es la edición del RNA y qué beneficios demuestra en el ejemplo documentado de apoB en los seres humanos?

8. Como el DNA se encuentra en el núcleo, la transcripción es un proceso nuclear. Los ribosomas responsables de la síntesis proteica se encuentran en el citoplasma. ¿Por qué el tráfico de hnRNP hacia el citoplasma está restringido a los complejos del poro nuclear? ¿De qué forma las repeticiones FG de los complejos del poro nuclear actúan como una barrera de especificidad en el transporte nuclear?

9. Un complejo de proteína en el núcleo es el responsable del transporte de moléculas de mRNA al citoplasma. Describa las proteínas que forman este exportador. ¿Qué dos grupos de proteínas es probable que estén detrás del mecanismo involucrado en el movimiento direccional del mRNP y el exportador al citosol?

10. El silenciamiento por RNA se ha convertido en una herramienta poderosa en el arsenal de métodos para regular en forma negativa la expresión génica. Describa brevemente cómo se puede inactivar la expresión génica. ¿Qué efectos tendría la introducción de los siRNA en TSC1 en las células humanas?

11. Especule acerca de por qué las plantas deficientes en actividad Dicer evidencian sensibilidad aumentada a la infección por virus de RNA.

12. La estabilidad del mRNA es un regulador clave de las concentraciones de proteínas en una célula. Describa brevemente las tres vías de degradación de los mRNA. Una célula de levadura tiene una mutación en el gen DCP1, dando como resultado una actividad de eliminación de la caperuza disminuida. ¿Qué cambio esperaría ver en los cuerpos P encontrados en esta célula mutante?

13. En la actualidad, la localización del mRNA parece ser un fenómeno común. ¿Qué beneficios tiene para una célula la localización del mRNA? ¿Cuál es la evidencia de que algunos mRNA son dirigidos para acumularse en localizaciones subcelulares específicas?

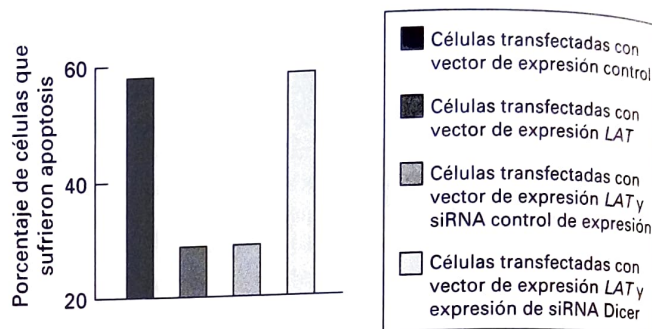
Análisis de los datos

La mayoría de los seres humanos son infectados con el virus 1 simple del herpes (HSV-1), el agente causante del herpes labial. El genoma del HSV-1 comprende 100 genes, la mayoría de los cuales son expresados en las células huésped infectadas en el sitio de los herpes labiales. El proceso infeccioso involucra la replicación del DNA viral, la transcripción y traducción de los genes virales, el ensamblado de las nuevas partículas virales y la muerte de la célula huésped a medida que la progenie viral es liberada. A diferencia de la mayoría de los otros tipos de virus, el herpesvirus también tiene una fase latente, en la cual el virus permanece escondido en las neuronas. Estas neuronas infectadas, latentes, son las fuentes de infecciones activas, que causan los herpes labiales cuando se supera la latencia.

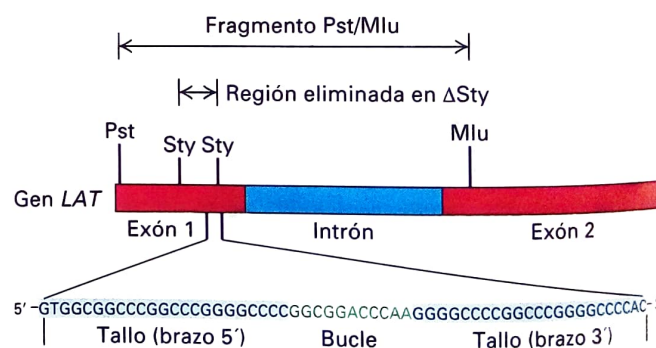
Es interesante destacar que solo un transcrito viral es expresado durante la latencia. Este transcrito, *LAT* (transcrito asociado a la latencia), no codifica una proteína y las neuronas infectadas con el HSV-1 mutante que carecen del gen *LAT* sufren muerte celular por apoptosis a una tasa del doble de las células infectadas con el HSV-1 de tipo silvestre. Para determinar si *LAT* funciona bloqueando la apoptosis al codificar un miRNA, se realizaron los siguientes estudios (véase Gupta y cols., 2006, *Nature* 442:82-85).

a. Se transfectó (un proceso en el cual se inserta DNA extraño en una célula) a una línea celular, con un vector de expresión que expresa

un fragmento Pst-Mlu del gen *LAT* (véase el diagrama en la parte b). El porcentaje de estas células transfectadas que luego sufrieron muerte celular inducida por fármaco se comparó con células control. El experimento se repitió en células en las cuales la expresión de Dicer se inactivó mediante el uso de siRNA Dicer. La información obtenida se muestra en los gráficos a continuación. ¿Qué conclusiones puede extraer de estos datos? ¿Por qué los científicos que llevaron a cabo estos estudios examinaron los efectos del silenciamiento de Dicer?

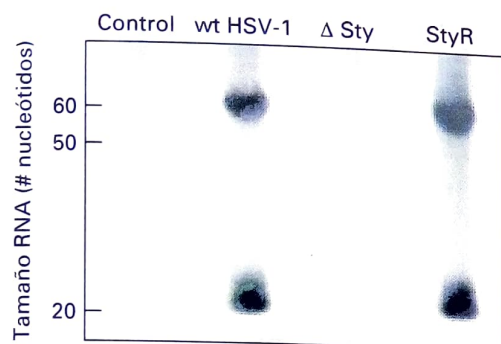


b. Las células se transfectaron con un vector de expresión que expresa el fragmento Pst-Mlu del gen *LAT*, a partir del cual se eliminó la región entre los dos sitios de restricción Sty (DSty; diagrama inferior). Cuando estas células fueron inducidas a sufrir apoptosis, murieron a la misma velocidad que lo hicieron las células no transfectadas. En estudios adicionales, las células se transfectaron con un vector de expresión que expresaba la región Sty-Sty del gen *LAT*. Estas células exhibieron la misma resistencia a la apoptosis que las células transfectadas con el fragmento Pst-Mlu. ¿Qué se puede deducir de estos hallazgos acerca de la región del gen *LAT* necesaria para proteger a las células de la apoptosis?

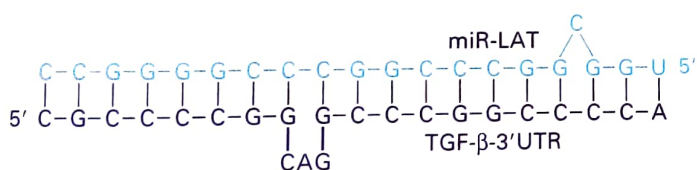


c. Se prevé que el RNA codificado dentro de la región Sty-Sty forma un tallo bucle (véase el diagrama en la parte b). El análisis de transferencia Northern se realizó en el RNA total celular aislado a partir de las células control (simulacro), células infectadas con HSV-1 de tipo silvestre, células infectadas con un mutante por delección del HSV-1 a partir del cual se eliminó la secuencia entre los dos sitios Sty en el gen *LAT* (DSty) y células infectadas con un virus DSty rescatado en el cual se reinsertó la región eliminada dentro del genoma viral (StyR). La sonda usada para la transferencia Northern fue la región tallo 3' marcada del RNA *LAT* en la región Sty-Sty, como se esquematiza en la parte (b). Los

RNA reconocidos por esta sonda fueron de ~ 55 nucleótidos o 20 nucleótidos, como se muestra en la transferencia Northern de abajo. ¿Por qué se detectaron dos RNA de diferentes tamaños? Cuando se utilizó una segunda sonda que era la región del tallo 5' marcada de la secuencia RNA mostrada en la parte (b), solo se detectó la región de RNA de ~ 55 nucleótidos. ¿Qué se puede deducir acerca del procesamiento del RNA expresado a partir del gen *LAT*? ¿Qué enzima es probable que produzca el RNA ~ 55 nucleótidos? ¿En qué parte de la célula? ¿Qué enzima es probable que produzca el RNA de 20 nucleótidos? ¿En qué parte de la célula?



d. El mRNA TGF- β codifica una proteína, el factor de transformación β , que inhibe el crecimiento celular e induce la apoptosis. La región 3' no traducida (3' UTR) del mRNA TGF- β puede formar un dúplex imperfecto con el miRNA codificado por la región tallo 5' del dominio Sty-Sty *LAT* (miR-LAT), como se muestra a continuación. ¿En qué forma podrían diferir los niveles de expresión de TGF- β en las células infectadas con el HSV-1 de tipo silvestre, en comparación con las células no infectadas? ¿Qué podría usted inferir acerca de las infecciones latentes de HSV-1 a partir de estos estudios?



Referencias

Procesamiento del pre-mRNA eucarionte

Bergkessel, M., G. M. Wilmes, and C. Guthrie. 2009. SnapShot: formation of mRNPs. *Cell* 136:794.

Blanc, V., and N. O. Davidson. 2010. APOBEC-1-mediated RNA editing. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 2:594-602.

de Almeida, S. F., and M. Carmo-Fonseca. 2008. The CTD role in cotranscriptional RNA processing and surveillance. *FEBS Lett.* 582:1971-1976.

Gu, M., and C. D. Lima. 2005. Processing the message: structural insights into capping and decapping mRNA. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15:99-106.

Hocine, S., R. H. Singer, and D. Grünwald. 2010. RNA processing and export. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2(12):a000752.

Houseley, J., and D. Tollervey. 2009. The many pathways of RNA degradation. *Cell* 136:763-776.

Lambowitz, A. M., and S. Zimmerly. 2004. Mobile group II introns. *Annu. Rev. Genet.* 38:1-35.

Moore, M. J., and N. J. Proudfoot. 2009. Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation. *Cell* 136:688-700.

Pawlicki, J. M., and J. A. Steitz. 2010. Nuclear networking fashions pre-messenger RNA and primary microRNA transcripts for function. *Trends Cell Biol.* 20:52-61.

Perales, R., and D. Bentley. 2009. "Cotranscriptionality": the transcription elongation complex as a nexus for nuclear transactions. *Mol. Cell.* 36:178-191.

Pyle, A. M. 2010. The tertiary structure of group II introns: implications for biological function and evolution. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 45:215-232.

Sharp, P. A. 2005. The discovery of split genes and RNA splicing. *Trends Biochem. Sci.* 30:279-281.

Valadkhan, S. 2010. Role of the snRNAs in spliceosomal active site. *RNA Biol.* 7:345-353.

Wahl, M. C., C. L. Will, and R. Lührmann. 2009. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* 136:701-718.

Regulación del procesamiento del pre-mRNA

Black, D. L. 2003. Mechanisms of alternative pre-mRNA splicing. *Ann. Rev. Biochem.* 72:291-336.

Chen, M., and J. L. Manley. 2009. Mechanisms of alternative splicing regulation: insights from molecular and genomics approaches. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10:741-754.

Licatalosi, D. D., and R. B. Darnell. 2010. RNA processing and its regulation: global insights into biological networks. *Nat. Rev. Genet.* 11:75-87.

Maniatis, T., and B. Tasic. 2002. Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans. *Nature* 418:236-243.

Raponi, M., and D. Baralle. 2010. Alternative splicing: good and bad effects of translationally silent substitutions. *FEBS J.* 277:836-840.

Wang, E. T., et al. 2008. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* 456:470-476.

Zhong, X. Y., et al. 2009. SR proteins in vertical integration of gene expression from transcription to RNA processing to translation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 19:424-436.

Transporte del mRNA a través de la envoltura nuclear

Cole, C. N., and J. J. Scarcelli. 2006. Transport of messenger RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18:299-306.

Grunwald, D., R. H. Singer, and M. Rout. 2011. Nuclear export dynamics of RNA-protein complexes. *Nature* 475:333-341.

Iglesias, N., and F. Stutz. 2008. Regulation of mRNP dynamics along the export pathway. *FEBS Lett.* 582:1987-1996.

Katahira, J., and Y. Yoneda. 2009. Roles of the TREX complex in nuclear export of mRNA. *RNA Biol.* 6:149-152.

Rodriguez-Navarro, S., and E. Hurt. 2011. Linking gene regulation to mRNA production and export. *Curr. Opin. Cell Biol.* 23:302-309.

Stewart, M. 2010. Nuclear export of mRNA. *Trends Biochem. Sci.* 35:609-617.

Wente, S. R., and M. P. Rout. 2010. The nuclear pore complex and nuclear transport. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2(10):a000562.

Mecanismos citoplasmáticos de control postranscripcional

Ambros, V. 2004. The functions of animal microRNAs. *Nature* 431:350-355.

Buchan, J. R., and R. Parker. 2009. Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Mol. Cell* 36:932-941.

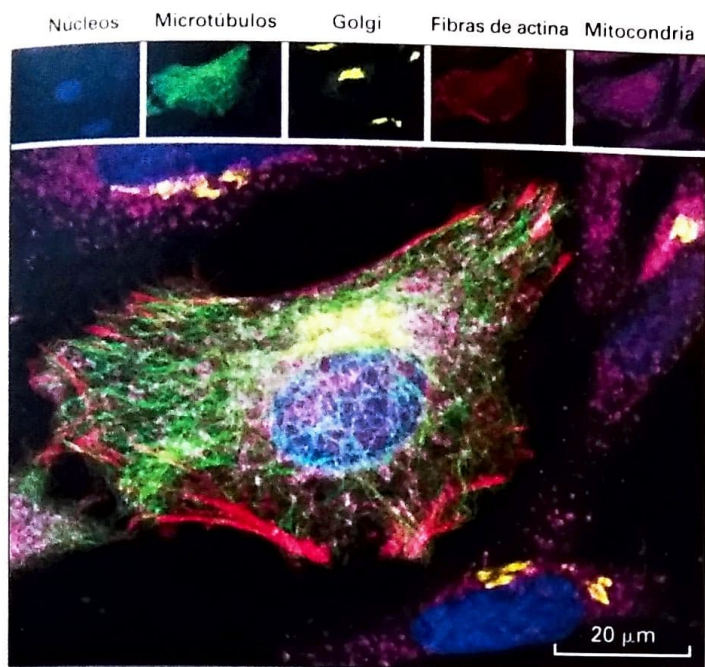
Carthew, R. W., and E. J. Sontheimer. 2009. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136:642-655.

Doma, M. K., and R. Parker. 2007. RNA quality control in eukaryotes. *Cell* 131:660-668.

- Eulalio, A., I. Behm-Ansmant, and E. Izaurralde. 2007. P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**:9-22.
- Fabian, M. R., N. Sonenberg, and W. Filipowicz. 2010. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu. Rev. Biochem.* **79**:351-379.
- Ghildiyal, M., and P. D. Zamore. 2009. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat. Rev. Genet.* **10**:94-108.
- Groppo, R., and J. D. Richter. 2009. Translational control from head to tail. *Curr. Opin. Cell Biol.* **21**:444-451.
- Hirokawa, N. 2006. mRNA transport in dendrites: RNA granules, motors, and tracks. *J. Neurosci.* **26**:7139-7142.
- Huntzinger, E., and E. Izaurralde. 2011. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat. Rev. Genet.* **12**:99-110.
- Jobson, R. W., and Y. L. Qiu. 2008. Did RNA editing in plant organellar genomes originate under natural selection or through genetic drift? *Biol. Direct.* **3**:43.
- Kidner, C. A., and R. A. Martienssen. 2005. The developmental role of microRNA in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**:38-44.
- Leung, A. K., and P. A. Sharp. 2010. MicroRNA functions in stress responses. *Mol. Cell.* **40**:205-215.
- Lodish, H. F., et al. 2008. Micromanagement of the immune system by microRNAs. *Nat. Rev. Immunol.* **8**:120-130.
- Maquat, L. E., W. Y. Tarn, and O. Isken. 2010. The pioneer round of translation: features and functions. *Cell* **142**:368-374.
- Martin, K. C., and A. Ephrussi. 2009. mRNA localization: gene expression in the spatial dimension. *Cell* **136**:719-730.
- Mello, C. C., and D. Conte Jr. 2004. Revealing the world of RNA interference. *Nature* **431**:338-342. C. C. Mello's Nobel Prize lecture can be viewed at http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/announcement.html
- Michels, A. A. 2011. MAF1: a new target of mTORC1. *Biochem. Soc. Trans.* **39**:487-491.
- Mihaylova, M. M., and R. J. Shaw. 2011. The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nature Cell Biol.* **13**:1016-1023.
- Parker, R., and H. Song. 2004. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**:121-127.
- Richter, J. D., and N. Sonenberg. 2005. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* **433**:477-480.
- Ruvkun, G. B. 2004. The tiny RNA world. Harvey Lect. **99**:1-21. Shaw, R. J. 2008. mTOR signaling: RAG GTPases transmit the amino acid signal. *Trends Biochem. Sci.* **33**:565-568.
- Simpson, L., et al. 2004. Mitochondrial proteins and complexes in Leishmania and Trypanosoma involved in U-insertion/deletion RNA editing. *RNA* **10**:159-170.
- Siomi, M. C., et al. 2011. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**:246-258.
- Willis, I. M., and R. D. Moir. 2007. Integration of nutritional and stress signaling pathways by MafK. *Trends Biochem. Sci.* **32**:51-53.
- Wullschlegel, S., R. Loewith, and M. N. Hall. 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **124**:471-484.
- Zhang, H., J. M. Maniar, and A. Z. Fire. 2011. 'Inc-miRs': functional intron-interrupted miRNA genes. *Genes Dev.* **25**:1589-1594. A. Z. Fire's Nobel Prize lecture can be viewed at http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/2006/announcement.html
- Zoncu, R., A. Efeyan, and D. M. Sabatini. 2011. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**:21-35.

Procesamiento del rRNA y tRNA

- Evans, D., S. M. Marquez, and N. R. Pace. 2006. RNase P: interface of the RNA and protein worlds. *Trends Biochem. Sci.* **31**:333-341.
- Fatica, A., and D. Tollervey. 2002. Making ribosomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**:313-318.
- Hage, A. E., and D. Tollervey. 2004. A surfeit of factors: why is ribosome assembly so much more complicated in eukaryotes than bacteria? *RNA Biol.* **1**:10-15.
- Hamma, T., and A. R. Ferre-D'Amaré. 2010. The box H/ACA ribonucleoprotein complex: interplay of RNA and protein structures in post-transcriptional RNA modification. *J. Biol. Chem.* **285**:805-809.
- Handwerger, K. E., and J. G. Gall. 2006. Subnuclear organelles: new insights into form and function. *Trends Cell Biol.* **16**:19-26.
- Kressler, D., E. Hurt, and J. Bassler. 2010. Driving ribosome assembly. *Biochim. Biophys. Acta.* **1803**:673-683.
- Liang, B., and H. Li. 2011. Structures of ribonucleoprotein particle modification enzymes. *Q. Rev. Biophys.* **44**:95-122.
- Marvin, M. C., and D. R. Engelke. 2009. RNase P: increased versatility through protein complexity? *RNA Biol.* **6**:40-42.
- Nizami, Z., S. Deryusheva, and J. G. Gall. 2010. The Cajal body and histone locus body. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**(7):a000653.
- Phizicky, E. M., and A. K. Hopper. 2010. tRNA biology charges to the front. *Genes Dev.* **24**:1832-1860.
- Schmid, M., and T. H. Jensen. 2008. The exosome: a multipurpose RNA-decay machine. *Trends Biochem. Sci.* **33**:501-510.
- Stahley, M. R., and S. A. Strobel. 2006. RNA splicing: group I intron crystal structures reveal the basis of splice site selection and metal ion catalysis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16**:319-326.
- Tschochner, H., and E. Hurt. 2003. Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. *Trends Cell Biol.* **13**:255-263.



La microscopía por fluorescencia muestra la localización del DNA y múltiples proteínas dentro de la misma célula. Las técnicas de marcación y tinción utilizan diferentes moléculas fluorescentes que revelan las proteínas del citoesqueleto α -tubulina (verde) y actina (roja), el DNA (azul), el complejo de Golgi (amarillo) y las mitocondrias (púrpura). Las imágenes en la parte superior son imágenes en falso color de cada estructura teñida individualmente. La imagen más grande de estas imágenes separadas combina éstas para describir la célula completa. (De B. N. G. Geipmans y cols., 2006, *Science* **312**:217)

Es difícil creer que hace 400 años no se sabía que todos los seres vivos están constituidos por células. En 1655, Robert Hooke usó un microscopio primitivo para examinar una pieza de corcho y vio una disposición ordenada de rectángulos –las paredes celulares de las plantas muertas– que le recordó a las celdas de los monjes en un monasterio, por lo que acuñó el nombre de *células* (o celdas). Poco después de esto, Antonie van Leeuwenhook describió a los microorganismos que vio en este simple microscopio, la primera descripción de las células vivas. Dos siglos más tarde, Matthias Schleiden y Theodore Schwann observaron que las células individuales constituyen la unidad fundamental de la vida en una variedad de plantas, animales y organismos unicelulares. Colectivamente, éstos fueron algunos de los grandes descubrimientos en biología y plantearon la cuestión de cómo se organizan y funcionan las células. Sin embargo, muchas limitaciones técnicas impiden los estudios de las células en los animales y plantas intactos. Una alternativa es el uso de órganos intactos que son retirados de los animales y tratados para mantener su integridad y funciones fisiológicas. Sin embargo, la organización de los órganos, incluso los

Cultivo, visualización y perturbación de células

aislados, es lo suficientemente compleja como para plantear problemas para la investigación. Por ende, los biólogos celulares y moleculares suelen realizar estudios experimentales en células aisladas de un organismo. En la Sección 9.1 se aprende cómo mantener y crecer diversos tipos celulares y cómo aislar tipos específicos de células desde sus localizaciones nativas, por lo que se analizará cómo los investigadores cultivan y examinan células en ambientes tridimensionales para imitar tanto como sean posibles sus situaciones en un animal.

En la mayoría de los casos, las células aisladas pueden mantenerse en el laboratorio bajo condiciones que permitan su supervivencia y crecimiento, un procedimiento que se conoce como *cultivo*. Las células cultivadas tienen diversas ventajas respecto de los organismos intactos para la investigación biológica. Las células de un único tipo específico pueden crecer en un cultivo, donde las condiciones experimentales se controlan mejor, y en muchos casos una única célula puede hacerse crecer de manera rápida para formar una colonia de células idénticas. La cepa resultante de células, que es genéticamente homogénea, se denomina un *clon*.

CONTENIDO

9.1	Crecimiento de células en cultivo	398
9.2	Microscopía óptica: exploración de las estructuras celulares y visualización de las proteínas dentro de las células	404
9.3	Microscopía electrónica: imagen de alta resolución	419

9.4	Aislamiento y caracterización de orgánulos celulares	424
9.5	Perturbación de funciones celulares específicas	430

Los descubrimientos acerca de la organización celular han estado íntimamente ligados con los desarrollos tanto de la microscopía óptica como electrónica. Esto es una verdad hoy como lo fue hace 400 años. La microscopía óptica inicialmente reveló la maravillosa organización celular interna, y en la actualidad constantemente se están mejorando los microscopios altamente sofisticados para sondear cada vez más profundo y revelar el mecanismo molecular por el cual funcionan las células. En la Sección 9.2 describimos la microscopía óptica y las diferentes tecnologías disponibles, de hace mucho tiempo pero que aún son métodos valiosos, y luego haremos un recorrido a través de diversos métodos ingeniosos que han sido desarrollados desde entonces, hasta culminar con la más nueva de las tecnologías punteras. En la década de 1960 se produjo un avance importante y en la década de 1970 con el desarrollo de la *microscopía de inmunofluorescencia* que permitió la localización específica de proteínas dentro de células fijadas, lo que proporcionó así una imagen estática de su localización, como se ilustra en la figura de apertura. Tales estudios llevaron al concepto importante de que las membranas y los espacios interiores de cada tipo de orgánulo contienen un grupo distintivo de proteínas que son esenciales para que el orgánulo lleve a cabo sus funciones únicas. Un avance importante se produjo a mediados de la década de 1990 con la simple idea de expresar *proteínas quiméricas*, que consisten en una proteína de interés unida de forma covalente a una proteína naturalmente fluorescente, para permitir a los biólogos visualizar los movimientos de las proteínas individuales en las células vivas. De repente, se pudo apreciar la naturaleza dinámica de las células, que cambió la visión de las imágenes estáticas de éstas disponibles anteriormente. Además, presentó un desafío tecnológico —cuanto más sensible era el microscopio para detectar la proteína fluorescente, más información podía obtener el investigador de esos datos—. También posibilitó el desarrollo de técnicas de fluorescencia para evaluar las interacciones proteína-proteína en las células vivas, como también una mirada sobre otras tecnologías moleculares sofisticadas, algunas de las cuales se describen en esta sección.

A pesar de los desarrollos asombrosos en la microscopía óptica, la luz visible proporciona una resolución demasiado baja para examinar a las células a nivel de detalle ultramolecular. El microscopio electrónico proporciona una resolución mayor, pero la tecnología suele necesitar que la célula sea fijada y seccionada y, por lo tanto, los movimientos celulares se congelan en el tiempo. La microscopía electrónica también permite que los investigadores examinen la estructura de complejos macromoleculares o macromoléculas únicas. En la Sección 9.3 se detallan algunas técnicas para la preparación de especímenes para la observación en el microscopio electrónico y se describe el tipo de información que se puede obtener de ellos.

La microscopía óptica y electrónica reveló que todas las células eucariotas —ya sean de origen animal, de plantas u hongos— contienen un repertorio similar de compartimentos limitados por membrana llamados **orgánulos**. En la Sección 9.4 se proporciona una introducción simple a la estructura y la función básica de los principales orgánulos en las células de plantas y animales, como un prelude a sus descripciones detalladas en los siguientes capítulos. En paralelo con los desarrollos de la microscopía, se desarrollaron métodos de fraccionamiento subcelular que permitieron a los biólogos celulares aislar orgánulos individuales con un alto grado de pureza. Estas técnicas, también detalladas en la Sección 9.4, continúan proporcionando información importante acerca de la composición proteica y las funciones bioquímicas de los orgánulos.

La microscopía y la caracterización de orgánulos son tecnologías inherentemente descriptivas. ¿Cómo uno puede investigar los mecanismos moleculares que subyacen a los procesos biológicos celulares? Si queremos comprender cómo funciona un automóvil, podemos explorar los efectos de la eliminación o la interferencia con componentes individuales para ver qué sucede. Éste es en principio, por supuesto, el concepto del análisis genético que se describió en el Capítulo 5: cómo la interferencia de un componente específico puede ser usada para analizar su función. En la Sección 9.5 describimos cómo las pequeñas moléculas que interfieren con la función de proteínas específicas pueden también ser utilizadas para analizar procesos celulares. Finalmente, describiremos cómo el descubrimiento de los RNA de interferencia pequeños que se dirigen a mRNA específicos para su destrucción han sido explotados para suprimir la expresión de proteínas específicas, tanto en células cultivadas como en animales enteros, para expandir y complementar el uso de las genéticas clásicas en el análisis de los procesos biológicos.

9.1 Crecimiento de células en cultivo

El estudio de las células está facilitado en gran medida por el crecimiento de ellas en cultivo, donde pueden ser examinadas por microscopía y sometidas a tratamientos específicos bajo condiciones controladas. En general es bastante fácil hacer crecer células bacterianas unicelulares, hongos o protistas; por ejemplo, colocándolas en un medio rico que mantenga sus crecimientos. Sin embargo, las células animales provenientes de organismos multicelulares son más difíciles de cultivar en forma aislada o en grupos pequeños. En esta sección analizaremos cómo las células animales crecen en cultivo y cómo se pueden purificar diferentes tipos celulares para su estudio.

El cultivo de células animales requiere de un medio rico en nutrientes y superficies sólidas especiales

Para permitir la supervivencia y el funcionamiento normal de tejidos o células cultivadas se deben simular tanto como sea posible las condiciones de temperatura, pH, fuerza iónica y acceso a los nutrientes esenciales, de dentro de un organismo intacto. Las células animales aisladas en general se colocan en un medio líquido rico en nutrientes, denominado medio de cultivo, dentro de placas o recipientes con una cubierta especial de plástico. Los cultivos se mantienen en incubadoras en las cuales se puede controlar la temperatura, la humedad y la atmósfera. Para reducir las posibilidades de contaminación bacteriana o con hongos se suelen añadir antibióticos al medio de cultivo. Para protegerlo aún más contra la contaminación, los investigadores suelen transferir células entre las placas, añadiendo reactivos al medio de cultivo, y manipular los especímenes dentro de cabinas estériles especiales que contienen aire circulante que es filtrado para eliminar los microorganismos y otros contaminantes transportados por el aire.

Los medios para cultivar células animales deben estar suplementados con nueve aminoácidos (fenilalanina, valina, treonina, triptófano, isoleucina, metionina, lisina e histidina) que no pueden ser sintetizados por las células de animales vertebrados adultos. Además, la mayoría de las células cultivadas requieren otros tres aminoácidos (cisteína, tirosina y arginina) que son sintetizados solo por células especializadas en los animales intactos, así como glutamina, que sirve como fuente de

nitrógeno. Los otros componentes necesarios de un medio para las células animales en cultivo son las vitaminas, diversas sales, los ácidos grasos, la glucosa y el suero —el líquido remanente después de permitir la coagulación de las partes no celulares de la sangre (plasma)—. El suero contiene diversos factores proteicos que son necesarios para la proliferación de las células de mamífero en cultivo, que incluyen la hormona polipeptídica insulina; la transferrina, la cual suministra hierro en una forma bioaccesible, y numerosos factores de crecimiento. Además, ciertos tipos de células requieren factores de crecimiento especializados no presentes en el suero. Por ejemplo, los progenitores de los glóbulos rojos requieren eritropoyetina, y los linfocitos T requieren interleucina 2 (véase el Cap. 16). Unos pocos tipos de células de mamífero se pueden cultivar en un medio químicamente definido, libre de suero, que contiene aminoácidos, glucosa, vitaminas y sales, además de ciertos minerales, factores de crecimiento específicos y otros componentes.

A diferencia de las células de levadura y bacterianas, que pueden cultivarse en suspensión, la mayoría de los tipos de células animales solo crecerá adherida a una superficie sólida. Este requerimiento resalta la importancia de las proteínas de la superficie celular, denominadas **moléculas de adhesión celular** (CAM, *cell-adhesion molecules*), que las células usan para unirse a las células adyacentes y a componentes de la matriz extracelular (MEC), tales como colágeno o fibronectina (véase el Cap. 20). Estas proteínas MEC cubren la superficie sólida (en general de vidrio o plástico), ya sea que provengan del suero o sean secretadas por las células en cultivo. Una única célula cultivada en una placa de vidrio o plástico prolifera hasta formar una masa visible, o *colonia*, que contiene miles de células genéticamente idénticas en 4 a 14 días, lo cual depende de la tasa de crecimiento. Algunas células sanguíneas especializadas y células tumorales pueden ser mantenidas o crecen en suspensión como células individuales.

Los cultivos celulares primarios y las cepas de células tienen un tiempo de vida limitado

Por lo general se utilizan los tejidos animales normales (p. ej., piel, riñón, hígado) o embriones enteros para establecer *cultivos celulares primarios*. Para preparar células de tejidos individuales para un cultivo primario, se deben romper las interacciones célula-célula y célula-matriz. Para ello, los fragmentos de tejidos se tratan con una combinación de una proteasa (p. ej., tripsina, la enzima hidrolizante de colágeno, o ambas) y un catión divalente quelante (p. ej., EDTA) que reduce la concentración de Ca^{2+} libre en el medio. Muchas moléculas de adhesión celular requieren calcio y, por lo tanto, son inactivadas cuando se elimina el calcio; otras moléculas de adhesión celular que no son dependientes del calcio necesitan ser proteolizadas para que las células se separen. La misma solución de proteasa-quelante se utiliza para eliminar las células adherentes de una placa de cultivo para estudios bioquímicos o subcultivos (transferencia a otra placa).

Los **fibroblastos** son las células predominantes en el tejido conectivo y normalmente producen componentes de la MEC, tales como colágeno, que se unen a las moléculas de adhesión celular, anclando las células a una superficie. En cultivo, los fibroblastos suelen dividirse más rápidamente que otras células a partir de un tejido, y eventualmente se convierten en el tipo celular predominante en un cultivo primario a menos que se tomen precauciones especiales para eliminarlas cuando se aíslan otros tipos de célula.

Cuando se cultivan células extraídas de un embrión o un animal adulto, la mayoría de las células adherentes se dividirá un número finito de veces y luego dejará de crecer (células senescentes). Por ejemplo, los fibroblastos fetales humanos se dividen alrededor de 50 veces antes de detener su crecimiento (Fig. 9-1a). Si se comienza con 10^6 células, 50 duplicaciones tienen el potencial de producir $10^6 \times 2^{50}$, o más de 10^{20} células, que es equivalente al peso de alrededor de 1 000 personas. Normalmente, en cualquier experimento solo se utiliza una pequeña fracción de estas células. Por lo tanto, incluso a pesar de que su tiempo de vida es limitado, un cultivo simple, si se lo mantiene cuidadosamente, puede ser estudiado a través de muchas generaciones celulares. Tal linaje de células originadas a partir de un cultivo primario inicial se denomina una **cepa celular**.

Una excepción importante del tiempo de vida finito de las células normales es la **célula madre embrionaria**, que como su nombre lo indica, deriva de un embrión y se dividirá para dar origen a todos

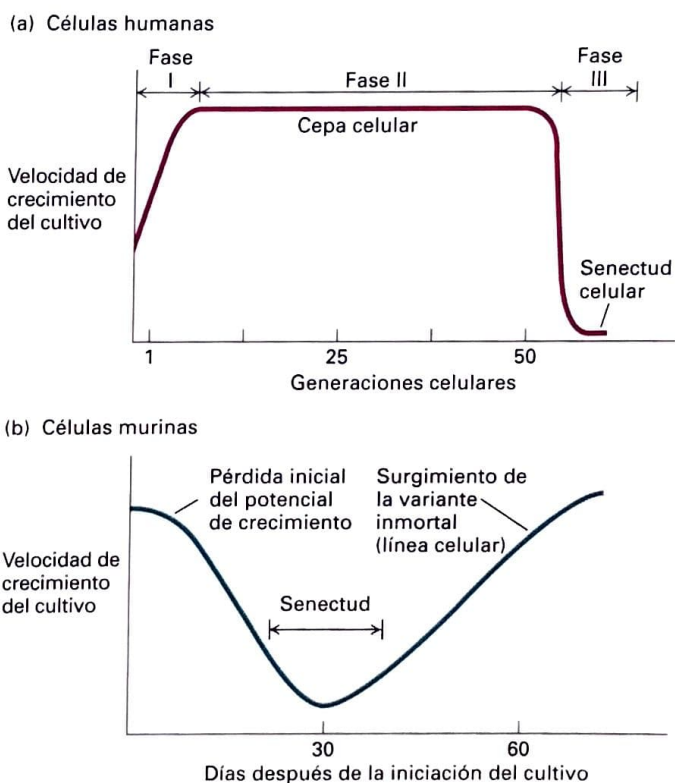


FIGURA 9-1 Etapas en el establecimiento de un cultivo de células. (a) Cuando inicialmente se cultivan células aisladas de tejido humano, algunas células mueren y otras (principalmente los fibroblastos) comienzan a crecer; de manera global, la tasa de crecimiento se incrementa (fase I). Si el resto de las células son privadas de alimento, se las diluye y se las vuelve a sembrar en placas una y otra vez, la cepa de célula continúa dividiéndose a una velocidad constante durante alrededor de 50 generaciones celulares (fase II), después de la cual la velocidad de crecimiento disminuye rápidamente. En el período siguiente (fase III), todas las células en el cultivo detienen su crecimiento (senectud). (b) En un cultivo preparado a partir de células de ratón u otro roedor, la célula inicial muerta (no se muestra) se acopla con el grupo de células que crece saludablemente. A medida que las divisiones celulares disminuyen y se permite que continúe el crecimiento, pronto comienzan a perder su potencial de crecimiento y la mayoría deja de crecer (es decir, el cultivo entra en senectud). Células muy raras sufren mutaciones oncogénicas que les permiten sobrevivir y continuar dividiéndose hasta que su progenie cubre el cultivo. Estas células constituyen una línea celular, la cual crecerá indefinidamente si se la diluye y suministran nutrientes adecuados. Tales células se dice que son inmortales.

los tejidos durante el desarrollo. Como se analizó en el Capítulo 21, las células madre embrionarias se pueden cultivar indefinidamente en condiciones adecuadas.

La investigación con cepas celulares se simplifica por la capacidad para congelarlas y descongelarlas exitosamente un tiempo después para análisis experimental. Las cepas celulares se pueden congelar en un estado de animación suspendida y almacenar por períodos largos a temperatura de nitrógeno líquido, proporcionando un conservante que evite la formación de cristales de hielo dañinos. Aunque no todas las células sobreviven al descongelamiento, muchas sí lo hacen y retoman su crecimiento.

Las células transformadas pueden crecer indefinidamente en cultivo

Para poder clonar células individuales, modificar su comportamiento celular o seleccionar mutantes, los biólogos a menudo quieren mantener cultivos de células por mucho más de 50 divisiones. Tales crecimientos prolongados son mostrados por las células derivadas de algunos tumores. Además, células raras en una población de células primarias pueden sufrir mutaciones oncogénicas espontáneas, lo que lleva a la **transformación** oncogénica (véase el Cap. 24). Tales células, se dice que están oncogénicamente *transformadas* o simplemente transformadas, y pueden proliferar indefinidamente. Un cultivo de células con un período de vida indefinido es considerado inmortal y se denomina **línea celular**.

Los cultivos de células primarias de células de roedores normales suelen sufrir transformación espontánea en una línea celular. Después que las células de roedores son mantenidas en cultivo durante varias

generaciones, el cultivo entra en senectud (Fig. 9-1b). Durante este período, la mayoría de las células detiene su crecimiento, pero a menudo una célula transformada que se divide rápidamente surge espontáneamente y toma el control, o crece por encima del cultivo. Una línea celular derivada de esta variante transformada proliferará espontáneamente si se le proporcionan los nutrientes necesarios. En contraste con las células de roedores, las células humanas normales raramente sufren transformación espontánea para dar lugar a una línea celular. La línea celular HeLa, la primera línea celular humana establecida, se obtuvo originalmente en 1952 a partir de un tumor maligno (carcinoma) de cuello uterino. Otras líneas celulares humanas suelen derivarse de cánceres y otras se han convertido en inmortales al transformarlas para que expresen oncogenes.

Independientemente de la fuente, las células en las líneas inmortalizadas suelen tener cromosomas con secuencias de DNA anómalas. Además, el número de cromosomas en tales células suele ser mayor que el de las células normales a partir de las cuales surgen, y el número de cromosomas cambia a medida que las células continúan dividiéndose en cultivo. Una excepción notoria es la línea de ovario de hámster chino (CHO) y sus derivados, que tienen menos cromosomas que sus progenitores hámster. Las células con un número anómalo de cromosomas se dice que son aneuploides.

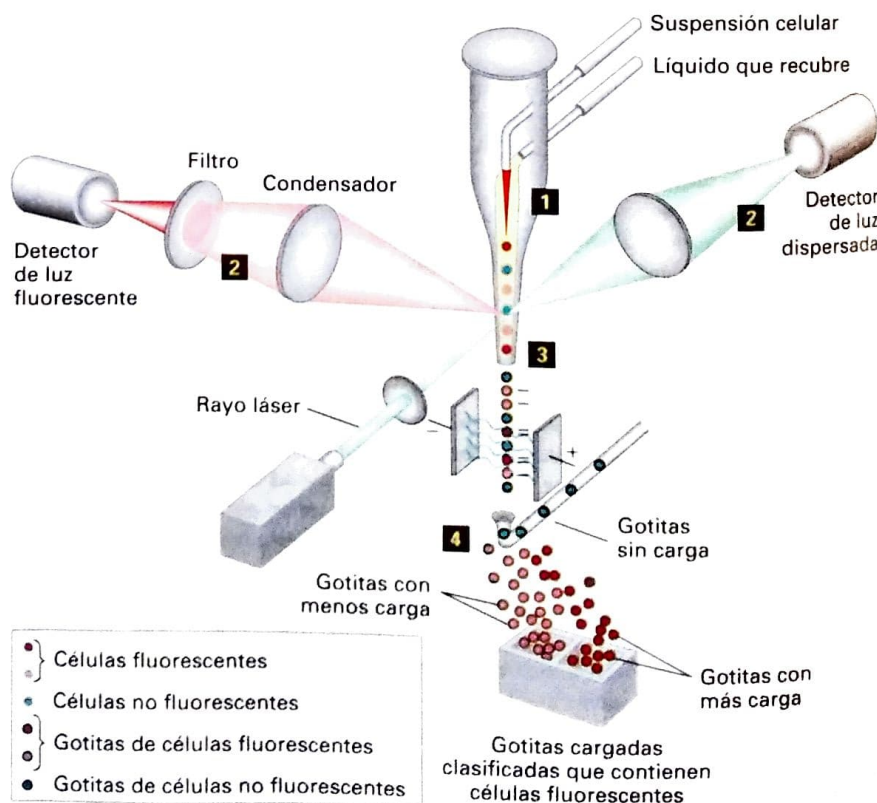
La citometría de flujo separa diferentes tipos de células

Algunos tipos de células difieren lo suficiente en densidad como para que puedan ser separados sobre la base de sus propiedades físicas. Los glóbulos blancos (leucocitos) y los glóbulos rojos (eritrocitos), por ejemplo,

FIGURA 9-2 El clasificador de células activado por fluorescencia (FACS) separa las células que están marcadas de modo diferencial con un reactivo fluorescente.

Paso 1: se mezcla una suspensión concentrada de células marcadas con una solución amortiguadora (el líquido que las recubre) de manera tal que las células pasen en una única fila a través de un haz de luz láser. Paso 2: se mide tanto la luz fluorescente emitida como la luz dispersada por cada célula; a partir de las mediciones de la luz dispersada se puede determinar el tamaño y la forma de la célula. Paso 3: después la suspensión se hace pasar a través de una boquilla, la cual forma gotas diminutas que contienen como máximo una única célula. Al momento de formación en la punta de la boquilla, a cada gota que contiene una célula se le da una descarga eléctrica negativa proporcional a la fluorescencia de la célula determinada a partir de las primeras mediciones. Paso 4: las gotas ahora pasan a través de un campo eléctrico, por ende se descartan aquellas gotas sin carga, mientras que aquellas con cargas eléctricas diferentes son separadas y recolectadas. Debido a que sólo toma unos milisegundos clasificar cada gota, pueden pasar tanto como 10 millones de células por hora a través de la máquina. (Adaptado de

D. R. Parks y L. A. Herzenberg, 1982, *Meth. Cell Biol.* 26:283)



tienen densidades muy diferentes debido a que los eritrocitos no tienen núcleo; por eso estas células se pueden separar por centrifugación por gradiente de densidad (descrita en la Sección 9.4). Debido a que la mayoría de los tipos de células no pueden diferenciarse fácilmente, se deben utilizar otras técnicas como la citometría de flujo para separarlas.

Para identificar un tipo de célula de una mezcla compleja, es necesario tener alguna forma de marcar y luego clasificar las células deseadas. Diferentes tipos de célula suelen expresar diferentes moléculas en sus superficies celulares. Si una molécula de superficie particular solo se expresa en el tipo celular deseado, esto puede utilizarse para marcar esas células. La mezcla celular se puede incubar con un colorante fluorescente unido a un anticuerpo contra moléculas de superficie celular, obteniendo así las células deseadas con fluorescencia. Las células se pueden analizar en un citómetro de flujo. Este aparato hace fluir las células por un haz de láser que mide la luz que dispersan y la fluorescencia que emiten; de este modo se pueden cuantificar las cantidades de células del tipo deseado a partir de una mezcla. Un clasificador celular activado por fluorescencia (FACS, *fluorescence-activated cell sorter*), que se basa en la citometría de flujo, puede tanto analizar las células, como seleccionar una o unas pocas células de miles de otras y clasificarlas en una placa de cultivo separada (Fig. 9-2). Para clasificar las células se ajustan sus concentraciones de manera tal que las gotas diminutas que el FACS forma y analiza solo contenga una célula por cada gota. Un chorro de gotas se analiza por fluorescencia, y aquellas que tienen la señal deseada se clasifican separándolas de las que no la tienen. Una vez que las células han sido clasificadas, las seleccionadas se pueden cultivar.

El procedimiento por FACS se suele utilizar para purificar diferentes tipos de leucocitos, cada uno de los cuales porta en su superficie una o más proteínas distintivas y unirán anticuerpos monoclonales específicos para la proteína. Solo las células T del sistema inmunitario, por ejemplo, tienen tanto proteínas CD3 como Thy1.2 en sus superficies. La presencia de estas proteínas de superficie permite que las células T sean separadas fácilmente respecto de los otros tipos de leucocitos o células del bazo (Fig. 9-3).

Otros usos de la citometría de flujo incluyen la medición del contenido de DNA o RNA de una célula y la determinación de su forma y tamaño general. El FACS puede medir simultáneamente el tamaño de una célula (a partir de la cantidad de luz dispersada) y la cantidad de DNA que contiene (a partir de la cantidad de fluorescencia emitida por un colorante unido al DNA). Las mediciones del contenido de DNA de las células individuales se utilizan para seguir la replicación del DNA a medida que las células progresan a través del ciclo celular (véase el Cap. 19).

Un método alternativo para la separación de tipos específicos de células usa pequeñas esferas magnéticas acopladas a anticuerpos para la molécula de superficie específica. Por ejemplo, para aislar células T, las esferas se cubren con un anticuerpo monoclonal específico para una proteína de superficie como CD3 o Thy1.2. Sólo las células con estas proteínas se adherirán a las esferas y se pueden recuperar de la preparación mediante adhesión a un imán pequeño en el lateral de tubo de ensayo.

El crecimiento de células en cultivos bidimensionales y tridimensionales imita el ambiente in vivo

Se ha aprendido mucho utilizando el cultivo en una superficie de plástico o vidrio, aunque estas superficies están alejadas del ambiente tisular normal de las células. En el Capítulo 20 se detalla cómo muchos tipos de células funcionan solo cuando se encuentran conectadas a otras

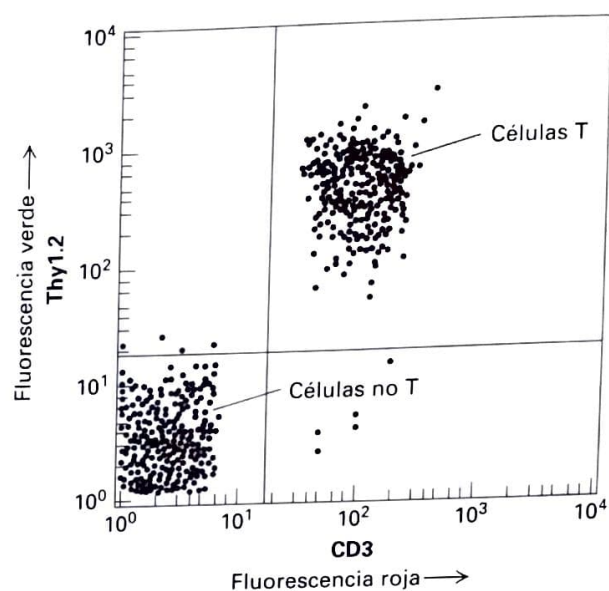
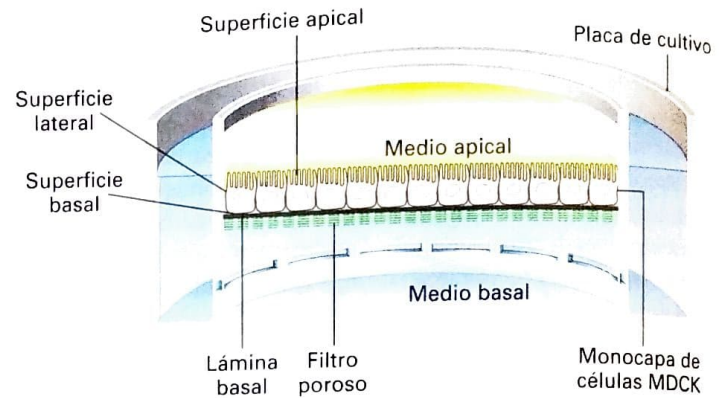


FIGURA EXPERIMENTAL 9-3 Las células T unidas a los anticuerpos marcados con fluorescencia contra dos proteínas de la superficie celular son separadas de otros glóbulos blancos mediante FACS. Las células del bazo de un ratón se trataron con un anticuerpo monoclonal fluorescente específico para la proteína de superficie celular CD3 y con un anticuerpo monoclonal verde fluorescente específico contra una segunda proteína de la superficie celular, Thy1.2. A medida que las células pasan a través de un aparato FACS, se mide la intensidad de la fluorescencia verde y roja emitida por cada célula. Cada punto representa una célula única. Este gráfico de la fluorescencia verde (eje vertical) versus la fluorescencia roja (eje horizontal) para miles de células de bazo muestra que alrededor de la mitad de estas células T expresan tanto las proteínas CD3 como Thy1.2 sobre su superficie (cuadrante superior derecho). Las células restantes, que presentan baja fluorescencia (cuadrante inferior izquierdo), expresan solo concentraciones basales de estas proteínas y son otros tipos de glóbulos blancos. Nótese la escala logarítmica sobre ambos ejes. (Cortesía de Chengcheng Zhang, Whitehead Institute.)

células. Ejemplos claves son las capas tipo láminas del tejido epitelial, llamado **epitelio**, que cubre las superficies internas y externas de los órganos. En general, las diferentes superficies de una célula epitelial polarizada se denominan superficie **apical** (parte superior), **basal** (parte inferior o base) y **lateral** (costado) (véase el Fig. 20-10). La superficie basal suele hacer contacto con la matriz extracelular subyacente denominada **lámina basal**, cuya composición y función se analiza en la Sección 20-3. Las células epiteliales funcionan en el transporte específico de clases de moléculas a través de las láminas epiteliales; por ejemplo, el recubrimiento epitelial del intestino transporta nutrientes hacia el interior de la célula a través de la superficie apical y hacia afuera a la circulación sanguínea a través de la superficie basolateral. Cuando crecen sobre una superficie de plástico o vidrio las células epiteliales no pueden llevar a cabo esta función con facilidad. Por ende, se han diseñado recipientes especiales con una superficie porosa que actúa como la lámina basal a la cual se adhieren las células epiteliales y forman una lámina bidimensional uniforme (Fig. 9-4). Una línea celular cultivada que se utiliza con frecuencia derivada del epitelio de riñón de perro se llama *Madin-Darby canine kidney (MDCK) cells* y suele utilizarse para estudiar la formación y función de las láminas epiteliales.

Sin embargo, incluso una lámina bidimensional a menudo no permite que las células imiten por completo el comportamiento en su

FIGURA 9-4 Las células MDCK que crecen en recipientes especializados proporcionan un sistema experimental para el estudio de las células epiteliales. Las células MDCK forman un epitelio polarizado cuando crecen sobre una membrana porosa cubierta por un lado con colágeno y por el otro por componentes de la lámina basal. Aquí se muestra un disco especial de cultivo en el cual el medio a cada lado del filtro (lados apical y basal de mono-plano) puede manipularse experimentalmente y controlarse el movimiento de las moléculas a través de los planos. Varias interconexiones que comunican las células sólo se forman si el medio de crecimiento contiene Ca^{2+} suficiente.



ambiente normal. En la actualidad se han desarrollado métodos para cultivar células en tres dimensiones al proporcionarles un sostén infiltrado con componentes de la matriz extracelular. Si las células MDCK se cultivan en condiciones adecuadas, formarán una lámina tubular que imita un órgano tubular o el conducto de una glándula secretora. En las estructuras tridimensionales, el lado apical de la lámina epitelial recubre el lumen, mientras que el lado basal de cada célula está en contacto con la matriz extracelular (Fig. 9-5).

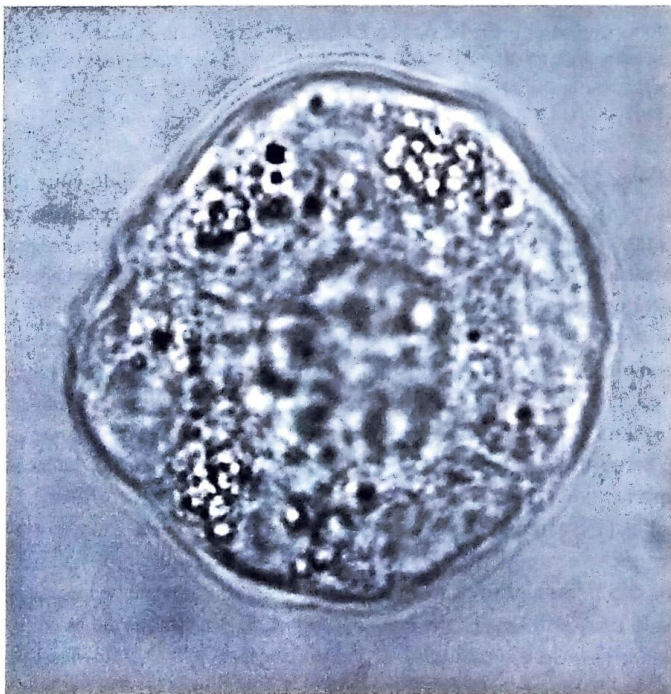
Las células híbridas llamadas hibridoma producen abundantes anticuerpos monoclonales

Además de servir como modelo de investigación para estudios de función celular, las células cultivadas se pueden convertir en “fábricas” para la producción de proteínas específicas. En el Capítulo 5 se describió cómo la introducción de genes que codifican insulina, factores de crecimiento y otras proteínas terapéuticas al interior de las células eucariontes o bacterias se puede usar para expresar y recupe-

rar estas proteínas (véanse las Figs. 5-31 y 5-32). Aquí consideraremos el uso de células cultivadas especiales para generar anticuerpos monoclonales, que son herramientas experimentales ampliamente utilizadas en muchos aspectos de la investigación biológica celular. De manera creciente, se están utilizando en medicina para propósitos terapéuticos y de diagnóstico, como se analiza en los últimos capítulos.

Para comprender el desafío de generar anticuerpos monoclonales, necesitamos brevemente repasar cómo se producen los anticuerpos de mamífero; más detalle se proporciona en el Capítulo 23. Recuerde-se que los anticuerpos son proteínas secretadas por los glóbulos blancos que se unen con gran afinidad a sus antígenos (véase la Fig. 3-19). Cada linfocito B normal productor de anticuerpo en un mamífero es capaz de producir un único tipo de anticuerpo que se puede unir a un

(a)



(b)

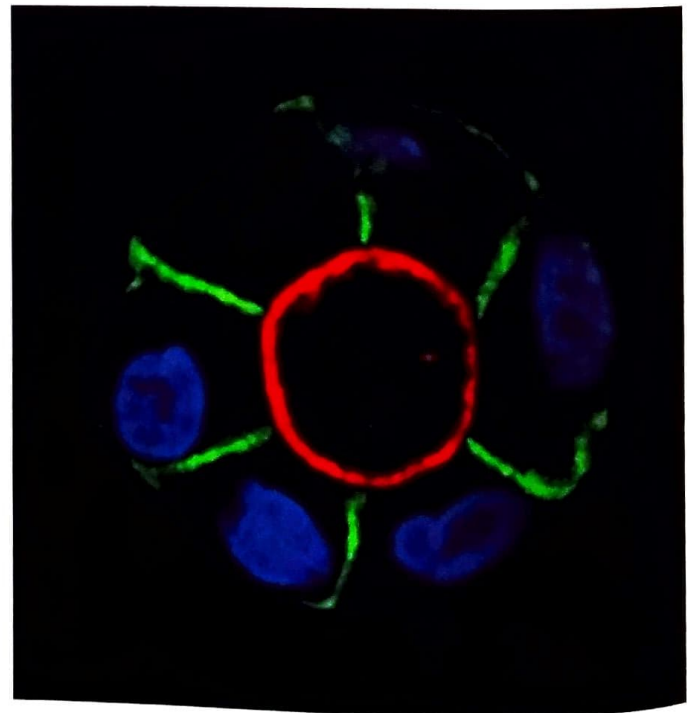


FIGURA EXPERIMENTAL 9-5 Las células MDCK pueden formar quistes en cultivo. (a) Las células MDCK que crecen en una matriz extracelular de soporte forman grupos de células que se polarizan para formar una única capa esférica de células con un lumen en el medio, llamado quiste. (b) Al analizar la localización de proteínas que se encuentran en las membranas apicales (rojo) y

basolaterales (verde), estas células puede verse que están totalmente polarizadas con el lado apical mirando al lumen, lo cual recapitula sus organizaciones en los túbulos renales de los cuales derivan. El DNA nuclear está teñido de azul. (Partes [a] y [b] de D. M. Bryant y cols., 2010. *Nat. Cell Biol.* **12**:1035.)

determinante o epítipo particular en una molécula de antígeno. Un epítipo es en general una región pequeña del antígeno, por ejemplo, que consiste en solo unos pocos aminoácidos. Si el animal es inyectado con un antígeno, los linfocitos B que sintetizan anticuerpos que reconocen al antígeno son estimulados para proliferar y secretar los anticuerpos. Cada linfocito B activado por antígeno forma un clon de células en el bazo o en los nodos linfáticos, donde cada célula del clon produce anticuerpos idénticos, es decir, un *anticuerpo monoclonal*. Debido a que la mayoría de los antígenos naturales contienen múltiples epítipos, la exposición de un animal a un antígeno suele estimular la formación de múltiples clones de linfocitos B diferentes, cada uno de los cuales produce un anticuerpo específico diferente. La mezcla resultante de anticuerpos a partir de los muchos clones de linfocitos B que reconocen diferentes epítipos en el mismo antígeno se dice que es *policlonal*. Tales anticuerpos policlonales circulan en la sangre y pueden aislarse como un grupo.

Aunque los anticuerpos policlonales son muy útiles, los anticuerpos monoclonales son adecuados para muchos tipos de experimentos y aplicaciones médicas cuando se necesita un reactivo que se una solo a un sitio de una proteína, por ejemplo, uno que compita con un ligando sobre un receptor de superficie celular. Lamentablemente, la purificación bioquímica de cualquier tipo de anticuerpo monoclonal a partir de la sangre no es factible por dos razones principales: la concentración de cualquier anticuerpo es muy baja, y todos los anticuerpos tienen la misma estructura molecular básica (véase la Fig. 3-19).

Para producir y luego purificar anticuerpos monoclonales, primero se necesita ser capaz de cultivar el clon de linfocito B apropiado. Sin embargo, los cultivos primarios de linfocitos B normales tienen utilidad limitada para la producción de anticuerpos monoclonales debido a que poseen una vida media limitada. Por lo tanto, el primer paso para producir un anticuerpo monoclonal es generar células productoras de anticuerpo, inmortales (Fig. 9-6). Esta inmortalidad se logra al fusionar los linfocitos B normales obtenidos de un animal inmunizado con linfocitos immortalizados, transformados, llamados *células de mieloma* que por sí solos no sintetizan ni los polipéptidos ligeros ni los pesados que constituyen todos los anticuerpos (véase la Fig. 3-19). El tratamiento con ciertas glucoproteínas virales o con polietilenglicol estimula las membranas plasmáticas de dos células para fusionarse, lo que permite que sus citosoles y orgánulos se entremezclen. Algunas de las células fusionadas sufren división y sus núcleos suelen coalescer, lo que produce *células híbridas* con un único núcleo que contiene cromosomas de ambos "progenitores". La fusión de dos células que son genéticamente diferentes puede producir una célula híbrida con características nuevas. Por ejemplo, la fusión de una célula de mieloma con una célula normal productora de anticuerpos del bazo de una rata o ratón produce un híbrido que prolifera para dar un clon que se denomina un **hibridoma**. Al igual que las células de mieloma, las células de hibridoma proliferan rápidamente y son inmortales. Cada hibridoma produce el anticuerpo monoclonal codificado por su linfocito B progenitor.

El segundo paso en este procedimiento para la producción de anticuerpos monoclonales es separar, o seleccionar, las células de hibridoma de las células progenitoras no fusionadas y las células autofusionadas generadas por la reacción de fusión. Esta selección suele realizarse mediante incubación de la mezcla de células en un medio de cultivo especial, llamado *medio de selección*, que permite el crecimiento solo de las células de hibridoma debido a sus características nuevas. Las células de mieloma usadas para la fusión llevan una mutación que bloquea una vía metabólica, de manera tal que un medio de selección

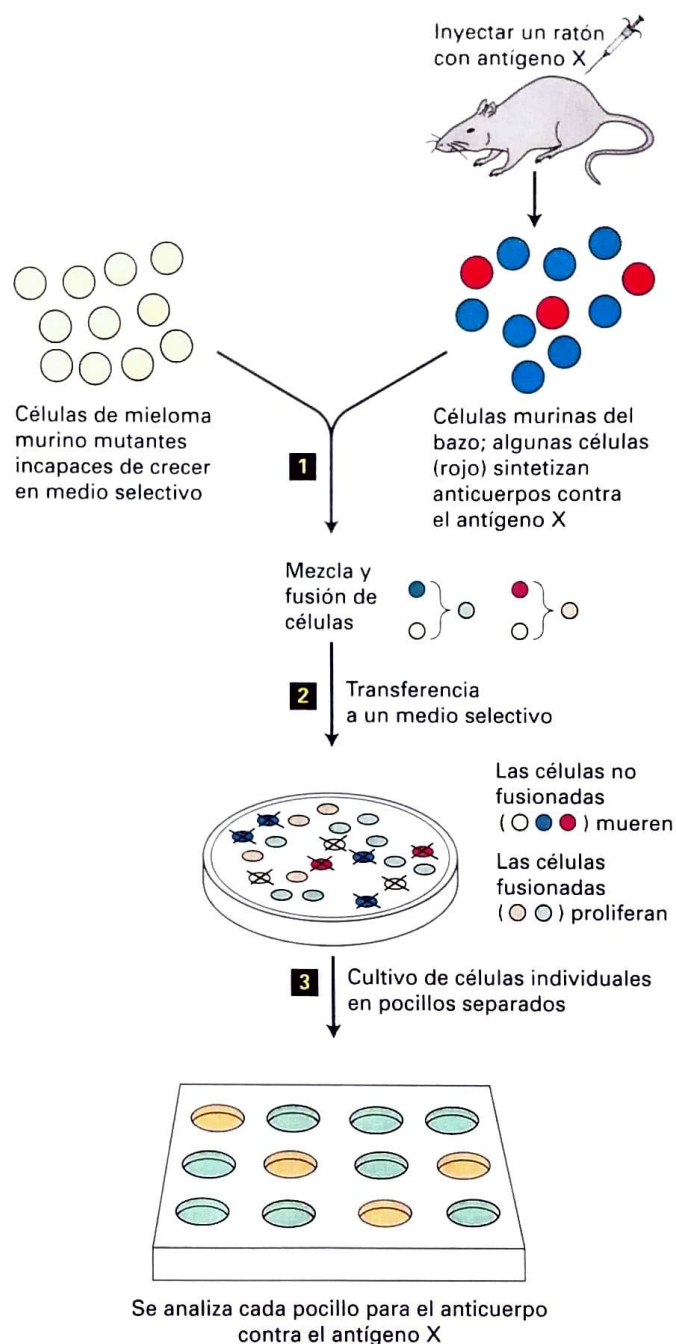


FIGURA 9-6 Uso de la fusión y selección de células para obtener hibridomas productores de anticuerpos monoclonales específicos contra una proteína. Paso 1: las células de mieloma inmortales que no pueden sintetizar purinas en condiciones especiales debido a que carecen de timidina-cinasa se fusionan con células del bazo productoras de anticuerpo normal de un animal que fue inmunizado con el antígeno X. Paso 2: cuando se cultivan en o sobre un medio selectivo especial, las células fusionadas y las no fusionadas no proliferan: las células de mieloma mutante no crecen debido a que el medio selectivo no contiene purinas y las células del bazo, debido a que tienen un tiempo de vida limitado en cultivo. Así, solo las células fusionadas formadas a partir de una célula de mieloma y una célula de bazo sobreviven en el medio especial, y proliferan para producir clones llamados hibridomas. Cada hibridoma produce un único anticuerpo. Paso 3: el análisis de los clones individuales identifica aquellos que reconocen al antígeno X. Después de que se ha identificado un hibridoma que produce el anticuerpo deseado, el clon se puede cultivar para obtener grandes cantidades del anticuerpo.

se puede usar para que sea letal para ellas y no los linfocitos de fusión que no tienen la mutación. En las células híbridas inmortales, el gen funcional del linfocito puede suministrar el producto génico ausente, y así las células de hibridoma serán capaces de crecer en el medio de selección. Debido a que los linfocitos usados en la fusión no están inmortalizados, solo proliferarán rápidamente las células de hibridoma en el medio de selección y por lo tanto se las puede aislar rápidamente de la mezcla inicial de células. Finalmente, cada clon de hibridoma seleccionado luego es evaluado para la producción del anticuerpo deseado; cualquier clon productor de ese anticuerpo luego es cultivado en cultivos grandes, a partir del cual se puede obtener una cantidad considerable de anticuerpo monoclonal.

Los anticuerpos monoclonales se han tornado unos reactivos valiosos como herramientas de investigación específica. Comúnmente se los utiliza en cromatografía de afinidad para aislar y purificar proteínas a partir de mezclas complejas (véase la Fig. 3-38c). Como se describirá más adelante en este capítulo, también se pueden utilizar en microscopia de inmunofluorescencia para unir y, por lo tanto, localizar una proteína particular dentro de las células. También se los puede utilizar para identificar proteínas específicas en fracciones celulares con el uso de inmunotransferencia (véase la Fig. 3-39). Los anticuerpos monoclonales se han convertido en herramientas de diagnóstico y tratamiento importantes en medicina; por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se unen e inactivan toxinas secretadas por patógenos bacterianos son utilizados para tratar enfermedades. Otros anticuerpos monoclonales son específicos para las proteínas de la superficie celular expresadas por ciertos tipos de células tumorales. Diversos de estos anticuerpos antitumorales son ampliamente usados en la terapia contra el cáncer, incluidos los anticuerpos monoclonales contra una forma mutante del receptor Her2 que se sobreexpresa en algunos cánceres de mama (véase la Fig. 16-7).

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 9.1

Crecimiento de células en cultivo

- Las células animales deben cultivarse en condiciones que imiten el ambiente natural, que en general requiere del aporte de aminoácidos y factores de crecimiento necesarios.
- La mayoría de las células animales necesitan adherirse a una superficie sólida para proliferar.
- Las células primarias, aquellas aisladas directamente a partir de tejido, tienen un tiempo de vida finito.
- Las células transformadas, al igual que aquellas que derivan de tumores, pueden crecer indefinidamente en cultivo.
- Las células que pueden crecer indefinidamente se denominan una línea celular.
- Muchas líneas celulares son aneuploides, tienen un número diferente de cromosomas que los animales progenitores de los cuales derivan.
- Diferentes células expresan distintas proteínas marcadoras sobre su superficie, las cuales pueden utilizarse para diferenciarlas.

• Utilizando anticuerpos fluorescentes contra las moléculas de la superficie celular, un aparato llamado clasificador de células activado por fluorescencia puede separar las células con diferentes marcadores de superficie.

• Para imitar el crecimiento en los tejidos, las células epiteliales suelen cultivarse en recipientes especiales que imitan su polaridad funcional. Las células también pueden cultivarse en matrices tridimensionales para reflejar con mayor precisión sus ambientes normales.

• Los anticuerpos monoclonales, reactivos que unen un epítipo sobre un antígeno, pueden ser secretados por células en cultivo llamadas hibridomas. Estas células híbridas se obtienen al fusionar una célula B productora de anticuerpo con una célula de mieloma inmortalizada y luego se identifican los clones productores del anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales son importantes para la investigación básica y como agentes terapéuticos.

9.2 Microscopia óptica: exploración de las estructuras celulares y visualización de las proteínas dentro de las células

La existencia de las bases celulares de la vida se apreció por primera vez usando los microscopios ópticos. Desde entonces, el progreso en la biología celular ha sido paralelo y a menudo impulsado por los avances tecnológicos en microscopia óptica (Fig. 9-7). Aquí analizaremos cada uno de estos principales desarrollos y cómo avanzó el estudio de los procesos celulares. Primero describiremos los usos básicos de un microscopio óptico para observar las células y estructuras sin tinción. Luego describiremos el desarrollo de la microscopia de fluorescencia y su uso para localizar proteínas específicas en células fijadas. Mediante el uso de técnicas de biología molecular para expresar una fusión entre una proteína de interés y una proteína naturalmente fluorescente, es posible rastrear la localización de proteínas específicas en las células vivas —una capacidad que reveló cómo es la dinámica de la organización de las células vivas—. En paralelo con estos avances en la preparación de especímenes, los avances ópticos posibilitaron amplificar y agudizar las imágenes proporcionadas por la microscopia de fluorescencia para revelar la estructura celular con una claridad sin precedentes. A partir de estos avances han surgido muchas tecnologías especializadas, y aquí se describirán algunas de las más importantes.

La resolución del microscopio óptico es de alrededor de 0,2 μm

Todos los microscopios producen una imagen aumentada de un objeto pequeño, pero la naturaleza de la imagen depende del tipo de microscopio empleado y de la forma en que se prepara la muestra. El microscopio compuesto, usado en la *microscopia óptica de campo claro*, contiene diversas lentes que amplifican la imagen de una muestra en estudio (Fig. 9-8a). La amplificación total es un producto del aumento de las lentes individuales: si la lente objetivo, la lente más cercana a la muestra, amplifica 100 veces (una lente $\times 100$, el máximo usado) y la *lente de proyección*, a veces llamada ocular, aumenta 10 veces, la amplificación total registrada por el ojo humano o una cámara será de 1 000 veces.

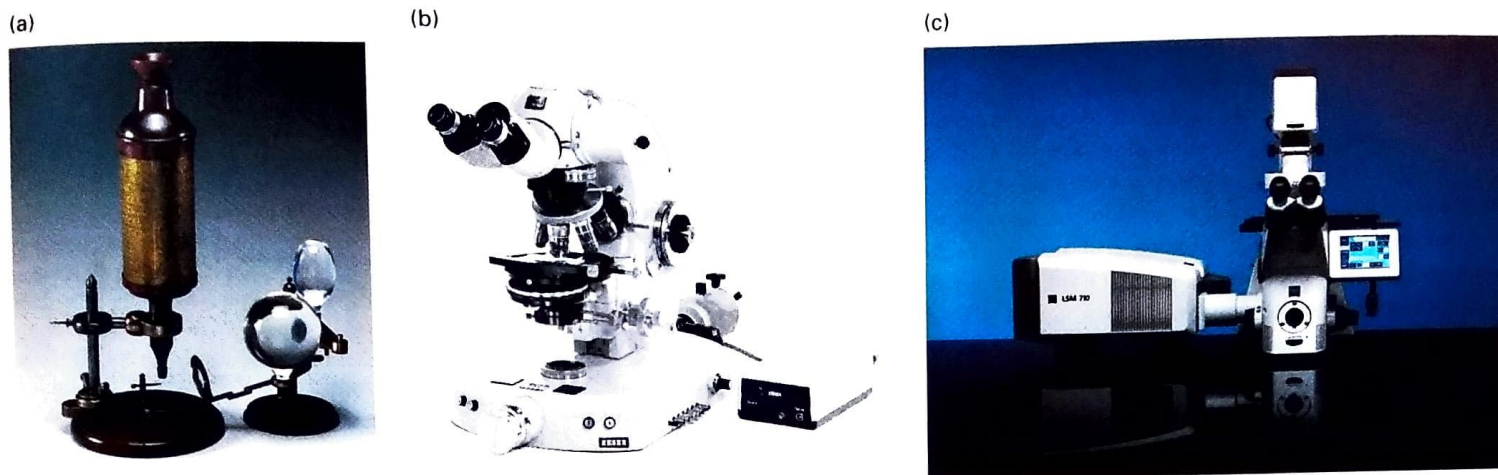


FIGURA 9-7 Desarrollo del microscopio óptico. (a) Los microscopios primitivos, como el que utilizaba Robert Hooke en la década de 1660, utilizaba lentes o un espejo para iluminar la muestra. (b) Los microscopios ópticos en general y los de luz en particular se desarrollaron enormemente durante el siglo xix, y a mediados del xx eran comunes los microscopios altamente

sofisticados limitados solo por la resolución de la luz. (c) En la segunda mitad del siglo veinte se desarrollaron las técnicas de microscopia de fluorescencia y de imagen digital junto con las técnicas confocales para obtener la versatilidad de los microscopios actuales. (Parte [a] SSPL a través de Getty Images; parte [b] cortesía de Carl Zeiss Archive; parte [c] Zeiss.com)

Sin embargo, la propiedad más importante de cualquier microscopio no es su aumento sino su poder de **resolución**, o resolución —la capacidad para distinguir entre dos objetos ubicados uno muy cerca del otro—. El mero aumento de la imagen de una muestra no lleva a nada si la imagen es borrosa. La resolución de una lente de microscopia es numéricamente equivalente a D , la distancia mínima entre dos objetos que permite distinguirlos como tales. Cuanto más pequeño es el valor de D , mejor es la resolución. El valor de D está dado por la ecuación

$$D = \frac{0,61\lambda}{N \sin \alpha} \quad (9-1)$$

donde α es la apertura angular, o la mitad del ángulo de apertura del cono de luz que entra en la lente objetivo desde la muestra (véase la Fig. 9-8a), N es el índice de refracción del medio entre la muestra y el objetivo (es decir, la velocidad relativa de luz en el medio en comparación con la velocidad en el aire), y λ es la longitud de onda de la luz incidente. La resolución se mejora mediante el uso de longitudes de onda de luz más cortas (al disminuir el valor de λ) o concentrando más luz (al incrementar N o α). Las lentes para la microscopia de alta resolución están diseñadas para funcionar con aceite entre la lente y la muestra ya que el aceite tiene un índice de refracción más elevado (1,56, en comparación con 1,0 para el aire y 1,3 para el agua). Para maximizar el ángulo α , y en consecuencia el $\sin \alpha$, las lentes también se diseñan para enfocar muy cerca del cubreobjetos delgado que cubre la muestra. El término $N \sin \alpha$ se conoce como *apertura numérica* (AN) y suele estar marcado en la lente objetivo. Una buena lente de alto aumento tiene una AN de alrededor de 1,4 y las mejores lentes un valor que se aproxima a los 1,7, y ¡cuesta tanto como un automóvil mediano! Nótese que el aumento no es parte de esta ecuación.

Debido a las limitaciones en los valores de α , λ y N sobre la base de las propiedades físicas de la luz, el **límite de resolución** de un microscopio óptico que utiliza luz visible es de alrededor de $0,2 \mu\text{m}$ (200 nm).

Sin importar cuántas veces se amplifique la imagen, un microscopio óptico convencional nunca puede resolver los objetos que están a menos de $\sim 0,2 \mu\text{m}$ de separación o mostrar detalles menores de $\sim 0,2 \mu\text{m}$ de tamaño. Sin embargo, algunas sofisticadas tecnologías nuevas se han diseñado para “superar” esta barrera de resolución y pueden resolver objetos de solo unos pocos nanómetros de separación; en la última sección analizaremos tal microscopio de superresolución.

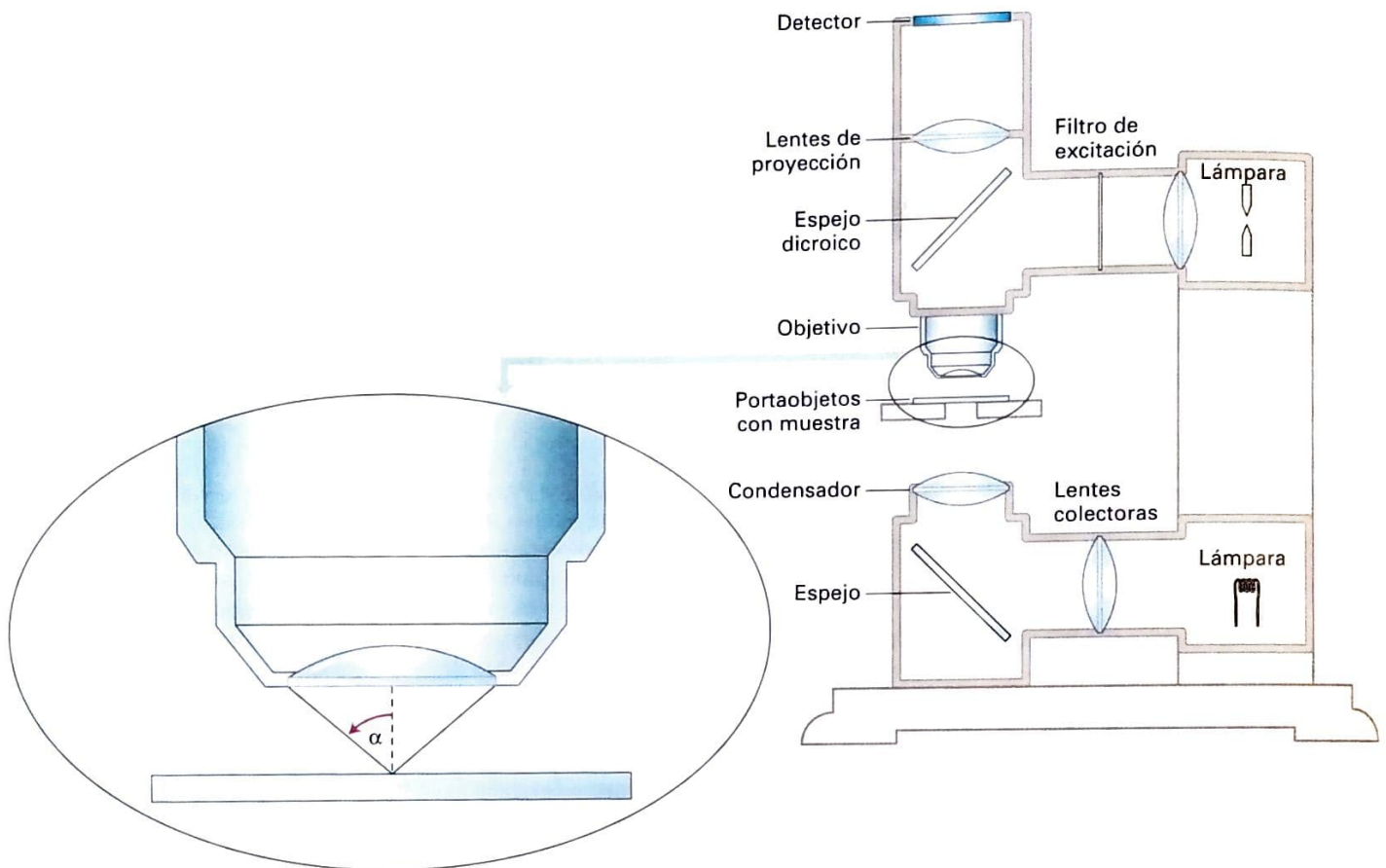
A pesar de esta falta de resolución, un microscopio convencional puede rastrear un solo objeto de hasta unos pocos nanómetros. Si conocemos el tamaño y la forma precisa de un objeto —es decir, una esfera de 5 nm de oro que está adherida a un anticuerpo a su vez unido a una proteína de la superficie celular sobre una célula viva— y si usamos una cámara para tomar múltiples imágenes digitales rápidamente, entonces una computadora puede calcular la posición promedio para revelar el centro del objeto de casi unos pocos nanómetros. De esta forma, los algoritmos informáticos se pueden usar para localizar los objetos únicos a un nivel más preciso —en este caso la localización y el movimiento con el tiempo de una proteína de superficie marcada con un anticuerpo marcado con oro— lo que sería posible solo sobre la base de la resolución del microscopio óptico. Esta técnica se ha utilizado para medir niveles del tamaño de nanómetros como moléculas y vesículas que se mueven a lo largo de los filamentos del citoesqueleto (véanse las Figs. 17-29 y 17-30).

La microscopia de contraste de fase y la de contraste de interferencia diferencial visualizan células no teñidas

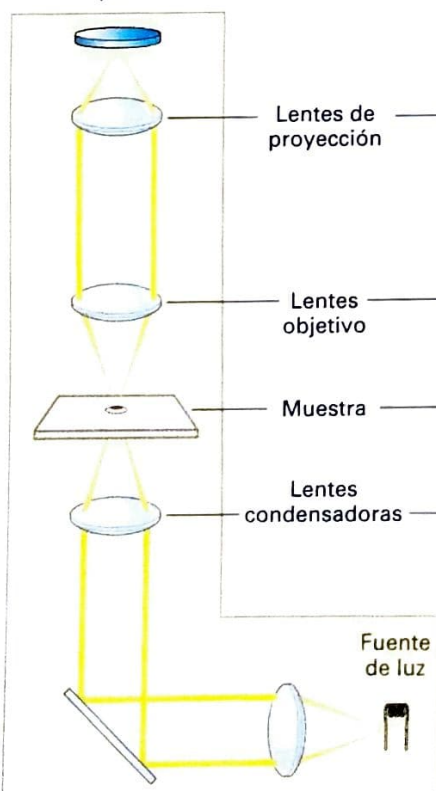
Las células constan de alrededor de un 70% de agua, 15% de proteína, 6% de RNA y cantidades más pequeñas de lípidos, DNA y moléculas pequeñas. Como ninguna de estas principales clases de moléculas está coloreada, se deben utilizar otros métodos para visualizar las células en un microscopio.

(a)

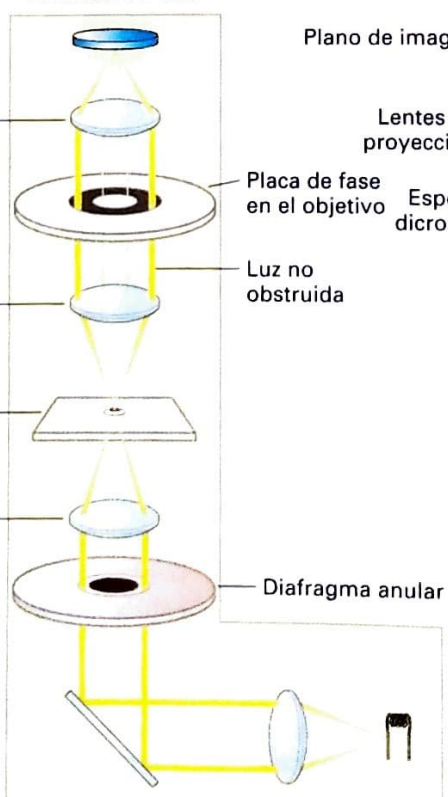
Microscopio óptico



(b)
Campo claro



(c)
Contraste de fase



(d)
Epifluorescencia

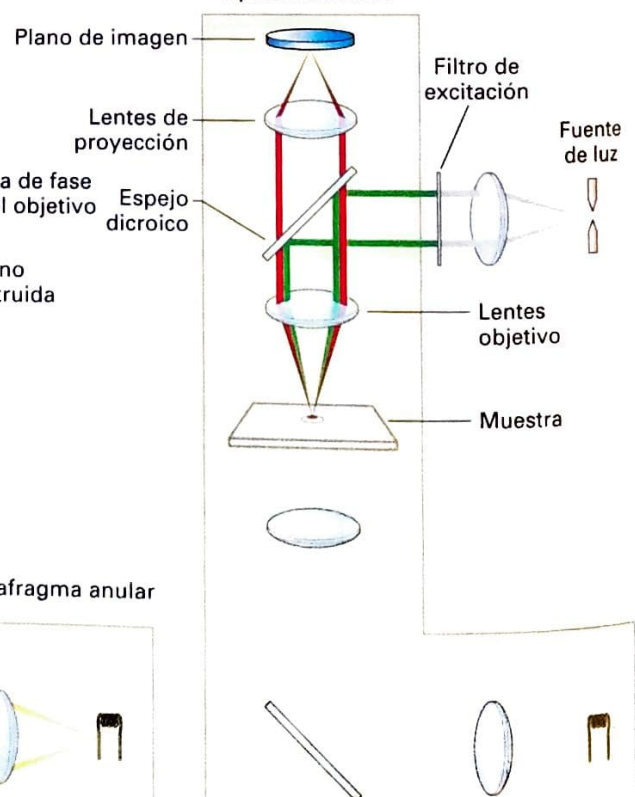


FIGURA 9-8 Los microscopios ópticos suelen estar configurados para microscopia de campo claro (transmisión), de contraste de fase y de epifluorescencia. (a) En un microscopio óptico típico, la muestra suele estar montada sobre un portaobjetos de vidrio transparente que se coloca sobre un soporte móvil. (b) En la microscopia óptica de campo claro, la luz de una lámpara de tungsteno se enfoca sobre la muestra mediante una lente condensadora por debajo de la muestra; la luz sigue la trayectoria mostrada en amarillo. (c) En la microscopia de contraste de fase, la luz incidente pasa a través de un diafragma anular, el cual enfoca un anillo de luz sobre la muestra. La luz que pasa sin ser obstruida a través de la muestra es enfocada por la lente objetivo sobre el anillo gris más grueso de la placa de fase, donde absorbe algo de la luz directa y altera su fase un cuarto de una longitud de onda. Si una muestra refracta (curva) o difracta la luz, se altera la fase de algunas ondas de luz (líneas verdes) y las ondas de luz pasan a través de la región clara de la placa de fase. La luz refractada y la no refractada se vuelven a combinar en el plano de la imagen para formar la imagen. (d) En la microscopia epifluorescente, un haz de luz procedente de una lámpara de mercurio (líneas verdes) es dirigida hacia el filtro de excitación que permite pasar solo la luz de longitud de onda correcta (líneas verdes). A continuación, la luz se refleja fuera de un filtro dicróico y a través del objetivo que la enfoca sobre la muestra. La luz fluorescente emitida por la muestra (líneas rojas) pasa a través del objetivo, luego a través del espejo dicróico y es enfocada y registrada sobre el detector en el plano de imagen.

El microscopio más simple visualiza las células bajo la óptica de *campo claro* (Fig. 9-8b) y se puede observar poco detalle (Fig. 9-9). Dos métodos comunes para tomar imágenes de células vivas y tejidos no teñidos para generar contraste se basan en las diferencias en los índices de refracción y el espesor de los materiales celulares. Estos métodos, denominados *microscopia de contraste de fase* y *microscopia de contraste por interferencia diferencial* (DIC, *differential-interference-contrast*) (o microscopio de interferencia de Nomarski) producen imágenes que difieren en apariencia y revelan diferentes características de la arquitectura celular. La Figura 9-9 compara imágenes de células cultivadas vivas obtenidas por estos dos métodos y por microscopia de campo claro estándar. Como los microscopios ópticos son costosos, a menudo se los monta para que lleven a cabo diferentes tipos de microscopia en el mismo microscopio (véase la Fig. 9-8a-d).

La microscopia de contraste de fase genera una imagen en la cual el grado de oscuridad o brillantez de una región de la muestra depende

del *índice de refracción* de la región. La luz se mueve más lentamente en un medio de índice de refracción más alto. Por lo tanto, un haz de luz es refractado (curvado) una vez que pasa desde un medio al interior de un objeto transparente y nuevamente cuando se aleja. En un microscopio de contraste de fase se genera un cono de luz por un diafragma anular en el condensador que ilumina a la muestra (véase la Fig. 9-8c). La luz pasa a través de la muestra al objetivo, y la luz directa sin obstrucción pasa a través de una región de la placa de fase que transmite solo un pequeño porcentaje de la luz a la vez que cambia su fase levemente. La parte de una onda de luz que pasa a través de la muestra será refractada y estará fuera de fase (fuera de sincronía) con la parte de la onda que no pasa a través de la muestra. Cuánto difieren sus fases depende de la diferencia en el índice de refracción a lo largo de dos trayectorias y del espesor de la muestra. La luz refractada y la no refractada se vuelven a combinar en el plano de imagen para formar la imagen. Si las dos partes de la onda de luz se vuelven a combinar, la luz resultante será más brillante si están en fase o menos brillante si están fuera de fase. La microscopia por contraste de fase es adecuada para la observación de células únicas o capas de células muy delgadas pero no para tejidos gruesos. En particular es útil para analizar la localización y el movimiento de orgánulos grandes en las células vivas.

La microscopia DIC se basa en la interferencia entre la luz polarizada y es el método de elección para detalles extremadamente pequeños y objetos gruesos. El contraste se genera por diferencias en el índice de refracción del objeto y el medio que lo rodea. En la imagen DIC, el objeto parece emitir una sombra sobre un lado. La “sombra” representa principalmente una diferencia en el índice de refracción de una muestra más que su topografía. La microscopia DIC define con facilidad los bordes de los orgánulos grandes, como el núcleo y las vacuolas. Además de tener un aspecto “relajado”, una imagen DIC es una *sección óptica* delgada, o lámina o loncha, a través del objeto (Fig. 9-9, *derecha*). Así, los detalles del núcleo en las muestras gruesas (p. ej., un gusano *Caenorhabditis elegans* intacto; véase la Fig. 21-31) se pueden observar en una serie de tales secciones ópticas, y la estructura tridimensional del objeto se puede reconstruir mediante combinación de las imágenes individuales de DIC.

Tanto la microscopia por contraste de fase como la DIC se pueden usar en *microscopia a intervalos de tiempo*, en la cual se fotografía la misma

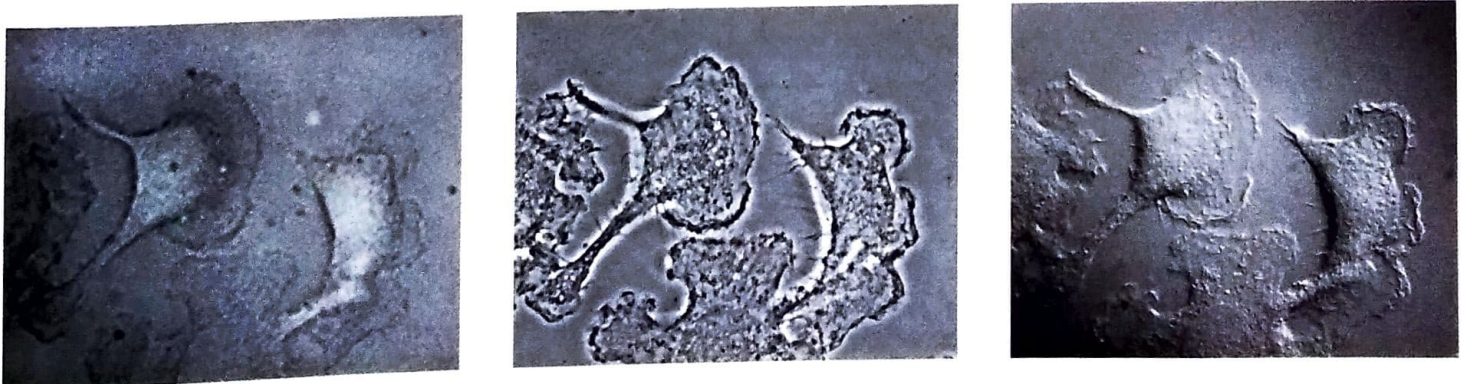


FIGURA 9-9 Las células vivas se pueden visualizar mediante técnicas de microscopia que generan contraste por interferencia. Estas microfotografías muestran células de macrófagos cultivadas, vivas, visualizadas mediante microscopia de campo claro (*izquierda*), microscopia por contraste de fase (*centro*) y microscopia de contraste por interferencia diferencial (DIC) (*derecha*). En la imagen por contraste de fase, las células están rodeadas por bandas claras

y oscuras alternadas; los detalles en foco y fuera de foco son proyectados de forma simultánea en un microscopio de contraste de fase. En una imagen por DIC, las células aparecen en unseudorrelieve. Debido a que solo se captura la imagen de una región fina en foco, una imagen DIC es una loncha óptica a través del objeto. (Cortesía de N. Watson y J. Evans.)

célula a intervalos regulares de tiempo para generar una película. Este procedimiento permite al observador estudiar el movimiento celular, lo que permite el control de la temperatura de la muestra y el ambiente adecuado.

Las muestras se deben fijar, seccionar y teñir para obtener imágenes con detalles subcelulares

Las células vivas y los tejidos en general carecen de compuestos que absorban la luz y por lo tanto son invisibles en un microscopio óptico. A pesar de que tales muestras se pueden visualizar mediante técnicas especiales recientemente descritas, estos métodos no revelan los detalles finos de la estructura.

Las muestras para la microscopia electrónica y óptica suelen fijarse con una solución que contiene químicos que forman enlaces cruzados entre la mayoría de las proteínas y los ácidos nucleicos. El formaldehído, un fijador común, entrecruza los grupos amino con moléculas adyacentes; estos enlaces covalentes estabilizan las interacciones proteína-proteína y proteína-ácido nucleico y tornan insolubles y estables a las moléculas para posteriores procedimientos. Después de la fijación, una muestra de tejido para el examen por microscopia óptica se embebe en parafina y se la corta en secciones de alrededor de 50 μm de espesor (Fig. 9-10a). Las células cultivadas que crecen sobre cubreobjetos de vidrio, como se describió antes, son lo suficientemente delgadas como para que puedan ser fijadas in situ y visualizarse por microscopia óptica sin la necesidad de seccionarlas.

Un paso final en la preparación de una muestra para microscopia óptica es teñirlas para visualizar las características principales de la célula o el tejido. Muchos colorantes químicos se unen a las moléculas que tienen características específicas. Por ejemplo, las muestras histológicas suelen teñirse con *hematoxilina* y *eosina* ("tinción H&E"). La

hematoxilina se une a los aminoácidos básicos (lisina y arginina) en muchas clases diferentes de proteínas, mientras que la eosina se une a las moléculas de tipo ácido (como el DNA y las cadenas laterales de aspartato y glutamato). Debido a sus diferentes propiedades de unión, estos colorantes tiñen diversos tipos de células con suficiente diferencia para distinguirlas visualmente (Fig. 9-10b). Si una enzima cataliza una reacción que produce un precipitado coloreado o de alguna manera visible a partir de un precursor incoloro, la enzima se puede detectar en secciones celulares mediante sus productos de reacción coloreados. Tales técnicas de tinción, aunque alguna vez fueron bastante comunes, han sido reemplazadas en gran medida por otras técnicas para visualizar proteínas particulares, como se describe a continuación.

La microscopia de fluorescencia puede localizar y cuantificar moléculas específicas en las células vivas

Tal vez la técnica más versátil y poderosa para localizar moléculas dentro de una célula mediante microscopia óptica es la **tinción fluorescente** de células mediante *microscopia de fluorescencia*. Se dice que un químico es fluorescente si absorbe luz a una longitud de onda (la longitud de onda de excitación) y emite luz (fluoresce) a una longitud de onda específica y más larga. Los microscopios modernos para la observación de muestras fluorescentes están configurados para pasar la luz de excitación a través del objetivo a una muestra y luego se observa selectivamente la luz fluorescente emitida que regresa a través del objetivo desde la muestra. Esto se logra mediante reflexión de la luz de excitación sobre un tipo especial de filtro denominado espejo dicroico dentro de la muestra, lo que permite que la luz emitida a la longitud de onda más larga llegue hasta el observador (véase la Fig. 9-8d).

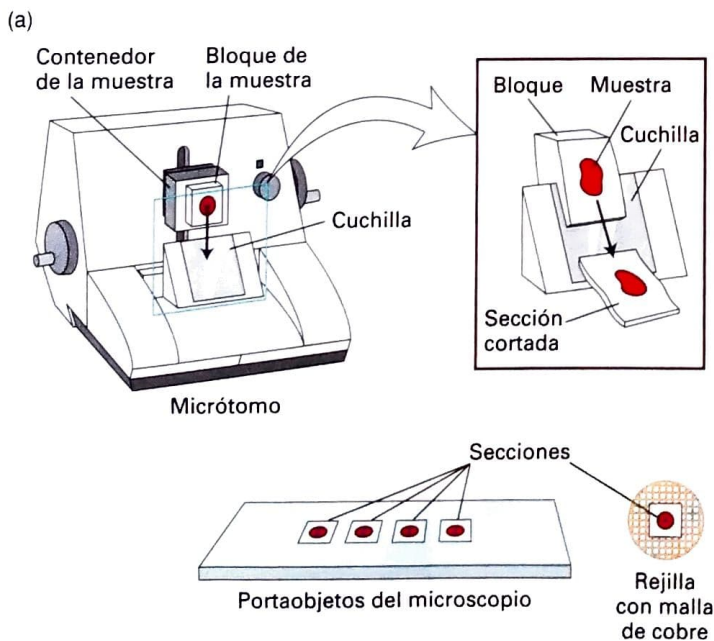


FIGURA 9-10 Los tejidos para la microscopia óptica en general se fijan, se embeben en un medio sólido y se cortan en secciones delgadas. (a)

Un tejido fijado es deshidratado al sumergirlo en una serie de soluciones de agua y alcohol, finalizando con un solvente orgánico compatible con el medio en el cual está embebido. Para incluir el tejido para su posterior seccionamiento, el tejido se coloca en parafina líquida para microscopia óptica. Después de

que el bloque que contiene la muestra ha solidificado, se lo coloca sobre el soporte de un micrótopo y se cortan láminas con una cuchilla. Los cortes de las secciones típicas para microscopia óptica son de 0,5 a 50 μm de espesor. Las secciones se colocan sobre portaobjetos o rejillas y se tiñen con un reactivo adecuado. (b) Una sección de intestino murino teñido con H&E. (Parte [b] © Dr. Gladden Willis/Visuals Unlimited/Corbis.)

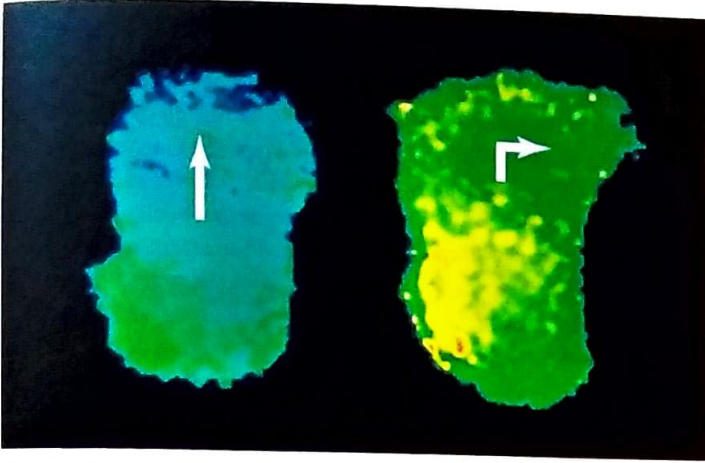


FIGURA EXPERIMENTAL 9-11 Fura-2, un fluorocromo sensible al Ca^{2+} , se puede utilizar para controlar las concentraciones relativas del Ca^{2+} citosólico en diferentes regiones de las células vivas. (Izquierda) En un leucocito en movimiento se establece un gradiente de Ca^{2+} . Las concentraciones más elevadas (verde) están en la parte posterior de la célula, donde se producen las contracciones corticales, y las concentraciones más bajas (azul) están en la parte delantera de la célula, donde se produce la polimerización de la actina. (Derecha) Cuando una pipeta llena con moléculas quimiotácticas se coloca al lado de la célula, se induce a ésta a girar, la concentración de Ca^{2+} aumenta momentáneamente en todo el citoplasma y se establece un nuevo gradiente. El gradiente está orientado de manera tal que la región con menor concentración de Ca^{2+} (azul) se encuentre en la dirección en que la célula girará, mientras que una región de mayor Ca^{2+} (amarillo) siempre se forma en el sitio que se convertirá en la parte posterior de la célula. (De F. A. Brundage y cols., 1991, *Science* **254**:703, cortesía de F. Fay.)

rápidamente en la fracción de fura-2 que tiene un ion Ca^{2+} unido y, por lo tanto, en la concentración de Ca^{2+} citosólico (Fig. 9-11).

Los colorantes fluorescentes (p. ej., SNARF-1) que son sensibles a la concentración de H^+ pueden ser usados de modo similar para controlar el pH citosólico de las células vivas. Otras sondas útiles consisten en un fluorocromo unido a una base débil que está solo parcialmente protonado a pH neutro y que puede permear libremente las membranas celulares. Sin embargo, en orgánulos de tipo ácido, estas sondas se tornan protonadas; debido a que estas sondas protonadas no pueden volver a cruzar la membrana de los orgánulos, se acumulan en el lumen a concentraciones mucho mayores que en el citosol. Así, este tipo de colorante fluorescente puede ser usado para teñir específicamente mitocondrias y lisosomas en las células vivas (Fig. 9-12).

La microscopia de inmunofluorescencia puede detectar proteínas específicas en células fijadas

Los colorantes químicos comunes mencionados anteriormente tiñen ácidos nucleicos o clases amplias de proteínas, pero es mucho más informativo detectar la presencia y localización de proteínas específicas. La *microscopia de inmunofluorescencia* es el método más ampliamente utilizado para detectar proteínas específicas con un anticuerpo al cual se ha unido covalentemente un colorante fluorescente. Para realizar esto, usted necesita primero generar anticuerpos contra su proteína específica. Como se analiza brevemente en la Sección 9.1 y en detalle en el Capítulo 23, como parte de la respuesta a la infección del sistema inmunitario de vertebrados se generan proteínas llamadas anticuerpos que se unen específicamente al agente

Determinación de las concentraciones de Ca^{2+} e H^+ intracelulares con colorantes fluorescentes sensibles a los iones

La concentración de Ca^{2+} o H^+ dentro de las células vivas puede ser medida con la ayuda de colorantes fluorescentes, o *fluorocromos*, cuya fluorescencia depende de la concentración de estos iones. Como se analiza en los últimos capítulos, las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} e H^+ tienen efectos pronunciados en muchos procesos celulares. Por ejemplo, muchas hormonas y otros estímulos causan una elevación en el Ca^{2+} citosólico a partir de las concentraciones en reposo desde alrededor de 10^{-7} M hasta 10^{-6} M, lo cual induce diversas respuestas celulares como la contracción muscular.

El colorante fluorescente *fura-2*, que es sensible al Ca^{2+} , contiene cinco grupos carboxilatos que forman uniones ésteres con el etanol. El éster fura-2 resultante es lipófilo y puede difundirse desde el medio a través de la membrana plasmática hacia el interior de las células. Dentro del citosol, las esterasas hidrolizan el éster fura-2 y producen fura-2, cuyos grupos carboxilatos libres tornan no lipofila a la molécula y, por lo tanto, es incapaz de cruzar las membranas celulares, por ende, permanecen en el citosol. En el interior de las células, cada molécula de fura-2 puede unir un único ion de Ca^{2+} pero no otros cationes celulares. Esta unión, que es proporcional a la concentración de Ca^{2+} citosólico en un cierto rango, incrementa la fluorescencia de fura-2 a una longitud de onda particular. A una segunda longitud de onda, la fluorescencia de fura-2 es la misma que si estuviera unido al Ca^{2+} y aporta una medida de la cantidad total de fura-2 en una región de la célula. Al examinar las células continuamente en el microscopio de fluorescencia y medir los cambios rápidos en la relación de la fluorescencia de fura-2 a estas dos longitudes de onda, se pueden cuantificar los cambios

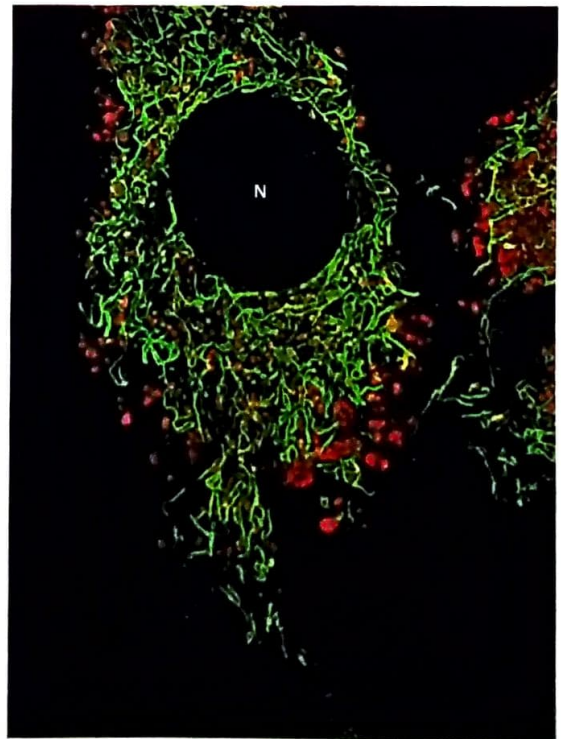


FIGURA EXPERIMENTAL 9-12 Localización de los lisosomas y las mitocondrias en una célula endotelial de arteria pulmonar bovina viva, cultivada. La célula se teñió con un colorante verde fluorescente que se une específicamente a las mitocondrias y un colorante rojo fluorescente que se incorpora específicamente a los lisosomas. La imagen se resolvió usando un programa de computador de deconvolución, que se analiza más adelante en el capítulo 11. (Núcleo, 11 micrómetros; longitud de onda, 488 nm.)

infeccioso. Los biólogos celulares han utilizado la respuesta inmunológica para generar anticuerpos contra proteínas específicas. Considere que usted ha purificado la proteína X y luego la inyecta en un animal experimental de manera tal que responde a la proteína como una molécula extraña. Durante un período de semanas, el animal montará una respuesta inmunitaria y sintetizará anticuerpos contra la proteína X (el “antígeno”). Si usted recolecta la sangre del animal, tendrá anticuerpos contra la proteína X mezclados con los anticuerpos contra muchos otros diferentes antígenos, junto con todas las otras proteínas. Ahora usted puede unir covalentemente la proteína X a una resina y, usando cromatografía de afinidad, unir y retener selectivamente solo aquellos anticuerpos específicos contra la proteína X. Los anticuerpos se pueden eluir desde la resina, y ahora usted tiene un reactivo que se une específicamente a la proteína X. Este enfoque genera *anticuerpos policlonales* puesto que muchas células diferentes en el animal han contribuido a los anticuerpos. Alternativamente, como se describió al comienzo de este capítulo, es posible generar una línea celular clonal que secreta anticuerpos contra un epítipo específico sobre la proteína X; estos se denominan *anticuerpos monoclonales*.

Para usar cualquier tipo de anticuerpo para localizar la proteína, las células o los tejidos primero se deben fijar para asegurar que todos los componentes permanezcan en el lugar y la célula permeabilizada le permita la entrada al anticuerpo, por lo general se realiza mediante incubación de las células con un detergente no iónico o extrayendo los lípidos con un solvente orgánico. En una versión de la microscopia de inmunofluorescencia, el anticuerpo se une covalentemente a un fluorocromo. En general los fluorocromos que se utilizan incluyen rodamina y rojo Texas, que emite luz roja; Cy3, que emite luz anaranjada, y fluoresceína,

que emite luz verde. Cuando un complejo fluorocromo-anticuerpo se añade a una célula permeabilizada o sección de tejido, el complejo se unirá al antígeno correspondiente, luego se hará visible cuando sea iluminado por la longitud de onda excitatoria. La tinción de una muestra con diferentes colorantes que fluorescen a diferentes longitudes de onda permite a múltiples proteínas, como también al DNA, ser localizados dentro de la misma célula (véase la figura de apertura del capítulo).

La variación más comúnmente utilizada de esta técnica se denomina *microscopia de inmunofluorescencia indirecta* puesto que el anticuerpo específico se detecta indirectamente. En esta técnica, un anticuerpo monoclonal o policlonal se aplica a las células o a la sección de tejido fijada, seguido por un segundo anticuerpo marcado con fluorocromo que se une al segmento constante (Fc) del primero anticuerpo. Por ejemplo, se puede generar un “segundo” anticuerpo por inmunización de una cabra con el segmento Fc que es común con todos los anticuerpos IgG de conejo; cuando estaba acoplada a un fluorocromo, esta segunda preparación de anticuerpo (denominada “anticuerpo de cabra anti-conejo”) detectará cualquier anticuerpo de conejo usado para teñir el tejido o célula (Fig. 9-13). Debido a que diversas moléculas de anticuerpo de cabra anti-conejo pueden unirse a una única molécula de anticuerpo de conejo en una sección, la fluorescencia suele ser mucho más brillante que si se usa directamente un único anticuerpo con fluorocromo acoplado. Esta técnica suele ampliarse para realizar *microscopia de fluorescencia doblemente marcada*, en la cual se pueden visualizar dos proteínas simultáneas. Por ejemplo, ambas proteínas se pueden visualizar por microscopia de inmunofluorescencia indirecta usando primero anticuerpos sintetizados en diferentes animales (p. ej., conejo y pollo) y el segundo anticuerpo

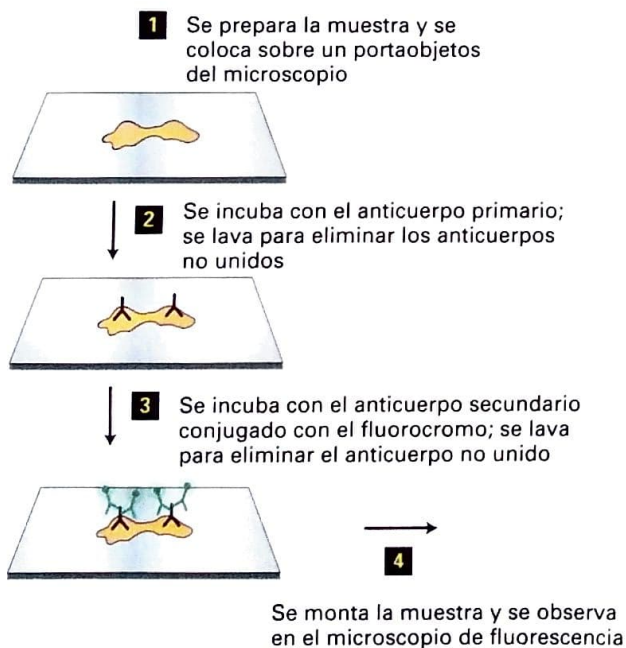
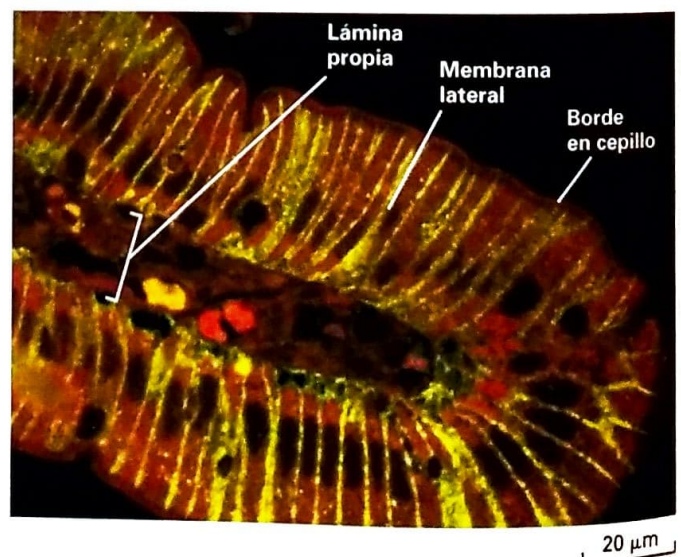


FIGURA 9-13 Una proteína específica se puede localizar en secciones de tejido fijadas por microscopia de inmunofluorescencia indirecta. Para localizar una proteína por microscopia de inmunofluorescencia, una sección de tejido, o muestra de células, tiene que fijarse químicamente y tornar permeable a los anticuerpos (paso **1**). La muestra luego se incuba con un anticuerpo primario que se une específicamente al antígeno de interés y luego el anticuerpo no unido se elimina por lavados (paso **2**). La muestra a continuación se incuba con un anticuerpo secundario marcado con fluorocromo que se une específicamente al anticuerpo primario, y nuevamente el exceso de anticuerpo secundario se elimina por lavados (paso **3**). Luego la muestra se monta en un medio



especializado y analizada en un microscopio de inmunofluorescencia (paso **4**). En este ejemplo, se tiñó una sección de pared intestinal de rata con azul de Evans, la cual genera una fluorescencia roja no específica, y GLUT2, una proteína transportadora de glucosa, se localizó por microscopia de inmunofluorescencia indirecta. Se observa que GLUT2 está presente en la región lateral y basal de las células intestinales, pero está ausente en el borde en cepillo, compuesto por microvellosidades estrechamente empaquetadas sobre la superficie apical orientada hacia el lumen. Los capilares se extienden a través de la lámina propia, un tejido conectivo laxo ubicado por debajo de la capa epitelial. (B. Thorens y cols. 1990, *Am. J. Physiol.* **259**:C279, cortesía de B. Thorens.)

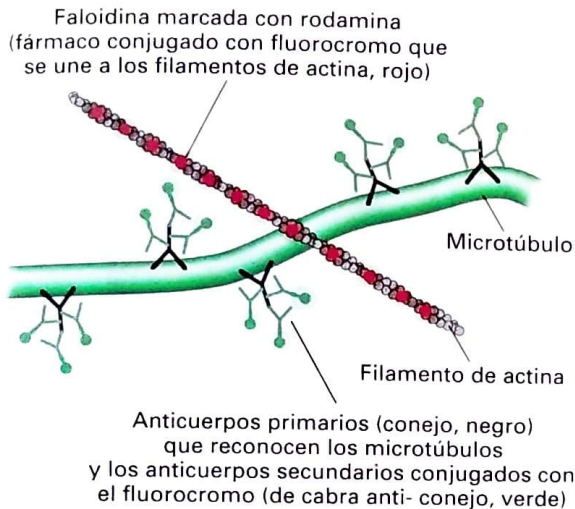
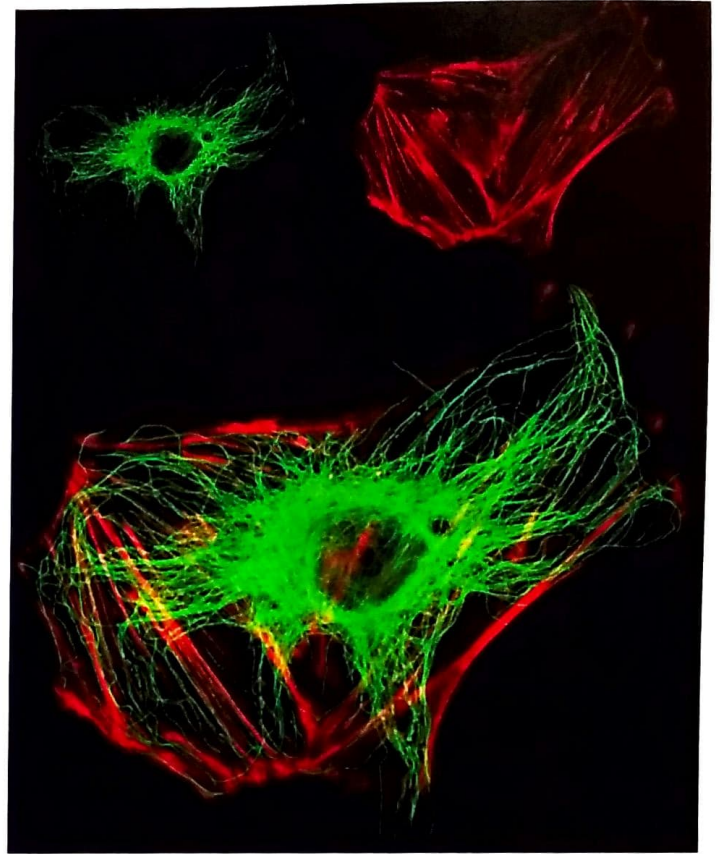


FIGURA EXPERIMENTAL 9-14 La microscopía de fluorescencia doblemente marcada puede visualizar las distribuciones relativas de dos proteínas. En la microscopía de fluorescencia doblemente marcada, cada proteína tiene que ser marcada específicamente con diferentes fluorocromos. El diagrama a la izquierda muestra cómo se puede realizar esto: una célula cultivada se fijó y permeabilizó y luego incubó con faloidina marcada con rodamina, un reactivo que se une específicamente a los filamentos de actina. También se incubó con anticuerpos de conejo contra tubulina, el principal componente de los microtúbulos, seguido por un segundo anticuerpo de cabra anticonejo marcado con fluoresceína (izquierda) y actina teñida con rodamina (derecha) y en el panel inferior se visualizan imágenes fusionadas electrónicamente. (Parte [derecha] cortesía de A. Bretscher)



(p. ej., anticonejo en cabra y antipollo en oveja) marcado con diferentes fluorocromos. En otra variación se puede visualizar una proteína por microscopía de inmunofluorescencia indirecta y la segunda proteína mediante un colorante que se une específicamente a él. Una vez que se toman las imágenes individuales en el microscopio de fluorescencia, se pueden generar sus imágenes electrónicamente (Fig. 9-14).

En otra versión de esta tecnología ampliamente utilizada se emplean técnicas de biología molecular para sintetizar cDNA que codifica una proteína recombinante a la cual está fusionada una secuencia corta de aminoácidos llamada *marcación con epítipo*. Cuando este cDNA se exprese en las células generará la proteína unida a una marca específica. Dos epítipos que suelen utilizarse son FLAG, que codifica la secuencia aminoacídica DYKDDDDK (código de una letra), y myc, que codifica la secuencia EQKLISEEDL. Los anticuerpos monoclonales acoplados con fluorocromos a los epítipos FLAG o myc comerciales se pueden usar para detectar la proteína recombinante en la célula. En una extensión de esta tecnología para permitir la visualización de dos proteínas, una proteína se puede marcar con FLAG y otra proteína diferente con myc. Cada proteína marcada luego es visualizada con un color diferente, por ejemplo, con un anticuerpo marcado con rodamina para el epítipo myc y un anticuerpo marcado con fluoresceína para el epítipo FLAG.

La marcación con proteínas fluorescentes permite la visualización de proteínas específicas en células vivas

La medusa *Aequorea victoria* expresa una proteína fluorescente natural, llamada *proteína fluorescente verde* (PFV, ~27 kD). La PFV contiene una secuencia de serina, tirosina y glicina cuyas cadenas laterales espontá-

neamente se ciclan para formar un cromóforo que fluoresce en verde cuando se lo ilumina con luz azul. Usando tecnologías de DNA recombinante es posible construir un DNA en el cual la secuencia codificada de PFV esté fusionada a la secuencia codificante de una proteína de interés. Cuando se la introduce y se expresa en las células, se sintetiza una PFV "marcada" en la cual la proteína de interés está unida en forma covalente a la PFV como parte del mismo polipéptido. Aunque la PFV es una proteína de tamaño moderado, la función de la proteína de interés no suele cambiar al ser fusionada a la PFV. Esto permite visualizar a la PFV y, en consecuencia, la proteína de interés. No solo se puede visualizar de inmediato la localización de la proteína marcada con PFV, sino que se puede ver su distribución en una célula viva con el transcurso del tiempo y, por lo tanto, analizar su dinámica o seguir su localización después de diversos tratamientos celulares. La simple idea de marcar proteínas específicas con PFV ha revolucionado la biología celular y llevó al desarrollo de muchas proteínas fluorescentes diferentes (Fig. 9-15). Un uso de esta variedad colorida de proteínas fluorescentes permite que se puedan visualizar dos o más proteínas de manera simultánea si cada una es marcada con una proteína fluorescente de diferente color. En las últimas secciones se describirán técnicas adicionales que aprovechan el uso de las proteínas fluorescentes.

La microscopía confocal y de desconvolución amplifica la visualización de objetos fluorescentes tridimensionales

La microscopía fluorescente convencional tiene dos principales limitaciones. Primero, la luz fluorescente emitida por una muestra no solo proviene del plano de foco sino también de las moléculas por encima y

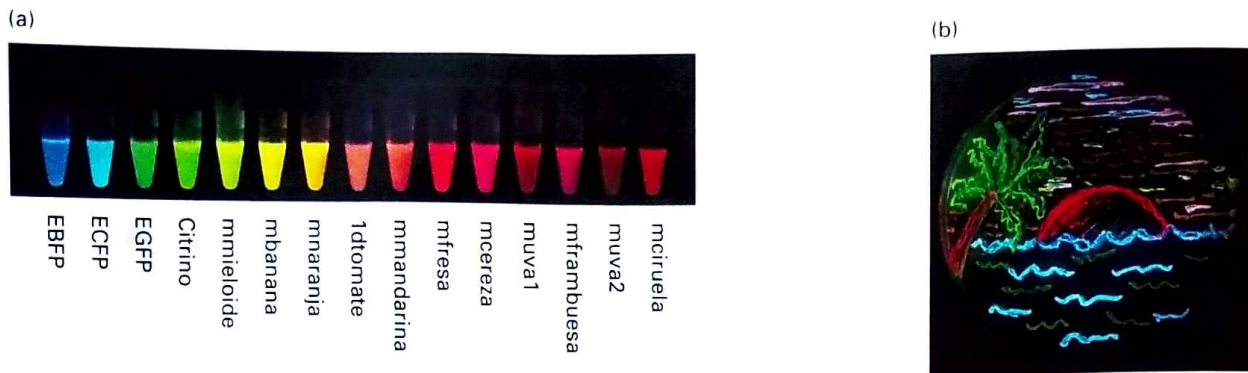


FIGURA 9-15 En la actualidad se dispone de muchos colores diferentes de proteínas fluorescentes. (a) Los tubos muestran la emisión de colores y nombres de muchas proteínas fluorescentes diferentes, y (b) se ilumina una

placa de agar para mostrar las bacterias que proliferan y expresan diversas proteínas con colores fluorescentes diferentes. (R. Tsien)

por debajo de él; así, el observador ve una imagen borrosa causada por la superposición de imágenes fluorescentes de las moléculas a muchas profundidades en la célula. El efecto difuminado torna dificultosa la determinación de las disposiciones moleculares reales. Segundo, para visualizar muestras de mayor espesor se deben obtener imágenes consecutivas (seriadas) a diversas profundidades a través de la muestra y luego alinearlas para reconstruir estructuras en el tejido grueso original. Se han desarrollado dos técnicas generales para obtener informa-

ción tridimensional de alta resolución. Ambos métodos requieren que la imagen sea obtenida electrónicamente de manera tal que se la pueda manipular mediante ordenador en la medida de lo necesario.

La primera técnica se denomina *microscopía de desconvolución*, que utiliza métodos computarizados para eliminar la fluorescencia aportada por las partes fuera de foco de la muestra. Considere una muestra tridimensional en la cual se registran imágenes de tres planos focales diferentes. Debido a que se ilumina la muestra entera, la imagen del

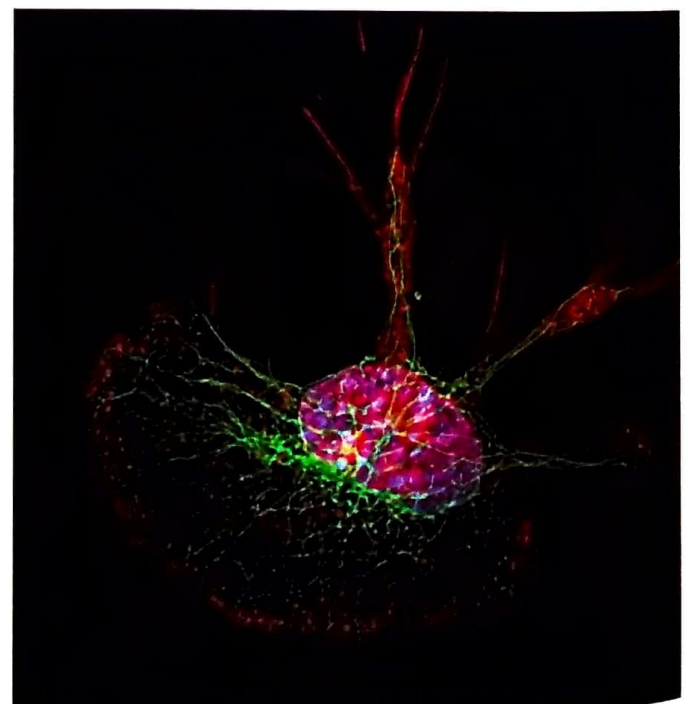


FIGURA EXPERIMENTAL 9-16 La microscopía de fluorescencia por desconvolución produce secciones ópticas de alta resolución que pueden ser reconstruidas en una imagen tridimensional. Un macrófago se tiñó con reactivos marcados con fluorocromo específicos para DNA (azul), microtúbulos (verde) y microfilamentos de actina (rojo). Las series de imágenes fluorescentes obtenidas en planos focales consecutivos (secciones ópticas) a lo

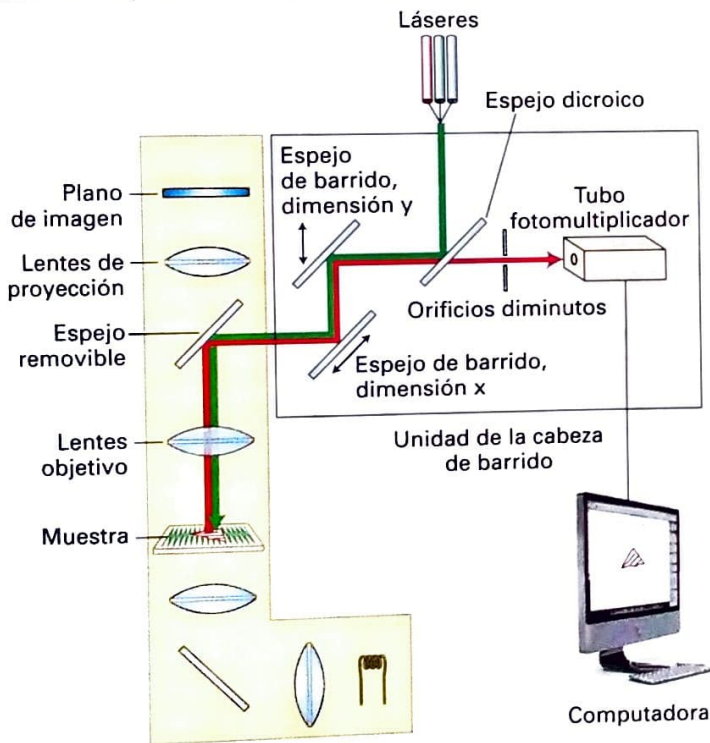
largo de toda la célula se recombinaron en tres dimensiones. (a) En esta reconstrucción tridimensional de las imágenes en bruto, el DNA, los microtúbulos y la actina aparecen como zonas difusas en la célula. (b) Después de la aplicación del algoritmo de desconvolución a las imágenes, se tornó rápidamente visible la organización fibrilar de los microtúbulos y la localización de la actina en las adhesiones. (Cortesía de J. Evans, Whitehead Institute.)

plano 2 contendrá fluorescencia fuera de foco de los planos 1 y 3. Si se conoce con exactitud cómo los planos 1 y 3 contribuyen con la fluorescencia fuera de foco a la luz recolectada por el plano 2, se la podría eliminar mediante técnicas informáticas. Para obtener esta información para un microscopio particular se obtiene una serie de imágenes de los planos focales a partir de un portaobjetos de prueba que contiene diminutas esferas fluorescentes. Cada esfera representa un puntito de luz que se torna un objeto borroso fuera de su plano focal; a partir de estas imágenes se determina una *función de dispersión puntual* que le permite al investigador calcular la distribución de fuentes puntuales de fluorescencia que contribuyen al “desenfoque borroso”. Al tener el microscopio calibrado de esta manera, la serie experimental de imágenes se puede desconvolucionar por técnicas informáticas. Las imágenes restauradas por desconvolución muestran un detalle impresionante sin borrosidad, como se ilustra en la Figura 9-16.

La segunda técnica para obtener información tridimensional se denomina *microscopia confocal* debido a que usa métodos ópticos para obtener imágenes de un plano focal específico y excluir la luz de otros planos. Al recolectar una serie de imágenes enfocadas a través

de la profundidad vertical de la muestra, se puede generar una representación tridimensional por computación. En la actualidad se utilizan dos tipos de microscopios confocales, un microscopio confocal de *barrido* (también conocido como microscopio confocal de escáner con láser, o LSCM [*laser-scanning confocal microscope*]) y un microscopio confocal de *disco giratorio*. La idea detrás de cada microscopio es la de iluminar y recolectar la luz fluorescente emitida en solo una zona del plano focal en cada momento, de tal forma que se excluya la luz fuera de foco. Esto se puede lograr al recolectar la luz emitida a través de un colimador antes de que alcance el detector—luz del plano focal que pasa a través, mientras que la luz de los otros planos focales se excluye en gran medida—. La zona iluminada luego es movida a través del plano focal para construir la imagen electrónicamente. Los dos tipos de microscopio difieren en cómo recorren la imagen. El microscopio de barrido con láser usa una fuente de luz láser puntual en un patrón de barrido, con la fluorescencia emitida recolectada por un tubo fotomultiplicador y, por lo tanto, se construye una imagen (Fig. 9-17a). A continuación, se puede tomar una serie de imágenes a diferentes profundidades en la muestra para generar una recons-

(a) Microscopio confocal de barrido láser



(b) Microscopio confocal de disco giratorio

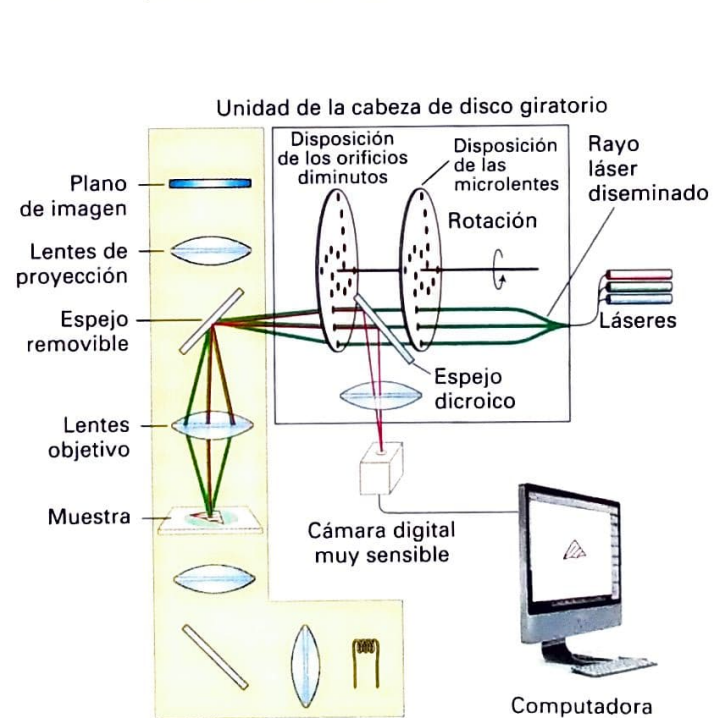


FIGURA 9-17 Las trayectorias de la luz para dos tipos de microscopia confocal. Ambos tipos de microscopia se ensamblan alrededor de un microscopio de fluorescencia convencional (sombreado amarillo). El diagrama en (a) describe el recorrido de la luz en un microscopio confocal de barrido con láser. Un único punto de longitud de onda de la luz de un láser apropiado es reflejado fuera del espejo dicroico y rebota en dos espejos de barrido. Los espejos de allí a través del objetivo para iluminar un punto en la muestra. Los espejos de barrido se balancean hacia atrás y hacia adelante (tal como la luz barre barrido se balancean hacia atrás y hacia adelante en la muestra). La fluorescencia emitida por la muestra (véanse las líneas verdes en la muestra). La fluorescencia emitida por la muestra pasa de regreso a través del objetivo y rebota en los espejos por la muestra pasa de regreso a través del objetivo y rebota en los espejos de barrido sobre el espejo dicroico. Esto permite que la luz pase a través hacia la rendija. Esta rendija excluye la luz de los planos focales fuera de foco, por lo tanto la luz que alcanza el fotomultiplicador proviene casi exclusivamente del

punto iluminado en el plano focal. Una computadora luego incorpora estas señales y reconstruye la imagen. El diagrama en (b) describe el recorrido de la luz en un microscopio confocal de disco giratorio. Aquí, en lugar de utilizar dos espejos de barrido, el haz proveniente del láser es diseminado para enfocar sobre los orificios diminutos en un disco giratorio. La luz de excitación pasa a través del objetivo y proporciona iluminación puntual de una cierta cantidad de puntos en la muestra. La fluorescencia emitida pasa a través del objetivo, a través de los orificios en el disco giratorio y luego rebota en una cámara digital sensible. Los orificios diminutos en el disco están dispuestos de tal manera que, a medida que giran, rápidamente iluminan todas las partes de la muestra varias veces. Como el disco gira rápidamente, por ejemplo a 3 000 rpm, se pueden registrar acontecimientos muy dinámicos en las células vivas.

(a) Microscopia de fluorescencia convencional

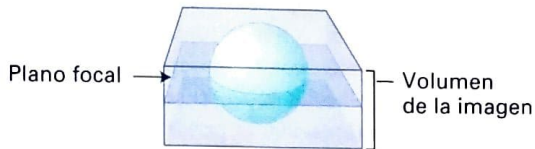
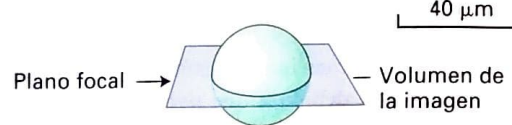
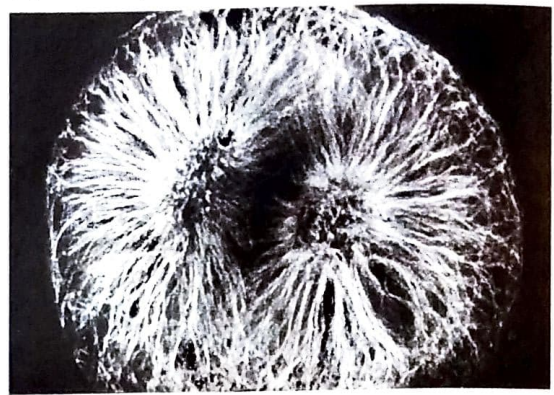


FIGURA 9-18 La microscopia confocal produce una sección óptica enfocada a través de células gruesas. Un huevo fecundado mitótico de un erizo de mar (*Psammechinus*) se lisó con un detergente, se expuso a un anticuerpo con antitubulina y luego se expuso a un anticuerpo marcado con fluoresceína que se une al anticuerpo antitubulina. (a) Cuando se visualiza mediante microscopia de fluorescencia convencional, el huso mitótico está borroso. Esto se

(b) Microscopia de fluorescencia confocal



debe a que se detecta la fluorescencia de fondo de la tubulina que se encuentra por encima y por debajo del plano focal como se esquematiza en el dibujo. (b) La imagen microscópica confocal es más nítida, en particular en el centro del huso mitótico. En este caso, la fluorescencia es detectada solo a partir de las moléculas que se encuentran en el plano focal, generando una sección óptica muy delgada. (Microfotografías de J. G. White y cols., 1987, *J. Cell Biol.* **104**:41)

trucción tridimensional. Un microscopio confocal de barrido puede aportar imágenes con una resolución excepcionalmente alta, tanto bidimensional como tridimensional (Fig. 9-18), aunque tiene dos limitaciones menores. Primero, requiere un tiempo considerable escanear cada plano focal, por lo tanto, si se está tomando la imagen de un proceso dinámico, el microscopio puede no ser capaz de obtener las imágenes lo suficientemente rápido como para seguir la dinámica. Segundo, se ilumina cada punto con luz láser intensa que puede blanquear al fluorocromo del que se está tomando la imagen y, por ende, limita el número de imágenes que se puede obtener.

El microscopio confocal de disco giratorio elude estos dos problemas (véase la Fig. 9-17b). La luz de excitación de un láser se disemina e ilumina una pequeña parte del disco giratorio a alta velocidad, por ejemplo a 3 000 rpm. El disco en realidad consiste en dos discos unidos: uno con 20 000 lentes que enfocan en forma precisa la luz láser

sobre 20 000 orificios diminutos en el segundo disco. Los orificios están dispuestos de tal forma que pueden escanear completamente el plano focal de la muestra varias veces con cada vuelta del disco. La luz fluorescente emitida regresa a través de los orificios del segundo disco y es reflejada por un espejo dicróico y enfocada sobre una cámara digital de alta sensibilidad. De esta forma, la muestra es escaneada en menos de un milisegundo y, por ende, se puede capturar incluso la localización en tiempo real del informador fluorescente si es altamente dinámico (Fig. 9-19). Una limitación actual de un microscopio de disco giratorio es que el tamaño de los orificios es fijo y tiene que coincidir con el aumento del objetivo, por lo tanto, en general está configurado para ser usado con un objetivo 63× o 100× y es menos útil para imágenes de menor aumento que podría ser necesario para secciones tisulares. Así, los microscopios confocales de barrido y de disco giratorio tienen ventajas que se superponen y se complementan.

VIDEO: Dinámica de los microtúbulos en levaduras en fisión



FIGURA EXPERIMENTAL 9-19 Se pueden obtener las dinámicas de los microtúbulos sobre el microscopio confocal de disco giratorio. Seis to-

mas de una película de tubulina-PFV en dos de las células con forma de bastón de las levaduras. [Cortesía de Fred Chang]

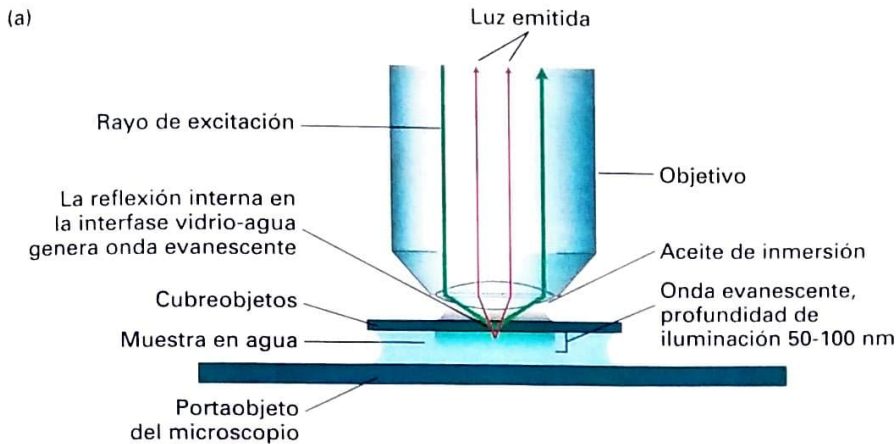
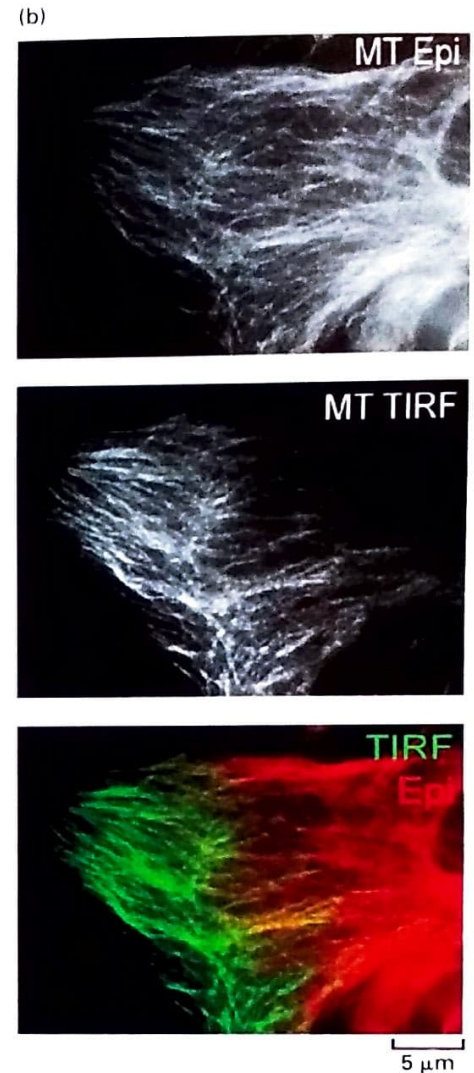


FIGURA EXPERIMENTAL 9-20 Se pueden tomar imágenes de las muestras fluorescentes en un plano focal restringido mediante microscopía por reflexión interna total (TIRF). (a) En la microscopía TIRF solo se iluminan alrededor de 50 a 100 nm adyacentes al cubreobjetos por lo que las moléculas fluorescentes en el resto de la muestra no son excitadas. Esta iluminación limitada es alcanzada dirigiendo la luz en un ángulo tal que ésta se refleje a partir de la interfase vidrio-agua del cubreobjetos en lugar de pasar a través de él. Mientras más luz se refleja, también se genera una región muy pequeña de iluminación llamada onda evanescente (mostrada en celeste). (b) La microscopía de inmunofluorescencia con anticuerpo antitubulina se ha utilizado para visualizar microtúbulos por microscopía de fluorescencia convencional (recuadro superior), TIRF (recuadro del centro) y una imagen combinada. Se obtuvieron las dos imágenes y se las coloreó en forma falsa de rojo y verde de manera tal que la combinación resaltara entre los microtúbulos que están cerca del cubreobjetos (verde). (Parte (b) de J. B. Marineville y cols., 2010, *J. Cell Biol.* **191**:i85)



La microscopía TIRF proporciona una imagen excepcional en un solo plano focal

Los microscopios confocales recientemente descritos proporcionan imágenes sorprendentes e informativas. Sin embargo, no son perfectos, y algunas situaciones experimentales requieren imágenes fluorescentes en un plano focal delgado adyacente a una superficie. Por ejemplo, la imagen confocal no es ideal para explorar los detalles de las proteínas en sitios de adhesión entre una célula y un cubreobjetos o para seguir la cinética del ensamblado de microtúbulos adheridos a un cubreobjetos. Se pueden obtener imágenes de alta sensibilidad de ambas situaciones usando *microscopía de fluorescencia por reflexión interna total* (TIRF, *total internal reflection fluorescence*). En la configuración más común de la microscopía TIRF, el haz de luz de excitación proviene de las lentes objetivo (Fig. 9-20a). Sin embargo, el ángulo al cual la luz llega al cubreobjetos se ajusta a un ángulo crítico de manera tal que la luz sea reflejada fuera del cubreobjetos y regrese a través del objetivo. Esto genera una banda estrecha, llamada *onda evanescente*, que ilumina solo alrededor de 50 a 100 nm de la muestra adyacente al cubreobjetos, sin iluminación del resto de la muestra. Por lo tanto, si usted tiene una mezcla compleja de estructuras fluorescentes en una muestra, en el microscopio TIRF verá solo aquellas que se encuentran entre 50 y 100 nm (2 a 4 veces el espesor de un microtúbulo) del cubreobjetos. Cuando las células se cultivan sobre un cubreobjetos, TIRF tiene una utilidad

excepcional para la identificación de estructuras en la base de las células y, por ende, cerca del cubreobjetos (Fig. 9-20b) y para la medición de las cinéticas del ensamblaje y desensamblaje de las estructuras como los microtúbulos y los filamentos de actina (véanse los Caps. 17 y 18).

FRAP revela la dinámica de los componentes celulares

Las imágenes fluorescentes de células vivas revela la localización y las dinámicas centrales de las poblaciones de moléculas fluorescentes, pero no dice nada acerca de cómo es la dinámica individual de las moléculas. Por ejemplo, si vemos que una proteína marcada con PFV forma una mancha en la superficie de una célula, ¿representa esto un conjunto estable de moléculas de proteína fluorescentes que entran y salen de la mancha? Se puede investigar esta cuestión al observar las dinámicas de las moléculas en la mancha (Fig. 9-21). Si utilizamos moléculas de alta intensidad para blanquear el fluorocromo (p. ej., PFV) solo en la mancha, inicialmente no habrá fluorescencia proveniente de él y aparecerá oscuro en el microscopio de fluorescencia. Sin embargo, si los componentes en la mancha están en equilibrio dinámico con las molé-

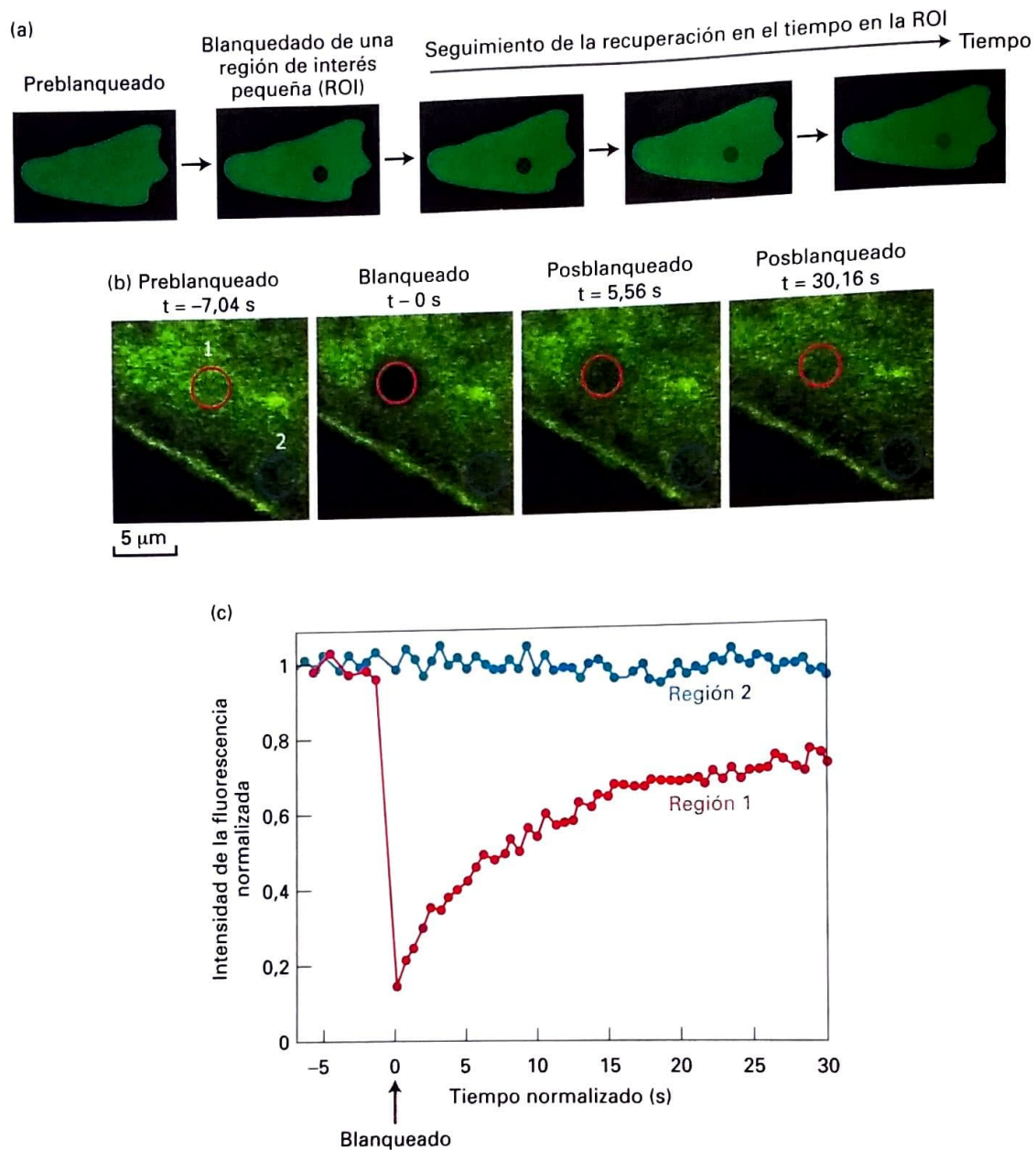


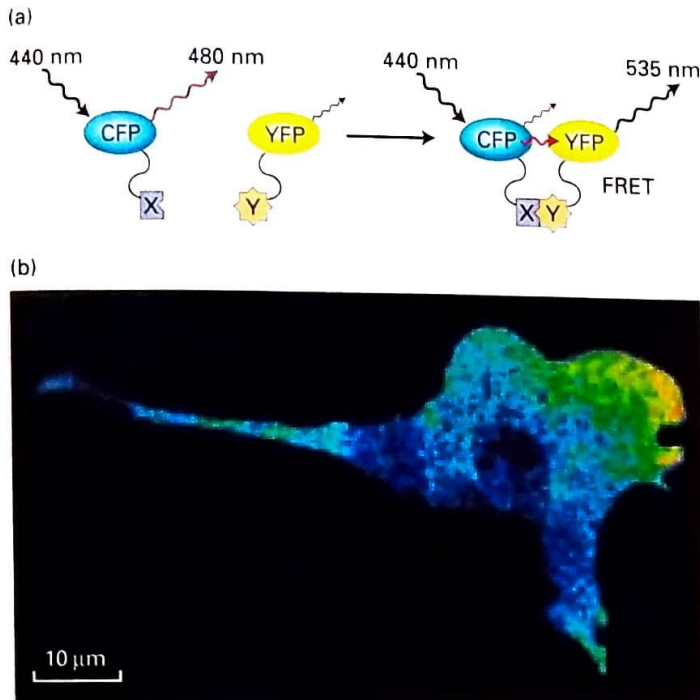
FIGURA EXPERIMENTAL 9-21 La recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueamiento (FRAP) revela las dinámicas de las moléculas. En una célula viva, el seguimiento de la distribución de una proteína marcada con PFV proporciona una visión de la distribución general de la proteína, pero no dice nada acerca de cómo podrían ser las poblaciones dinámicas de las moléculas individuales. Esto se puede determinar por FRAP. (a) En esta técnica, la señal PFV es blanqueada por un pulso breve de luz láser fuerte enfocada sobre la región de interés (ROI). Esto rápidamente blanquea las moléculas de manera irreversible; por ende, no se detectan nuevamente. La

restauración de la fluorescencia a la región representa las moléculas que no se blanquearon y se movieron dentro de la ROI. (b) La movilidad de los receptores de serotonina-PFV sobre la superficie celular se observó usando FRAP. Se sigue la fluorescencia en dos regiones –una que está blanqueada (región 1) y una región control que no lo está (región 2)–. (c) Al cuantificar la recuperación, se pueden establecer las propiedades dinámicas del receptor de serotonina. (Parte (b) de S. Kalipatnapu, 2007, *Membrane Organization and Dynamics of the Serotonin 1A Receptor Monitored using Fluorescence Microscopic Approaches*, en *Serotonin Receptors in Neurobiology*, A. Chattopadhyay, ed. CRC press.)

culas sin blanquear, la fluorescencia comenzará a retornar. La velocidad de recuperación de la fluorescencia es una medida de la dinámica de las moléculas. Esta técnica, conocida como *recuperación de la fluorescencia posterior al fotoblanqueamiento* (FRAP, *fluorescence recovery after photobleaching*), ha revelado cuán dinámicos son muchos de los componentes en las células. Por ejemplo, se ha utilizado para determinar el coeficiente de difusión de las proteínas de membrana (véase la Fig. 10-10), las dinámicas de componentes específicos de la vía secretora.

FRET mide la distancia entre los cromóforos

La microscopia de fluorescencia también se puede utilizar para determinar si dos proteínas interactúan in vivo empleando una técnica llamada transferencia de energía de *resonancia de Förster* (FRET, *Förster resonance energy transfer*). Esta técnica utiliza dos proteínas fluorescentes en las cuales la longitud de onda de emisión de la primera es la misma que la longitud de onda de excitación de la segunda (Fig.



9-22). Por ejemplo, cuando la proteína fluorescente turquesa (CFP, *cyan fluorescent protein*) es excitada con luz de longitud de onda de 440 nm, fluoresce y emite luz a 480 nm. Si la proteína fluorescente amarilla (YFP, *yellow fluorescent protein*) está en las cercanías, absorberá la luz de 480 nm y emitirá a 535 nm. La eficiencia de transferencia de energía es proporcional a R^{-6} , donde R es la distancia entre los fluoróforos —es

FIGURA 9-22 Las interacciones proteína-proteína se pueden visualizar por FRET. La idea detrás de FRET es utilizar dos proteínas fluorescentes diferentes de manera tal que cuando una se excita, su emisión excitará a la segunda proteína fluorescente lo que probará que se encuentran lo suficientemente cerca (recuadro superior). En este ejemplo, la proteína fluorescente turquesa (CFP, *cyan fluorescent protein*) se fusiona a la proteína X, la proteína fluorescente amarilla (YFP, *yellow fluorescent protein*) se fusiona a la proteína Y, y ambas proteínas se expresan en una célula viva. Si la célula se ilumina ahora con luz a 440 nm, la CFP emitirá una señal fluorescente a 480 nm. Si YFP no está cerca, no absorberá la luz 480 nm y no se emitirá luz a 535 nm. Sin embargo, si la proteína X interactúa con la proteína Y (como se muestra), traerá a CFP cerca de YFP, la luz emitida a 480 nm será capturada por YFP y ésta emitirá luz a 535 nm. (b) En este fibroblasto, FRET se ha utilizado para revelar que la interacción entre una proteína reguladora activa (Rac) y su patrón de unión se localiza en la parte delantera de la célula en migración. (Parte [b] de R. B. Sekar y Periasamy, 2003, *J. Cell Biol.* 160:29)

por lo tanto muy sensible a los cambios pequeños en distancia y, en la práctica, no es detectable a > 10 nm—. Así, al iluminar una muestra apropiada con luz a 440 nm y observarla a 535 nm, se puede decir si las proteínas marcadas con CFP e YFP se encuentran en una proximidad muy cercana. Por ejemplo, los sensores de FRET han sido desarrollados para determinar dónde se produce la señalización celular entre una proteína de unión a GTP y su efector (Fig. 9-22b).

Una versión modificada de esta técnica se puede usar para medir los cambios conformacionales en una proteína. Por ejemplo, se ha diseñado un sensor llamado *cameleón* para medir la concentración de Ca^{2+} intracelular. *Cameleón* consiste en un único polipéptido que contiene CFP e YFP unidos por una pieza de polipéptido capaz de unir Ca^{2+} (Fig. 9-23a). En ausencia de Ca^{2+} , la CFP y la YFP no se encuentran lo

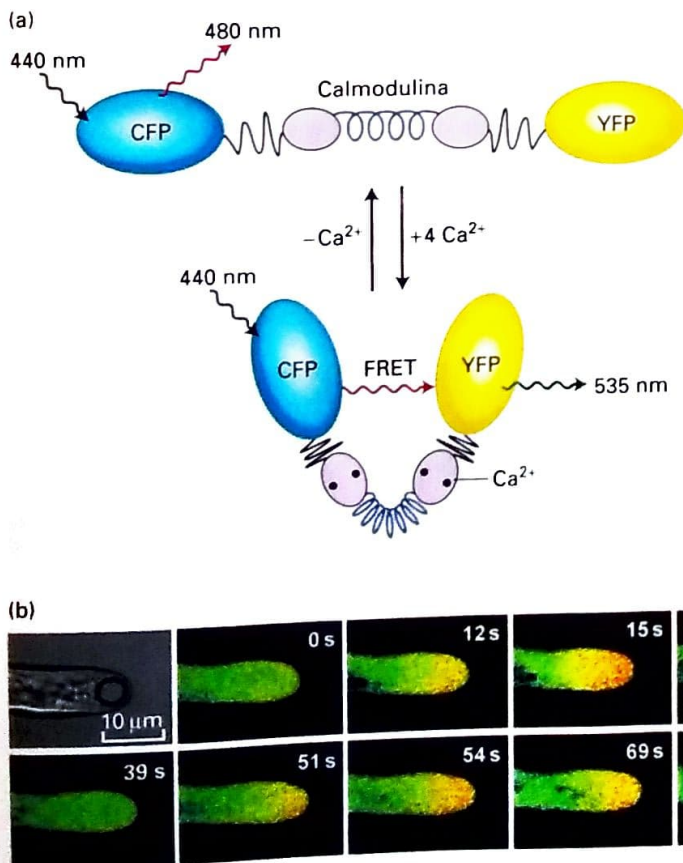


FIGURA EXPERIMENTAL 9-23 Los biosensores FRET detectan los ambientes bioquímicos locales. (a) Un biosensor de FRET es una proteína de fusión que contiene dos proteínas fluorescentes unidas por una región sensible al ambiente en estudio. En este ejemplo, una construcción llamada *cameleón* consiste en CFP unida a YFP mediante una secuencia basada en la proteína calmodulina que sufre un gran cambio conformacional cuando une Ca^{2+} . En ausencia de Ca^{2+} , las dos proteínas están lo suficientemente separadas para experimentar FRET, mientras que cuando se incrementa la concentración local de Ca^{2+} , éstas se juntan lo suficiente como para experimentar FRET. (b) Un ejemplo del uso de *cameleón* revela la oscilación en las concentraciones locales de Ca^{2+} en el extremo de una raíz de *Arabidopsis* en crecimiento. (Parte [b] de G. B. Monshausen y cols., 2008, *Plant Physiol.* 147:1690-1698.)

suficientemente cerca para que se produzca la FRET. Sin embargo, en presencia de una concentración local adecuada de Ca^{2+} , el camaleón se une al Ca^{2+} y experimenta un cambio conformacional que acerca a CFP y a YFP en una proximidad cercana para que se produzca la FRET. Los sensores tales como camaleón se pueden usar para medir la concentración de Ca^{2+} en las células vivas, por ejemplo en la punta de una raíz en crecimiento (Fig. 9-23b). Los investigadores creativos están desarrollando sensores FRET para iluminar muchos tipos diferentes de ambientes locales; por ejemplo, es posible hacer una sonda que experimente FRET solo cuando es fosforilada por una cinasa específica y, de esta forma, revelar dónde se localiza la cinasa activa en la célula.

La microscopia de superresolución puede localizar proteínas de hasta el nanómetro de precisión

Como se mencionó al comienzo, el límite de resolución teórico de la microscopia de fluorescencia es de alrededor de 0,2 μm (200 nm). Para comprender por qué esto es así, considere dos estructuras fluorescentes separadas por 100 nm. Cuando usted trata de imaginarlas, cada una de ellas genera una distribución gaussiana de la fluorescencia, la cual se superpone de tal forma que parecen ser una sola estructura. Se han desarrollado nuevos métodos para resolver este problema, uno de los

cuales se denomina *microscopia de localización fotoactivada* (PALM, *photo-activated localization microscopy*). Se basan en la capacidad de una variante de PFV para ser fotoactivada; es decir, solo se torna fluorescente cuando es activado por una longitud de onda de luz específica, diferente de su longitud de onda de excitación. Considere lo que sucedería si usted pudiera activar solo una molécula de PFV. Cuando se excita la muestra, la PFV activada podría emitir muchos cientos de fotones, lo que originaría una distribución de Gauss (Fig. 9-24a). Aunque el análisis de cada fotón no dice con precisión dónde se encuentra la PFV, el centro de la espiga puede informarle dónde se localiza la PFV con precisión nanométrica. Si usted ahora activa otra PFV, puede localizarla individualmente con la misma precisión. En PALM se activa un pequeño porcentaje de las PFV y cada una puede ser localizada individualmente con alta precisión, y después se activa y localiza otro grupo, y así, con el registro de ciclos adicionales de activación y localización, se obtiene una imagen de alta resolución. Por ejemplo, la distribución tridimensional de los microtúbulos se puede visualizar con mucha mayor claridad que con cualquier otro método de microscopia óptica (Fig. 9-24b) y se puede visualizar con notable detalle una fosita recubierta con clatrina—de alrededor de 100 nm de diámetro (Fig. 9-24c)—. Estos tipos de imágenes pueden requerir hasta una hora para generarse, por lo tanto se restringen a imágenes fijadas y en la actualidad no se pueden usar para imágenes de proteínas en células vivas.

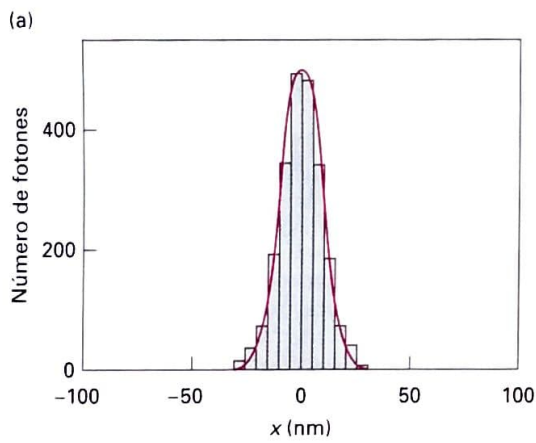
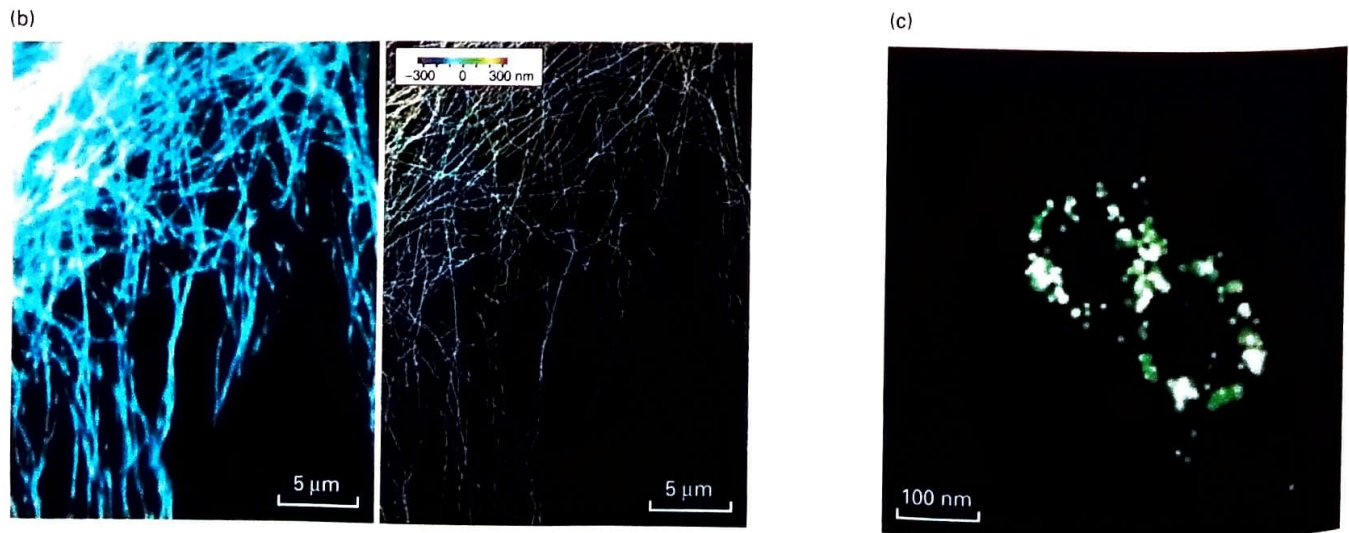


FIGURA EXPERIMENTAL 9-24 La microscopia de superresolución puede generar imágenes de con microscopio óptico con una resolución del orden del nanómetro. La resolución teórica del microscopio óptico se puede eludir mediante microscopia de superresolución, donde las moléculas únicas se pueden proyectar de manera individual o por separado para generar una imagen. Una versión de esta tecnología proyecta proteínas fusionadas a la PFV fotoactivable en muestras fijadas. (a) Cuando una PFV es activada y luego excitada, emitirá miles de fotones que se pueden recolectar. Esto genera una curva gaussiana centrada alrededor de la localización de la PFV que emite, el centro proporciona la localización de la PFV hasta la precisión del nanómetro. Este proceso es reiterado cientos de veces hasta excitar otras moléculas de PFV y surge una imagen de alta resolución. (b) Una imagen confocal de los microtúbulos (izquierda) se compara con su imagen de superresolución correspondiente (*derecha*) en la cual las configuraciones tridimensionales de los microtúbulos están codificadas por color. (c) Se muestra la naturaleza circular de una fosa recubierta con clatrina (analizada en el Cap. 14) —una imagen confocal de esta estructura podría aparecer como dos puntos brillantes sin cualquier detalle visible—. (Partes [b] y [c] de B. Huang y cols., 2008, *Science* **319**:810-813.)



CONCEPTOS CLAVE de la Sección 9.2

Microscopia óptica: exploración de las estructuras celulares y visualización de las proteínas dentro de las células

- La resolución del microscopio óptico, alrededor de $0,2\ \mu\text{m}$, está limitada por la longitud de onda de la luz.
- Debido a que la mayoría de los componentes celulares no están coloreados, la diferencia en el índice de refracción se puede usar para observar partes de células únicas utilizando microscopia de contraste de fase y de interferencia por contraste.
- En general, los tejidos deben fijarse, cortarse y teñirse para poder observar las células y estructuras subcelulares.
- La microscopia de fluorescencia utiliza compuestos que absorben la luz a una longitud de onda y la emiten a una longitud de onda más larga.
- Los colorantes fluorescentes sensibles a iones pueden medir las concentraciones intracelulares de los iones, como el Ca^{2+} .
- La microscopia de inmunofluorescencia utiliza anticuerpos para localizar componentes específicos en las células fijadas y permeabilizadas.
- La microscopia de inmunofluorescencia indirecta utiliza un anticuerpo primario no marcado, seguido por un anticuerpo secundario marcado en forma fluorescente, que reconoce al primario y le permite ser localizado.
- Los marcajes con epítomos que codifican una secuencia corta pueden ser añadidas a una secuencia que codifica una proteína para permitir la localización de la proteína expresada usando un anticuerpo contra la marca de epítomo.
- La proteína fluorescente verde (PFV) y sus derivados son proteínas que se producen naturalmente.
- La fusión de la PFV a una proteína de interés permite que su localización y la dinámica sean exploradas en una célula viva.
- La microscopia de desconvolución y la confocal proporcionan gran mejoría en la claridad de las imágenes fluorescentes al eliminar la luz fluorescente fuera de foco.
- La microscopia por reflexión interna total (TIRF) permite que muestras fluorescentes adyacentes en un portaobjetos sean vistas con gran claridad.
- La recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueamiento (FRAP) de una proteína de fusión PFV permite analizar la dinámica de la población de moléculas.
- La transferencia de energía de resonancia Förster (FRET) es una técnica en la cual la energía lumínica es transferida desde una proteína fluorescente a otra cuando las proteínas están muy cerca, y revela así cuando dos moléculas están cerca en la célula.
- La microscopia de superresolución permite visualizar imágenes fluorescentes detalladas con resolución del orden del nanómetro.

9.3 Microscopia electrónica: imagen de alta resolución

La microscopia electrónica de muestras biológicas, como las proteínas únicas, los orgánulos, las células y los tejidos, ofrece una resolución de las ultraestructuras mucho mayor de lo que se puede obtener mediante microscopia óptica. La longitud de onda de electrones significa que el límite de resolución para un microscopio electrónico de transmisión es teóricamente $0,005\ \text{nm}$ (menos del diámetro de un solo átomo), o 40 000 veces mejor que la resolución de un microscopio óptico y 2 millones de veces mejor que la del ojo humano desnudo. Sin embargo, la resolución efectiva del microscopio electrónico de transmisión en el estudio de los sistemas biológicos es considerablemente menor que este ideal. En condiciones óptimas, se pueden obtener una resolución de $0,10\ \text{nm}$ con microscopios electrónicos de transmisión, alrededor de 2 000 veces mejor que los microscopios ópticos de alta resolución convencionales.

Los principios fundamentales de la microscopia electrónica son similares a los de la microscopia óptica; la principal diferencia es que las lentes electromagnéticas enfocan un haz de electrones de alta velocidad en lugar de la luz visible usada por las lentes ópticas. En el *microscopio electrónico de transmisión* (TEM, *transmission electron microscope*), los electrones son emitidos desde un filamento y acelerados en un campo eléctrico. Una lente condensadora enfoca el haz de electrones sobre la muestra; las lentes objetivo y del proyector enfocan los electrones que pasan a través de la muestra y los proyecta sobre una pantalla u otro detector (Fig. 9-25, izquierda). Debido a que los átomos absorben los electrones del aire, el tubo entero entre la fuente de electrones y el detector es mantenido en un vacío ultraelevado. Por tal motivo, el material vivo no puede verse por microscopia electrónica.

En esta sección se describirán diversas técnicas para visualizar muestras biológicas mediante microscopia electrónica. El instrumento más ampliamente utilizado es el microscopio electrónico de transmisión, pero también es común el uso del *microscopio electrónico de barrido* (SEM, *scanning electron microscope*), que proporciona información complementaria como se analiza al final de esta sección.

Se pueden obtener imágenes de moléculas o estructuras individuales después de una tinción negativa o de ser recubiertas con metal

Es común en biología explorar la forma detallada de las macromoléculas individuales, como proteínas o ácidos nucleicos, o de estructuras, como virus y los filamentos que constituyen el citoesqueleto. Es relativamente fácil de visualizar esto en el microscopio electrónico de transmisión cuando son teñidas con un metal pesado que dispersa a los electrones incidentes. Para preparar una muestra, primero se la absorbe a una *rejilla de microscopio electrónico* de $3\ \text{mm}$ (Fig. 9-26a) cubierta con una capa delgada de plástico o carbono. La muestra luego es bañada en una solución de metal pesado, como el acetato de uranilo, y se elimina el exceso de solución (Fig. 9-26b). Como resultado de este procedimiento, el acetato de uranilo cubre la rejilla pero es excluido de las regiones donde se ha adherido la muestra. Cuando se visualiza en el TEM, se observa dónde se ha excluido la tinción y, por lo tanto, la muestra se dice que está *teñida negativamente*. Debido a que la tinción puede revelar con precisión la topología de la muestra, se obtiene una imagen de alta resolución (Fig. 9-26c).

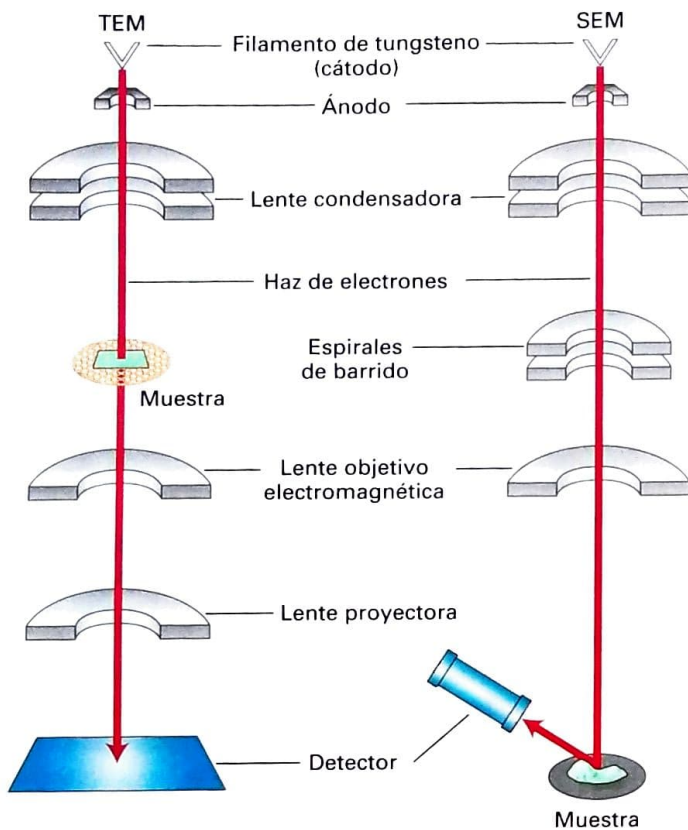


FIGURA 9-25 En la microscopía electrónica, las imágenes se forman a partir de los electrones que pasan a través de una muestra o son dispersados desde una muestra recubierta con metal. En un microscopio electrónico de transmisión (TEM), los electrones son extraídos desde un filamento calentado, acelerado por un campo eléctrico y enfocado sobre la muestra por una lente condensadora magnética. Los electrones que pasan a través de la muestra son enfocados por una serie de objetivos magnéticos y lentes proyectoras para formar una imagen ampliada de la muestra sobre un detector, que puede ser una pantalla fluorescente de visualización, una película fotográfica o una cámara con dispositivo de carga acoplado (CCD). En un microscopio electrónico de barrido (SEM), los electrones son enfocados por lentes condensadoras y objetivos sobre una muestra recubierta con metal. Bobinas de barrido mueven el haz a través de la muestra y los electrones dispersados desde el metal son recolectados por un tubo detector fotomultiplicador. En ambos tipos de microscopios, debido a que los electrones son dispersados fácilmente por las moléculas de aire, toda la columna se mantiene en un medio de vacío muy alto.

Las muestras también se pueden preparar mediante *sombreado metálico*. En esta técnica, la muestra se absorbe a una pieza pequeña de mica, luego se la cubre con una capa fina de platino mediante evaporación del metal, seguido por disolución de la muestra en ácido o solución blanqueadora. La cubierta de platino se puede generar a partir de un ángulo fijo o a un ángulo pequeño a medida que se rota la muestra, en cuyo caso se denomina *sombreado rotatorio a bajo ángulo*. Cuando la muestra es transferida a una rejilla y examinada en el TEM, estas técnicas proporcionan información acerca de la topología tridimensional de la muestra (Fig. 9-27).

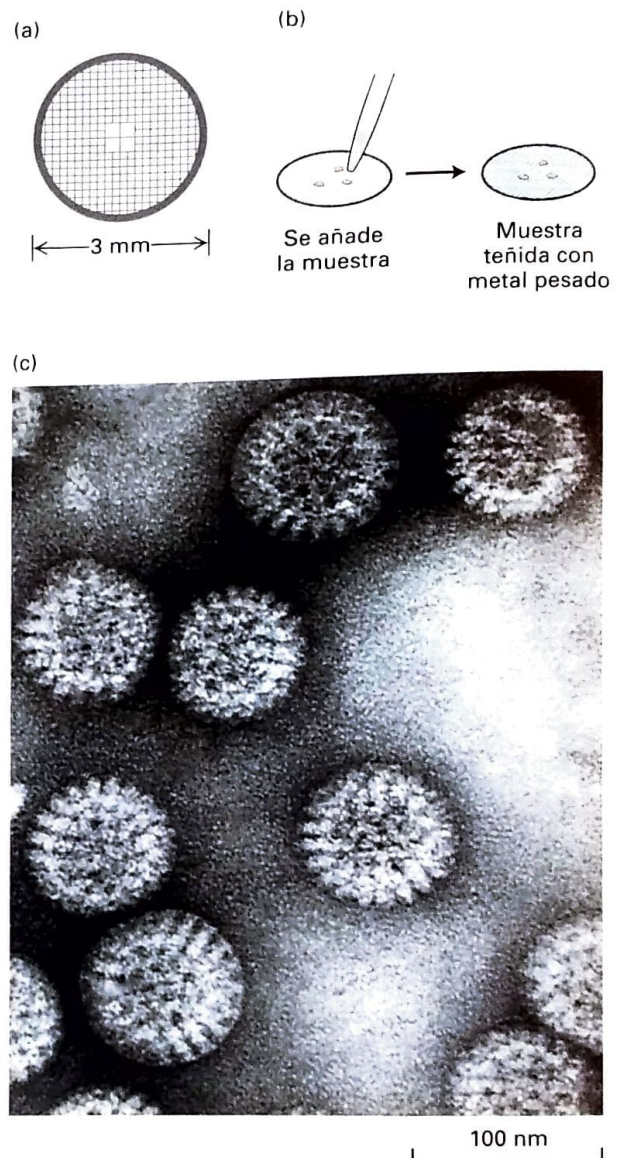


FIGURA 9-26 La microscopía electrónica de transmisión de muestras teñidas en negativo revelan características sutiles. (a) Las muestras para el microscopio electrónico de transmisión (TEM) suelen estar montadas sobre una rejilla de oro o cobre. La rejilla suele estar cubierta por una película muy delgada de plástico o carbono a la cual se puede adherir la muestra. (b) La muestra luego se incuba en un metal pesado, como el acetato de uranilo, y se elimina el exceso de tinción. (c) Cuando se observa en el TEM, la muestra excluye la tinción, de manera tal que se ve el contorno negativo. El ejemplo en (c) es un retrovirus teñido en negativo. (Parte [c] ISM/Phototake.)

Las células y los tejidos son cortados en secciones delgadas para su visualización mediante microscopía electrónica

Las células individuales y las piezas de tejido son demasiado gruesas para ser visualizadas directamente en el microscopio electrónico de transmisión estándar. Para superar esto, se desarrollaron métodos para preparar y cortar *secciones delgadas* de células y tejidos. Cuando esto se analizó en el microscopio electrónico, se reveló la organización, belleza y complejidad del interior de la célula y llevó a una revolución

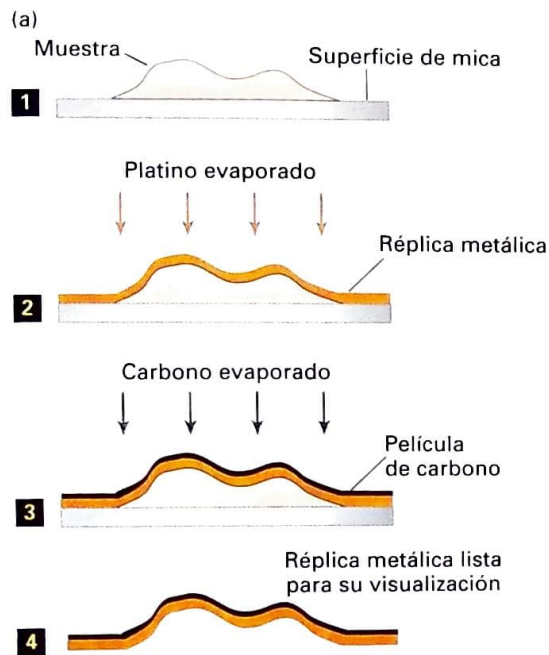


FIGURA 9-27 El sombreado metálico hace visible los detalles de la superficie de partículas muy pequeñas mediante el microscopio electrónico de transmisión. (a) Se coloca la muestra sobre una superficie de mica y luego se seca en un evaporador de vacío (paso 1). Se cubre la rejilla con la muestra con una película delgada de un metal pesado, como platino y oro, y se evapora a partir de un filamento metálico calentado eléctricamente (paso 2). Para estabilizar la réplica, después la muestra se cubre con una película de carbono evaporada desde un electrodo colocado encima (paso 3). El material biológico se disuelve luego con ácido y blanqueador (paso 4) y se visualiza



la réplica metálica en un TEM. En microfotografías electrónicas de tales preparaciones, las zonas cubiertas con carbono aparecen claras –al revés de las microfotografías de las preparaciones con metal más pesado, las cuales aparecen más oscuras. (b) Una réplica sombreada con platino de las fibras subestructurales de colágeno de piel de becerro, la principal proteína estructural de los tendones, huesos y tejidos similares. Las fibras son de alrededor de 200 nm de espesor; se visualiza un patrón repetido de 64 nm (líneas paralelas blancas) a lo largo de la longitud de cada fibra. (Cortesía de R. Kessel and R. Kardon.)

en la biología celular –por primera vez se apreciaron orgánulos nuevos y los primeros atisbos del citoesqueleto–.

Para preparar secciones delgadas es necesario fijar químicamente la muestra, deshidratarla, impregnarla con un líquido plástico que endurece (similar a Plexiglas®) y luego cortar secciones de alrededor de 5 a 10 nm de espesor. Para que las estructuras sean visibles, la muestra se debe teñir con metales pesados como el uranio y las sales de plomo, lo cual debe hacerse antes de embeberlas en el plástico o después de que se cortan las secciones. A lo largo de todo este libro aparecen ejemplos de células y tejidos visualizados mediante microscopía electrónica de sección fina (véase, por ejemplo, Fig. 9-33). Es importante darse cuenta que las imágenes obtenidas representan solo una fina porción a través de la célula, de manera tal que para obtener una visión tridimensional es necesario cortar secciones seriadas a través de toda la muestra y reconstruirla a partir de una serie de imágenes secuenciales (Fig. 9-28).

La microscopia inmunoelectrónica localiza proteínas a nivel ultraestructural

Al igual que la microscopia de inmunofluorescencia localiza proteínas a nivel de microscopio óptico, se han desarrollado métodos que utilizan anticuerpos para localizar proteínas en secciones delgadas a nivel de microscopio electrónico. Sin embargo, los procedimientos invasivos

que se utilizan para preparar las secciones delgadas tradicionales –fijación química y embebido en plástico– pueden desnaturalizarlas o modificar los antígenos de manera tal que ya no puedan ser reconocidos por los anticuerpos específicos. Se han desarrollado métodos más sutiles, como la fijación lumínica, que seccionan la muestra después de congelarla a la temperatura del nitrógeno líquido, seguido por incubaciones de anticuerpos a temperatura ambiente. Para tornar visible el anticuerpo en el microscopio electrónico, debe ser adherido a un marcador electrodenso. Una forma de hacer esto es utilizar partículas de oro densas en electrones cubiertas con proteína A, una proteína bacteriana que se une al segmento Fc de todas las moléculas de anticuerpo (Fig. 9-29). Debido a que las partículas de oro difractan los electrones incidentes, aparecen como puntos oscuros.

La microscopia crioelectrónica permite la visualización de muestras sin fijación o tinción

La microscopia electrónica de transmisión estándar no se puede utilizar para estudiar células vivas, y la ausencia de agua provoca que las macromoléculas se desnaturalicen y se tornen no funcionales. Sin embargo, las muestras biológicas hidratadas, no fijadas y sin teñir pueden verse directamente en un microscopio electrónico de transmisión si están congeladas. En esta técnica de *microscopia crioelectrónica*

FIGURA EXPERIMENTAL 9-28 Modelo del complejo de Golgi basado en reconstrucciones tridimensionales de imágenes de microscopía electrónica. Las vesículas transportadoras (esferas blancas) que se desprenden por gemación del retículo endoplasmático rugoso se fusionan con las membranas *cis* (celeste) del complejo de Golgi. Mediante un mecanismo descrito en el Capítulo 14, las proteínas se mueven desde la región *cis* hacia la región *medial* y finalmente a la región *trans* del complejo de Golgi. Eventualmente, las vesículas se desprenden de la membrana de Golgi *trans* (anaranjado y rojo); algunas se mueven hacia la superficie celular y otras se mueven hacia los lisosomas. El complejo de Golgi, al igual que el retículo endoplasmático, es en especial prominente en las células secretoras. (Brad J. Marsh & Kathryn E. Howell, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3, 789-785 (2002))



Se aplica una suspensión acuosa de una muestra a la rejilla en una película extremadamente delgada, congelada en nitrógeno líquido y mantenida en este estado por medio de una montura especial. La muestra congelada luego es colocada en el microscopio electrónico. La temperatura muy baja (-196°C) evita la evaporación del agua, incluso en vacío. Así, la muestra se puede observar en detalle en su estado nativo, hidratado, sin fijarla o teñirla con metal pesado. Sobre la base de cientos de imágenes promediadas por ordenador, se puede generar un modelo tridimensional casi hasta resolución atómica. Por ejemplo, este método se ha utilizado para generar modelos de ribosomas, la bomba de calcio del músculo en el Capítulo 11 y otras proteínas grandes que son difíciles de cristalizar.

Muchos virus tienen cubiertas, o cápsides, que contienen múltiples copias de una o unas pocas proteínas dispuestas en una estructura simétrica. En un microscopio crioelectrónico las imágenes de estas partículas se pueden ver desde diversos ángulos. Un análisis de computación de múltiples imágenes puede utilizar la simetría de la partícula para calcular la estructura tridimensional de la cápside en

una resolución de alrededor de 5 nm. En la Figura 4-44 se muestran ejemplos de tales imágenes.

Una extensión de esta técnica, la *tomografía crioelectrónica*, permite a los investigadores determinar la arquitectura tridimensional de los orgánulos o incluso células enteras embebidas en hielo, es de-

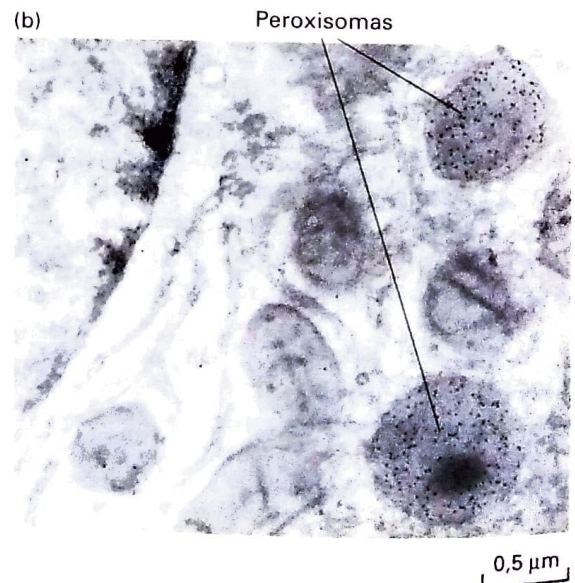
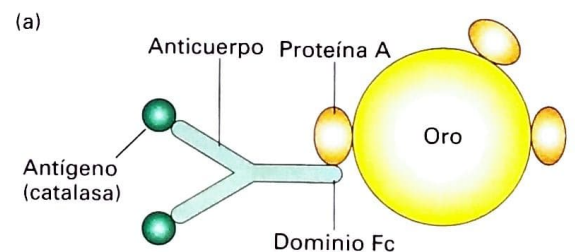


FIGURA 9-29 Partículas de oro recubiertas con la proteína A se utilizan para detectar una proteína unida a un anticuerpo mediante microscopía electrónica de transmisión. (a) Primero, se permite que los anticuerpos interactúen con sus antígenos específicos (p. ej., catalasa) en una sección de tejido fijado. Luego la sección se trata con partículas de oro densas en electrones cubiertas con proteína A de la bacteria *S. aureus*. La unión de la proteína A a los dominios Fc de las moléculas de anticuerpo hace que la ubicación de la proteína diana, en este caso la catalasa, sea visible en el microscopio electrónico. (b) Un corte delgado de tejido hepático se fijó con glutaraldehído, se seccionó y luego se trató como se describe en la parte (a) para localizar la catalasa. Las partículas de oro (puntos negros) que indican la presencia de catalasa se localizan exclusivamente en los peroxisomas. (De H. J. Geuze y cols., 1981, *J. Cell Biol.* 89:653. Reproducido de *Journal of Cell Biology* con autorización de The Rockefeller University Press.)

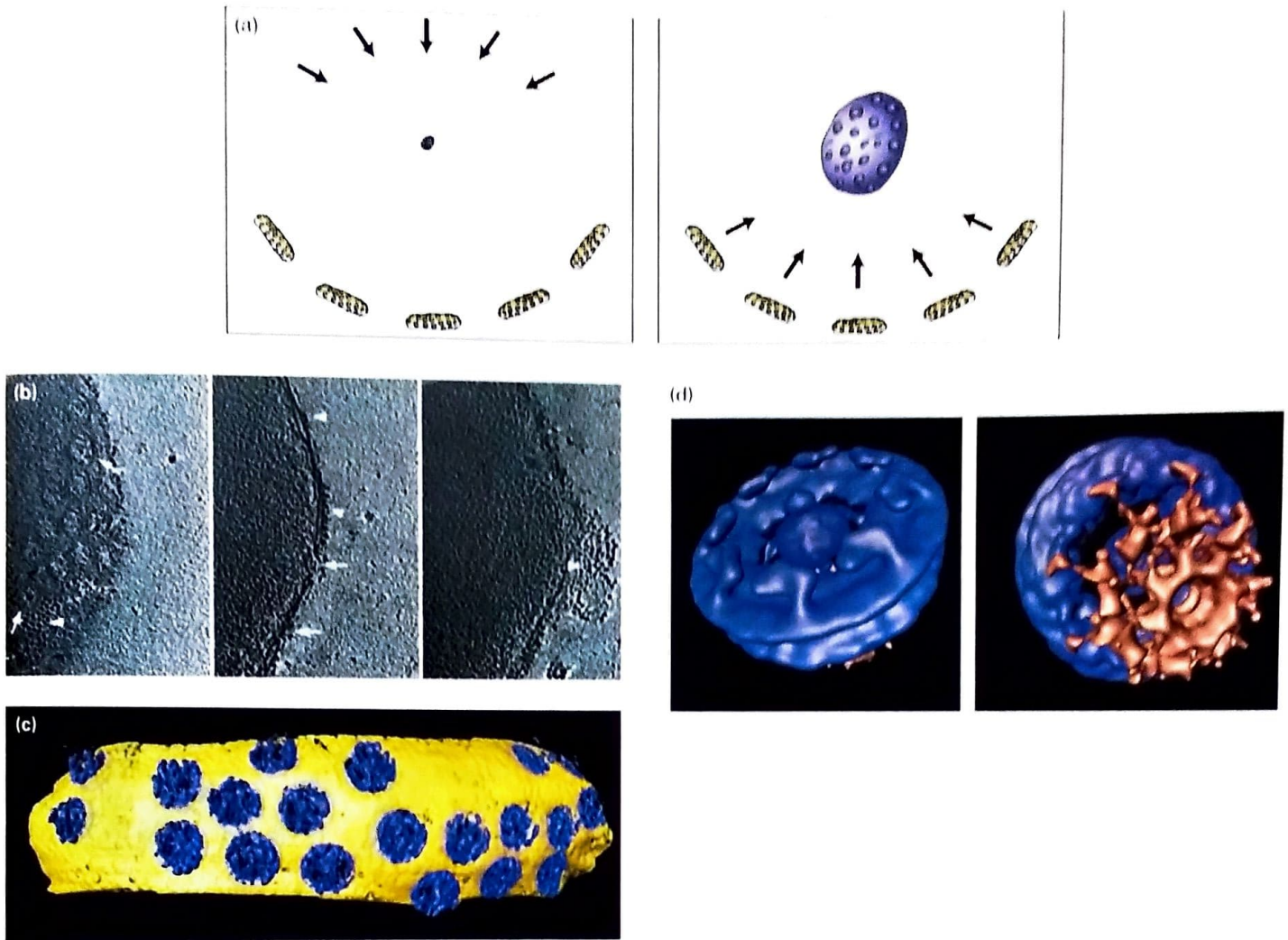


FIGURA 9-30 Estructura del complejo del poro nuclear (NPC) mediante tomografía crioelectrónica. (a) En la tomografía electrónica se registra una serie semicircular de imágenes bidimensionales de la muestra tridimensional que se ubica en el centro; la muestra está inclinada mientras que las ópticas electrónicas y el detector permanecen estacionarios. La estructura tridimensional se calcula a partir de las imágenes bidimensionales individuales que se obtienen cuando los electrones provenientes de diferentes direcciones (flechas en el recuadro izquierdo) forman la imagen del objeto. Estas imágenes individuales se utilizan para generar la imagen tridimensional del objeto (flechas, recuadro de la derecha). (b) Los núcleos aislados del moho mucilaginoso celular *Dictyostelium discoideum* se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido y se

mantuvieron en este estado mientras la muestra se observó en el microscopio electrónico. El panel muestra tres imágenes inclinadas secuenciales. Se muestran diferentes orientaciones de los NPC (flechas) en vista superior (izquierda y centro) y vista lateral (derecha). Se visualizan los ribosomas conectados a la membrana nuclear externa, como un parche del RE rugoso (puntas de flechas). (c) Representación superficial generada por computadora de un segmento de la membrana de la envoltura nuclear (amarilla) tachonada con los NPC (azul). (d) Al promediar las imágenes de múltiples poros nucleares, se pueden discernir muchos más detalles. [Parte (a) después de Tickell y cols., 2006, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **7**:225. Partes (b), (c) y (d) de M. Beck y cols., 2004, *Science* **306**:1387.]

cir, en un estado cercano a la vida. En esta técnica, el soporte de la muestra se inclina en pequeños incrementos alrededor del eje perpendicular al haz de electrones; así, se obtienen imágenes del objeto vistas desde diferentes direcciones (Fig. 9-30a, b). Las imágenes luego son fusionadas mediante un programa informático en una reconstrucción tridimensional llamada *tomograma* (Fig. 9-30c, d). Una desventaja de la tomografía crioelectrónica es que las muestras deben ser relativamente delgadas, de alrededor de 200 nm; esto es mucho más delgado que las muestras (200 μm de espesor) que se estudian con microscopía óptica confocal.

La microscopía electrónica de barrido de muestras recubiertas con metal revela características de la superficie

La *microscopía electrónica de barrido* (SEM) permite a los investigadores visualizar las superficies de muestras cubiertas con metal sin seccionar. Un haz de electrones intenso dentro del microscopio barre rápidamente por encima la muestra. Las moléculas en la cubierta son excitadas y liberan electrones secundarios que son enfocados hacia un detector de centelleo; la señal resultante es visualizada sobre un tubo de

FIGURA 9-31 La microscopía electrónica de barrido (SEM) produce una imagen tridimensional de la superficie de una muestra sin seccionar.

Aquí se muestra una imagen SEM del epitelio que reviste la luz del intestino. Abundantes microvellosidades digitiformes se extienden desde la superficie orientada hacia la luz de cada célula. La lámina basal bajo el epitelio ayuda a mantenerlo y anclarlo al tejido conectivo subyacente. Compare esta imagen de las células intestinales con la de la Figura 9-13, una microfotografía de fluorescencia. [De R. Kessel y R. Kardon, 1979, *Tissues and Organs: A Text-Atlas of Scanning Electron Microscopy*, W. H. Freeman and Company, p. 176.]

cátodo similar a un televisor convencional (véase la Fig. 9-25, derecha). La microfotografía electrónica de barrido resultante tiene una apariencia tridimensional debido a que el número de electrones secundarios producidos por cualquier punto sobre la muestra depende del ángulo del haz de electrones en relación con la superficie (Fig. 9-31). El poder de resolución de los microscopios electrónicos de barrido, el cual está limitado por el espesor de la cubierta de metal, es de solo el orden de los 10 nm, mucho menos que el de los instrumentos de transmisión.

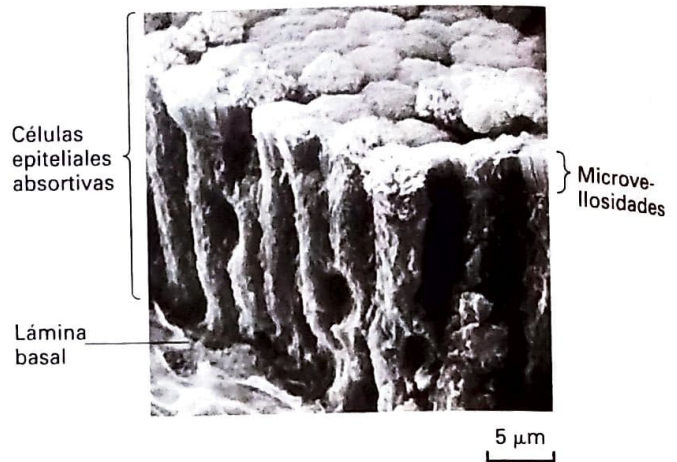
CONCEPTOS CLAVE de la Sección 9.3

Microscopía electrónica: imagen de alta resolución

- La microscopía electrónica proporciona imágenes de muy alta resolución debido a la longitud de onda corta de los electrones de alta energía utilizados para crear la imagen de la muestra.
- Las muestras simples, como las proteínas y los virus, se pueden teñir en negativo o sombrear con metales pesados para ser analizadas en un microscopio electrónico de transmisión (TEM).
- Las secciones más gruesas en general deben ser fijadas, deshidratadas, embebidas en plástico, seccionadas y luego teñidas con metales pesados electrodenso antes de visualizarlas por TEM.
- El TEM puede localizar proteínas específicas empleando anticuerpos específicos con un marcador de metales pesados, como partículas de oro.
- La microscopía crioelectrónica permite el análisis de las muestras biológicas hidratadas, no fijadas, ni teñidas en el TEM, manteniéndolas a unos pocos grados por encima del cero absoluto.
- La microscopía electrónica de barrido (SEM) de material sombreado con metal revela las características superficiales de las muestras.

9.4 Aislamiento y caracterización de los orgánulos celulares

El análisis de las células mediante microscopía óptica y electrónica lleva a la apreciación de que las células contienen un conjunto de orgánulos. La mayoría de los orgánulos están encerrados en una bicapa y llevan a cabo una función específica. Para realizar esta función, cada tipo de orgánulo tiene una estructura reconocible y contiene un conjunto específico de proteínas para ejecutar su función. Los biólogos utilizan este hecho para identificar los orgánulos específicos. Por ejemplo, como se describe en el Capítulo 12, la mayor parte del ATP en una célula es



sintetizado por la ATP sintasa, que convierte el ADP en ATP y está localizada en la mitocondria, y la ATP sintasa es un buen marcador para mitocondrias. Como se analizará a continuación, la disponibilidad de marcadores específicos para los orgánulos ha contribuido al desarrollo de la purificación de orgánulos.

En esta sección, primero se describirá un breve panorama general de los orgánulos de las células eucariontes como un prelude a sus análisis más detallados en los últimos capítulos. Después se describirán los métodos que se utilizan para abrir las células para la purificación de los orgánulos. Finalizaremos con avances recientes en proteómica dirigidos a definir el repertorio completo de proteínas en los orgánulos.

Los orgánulos en la célula eucarionte

En la Figura 9-32 se describen los principales orgánulos en las células animales y vegetales, y algunos se muestran en mayor detalle en la Figura 9-33.

La **membrana plasmática** contiene a la célula y es una importante barrera vital ya que es la interfase que tiene una célula con su ambiente, separando el mundo exterior del **citoplasma** interno. Se compone de alrededor de una masa igual de lípidos y proteínas. Aunque las propiedades físicas de la membrana plasmática están en gran parte determinadas por su composición lipídica, un complemento de proteínas de la membrana es el principal responsable de las propiedades funcionales de la membrana. Como se analiza en el Capítulo 13, la membrana plasmática es una barrera permeable que contiene **proteínas de transporte de membrana** necesarias para traer iones y metabolitos al interior de la célula. También es el sitio de recepción de señales químicas de otras células, de manera tal que contiene receptores que miden estas señales y transmiten la información a través de la membrana plasmática al interior del citosol, un tema que se analiza en el Capítulo 15. La membrana plasmática define la forma de una célula y, por lo tanto, está íntimamente asociada con el citoesqueleto y con otras células y la matriz celular, interacciones que se tratan en los Capítulos 17 al 19.

Las moléculas más grandes que los iones y los metabolitos pueden ser incorporadas mediante **endocitosis**, un proceso que involucra la invaginación de la membrana plasmática, que luego se desprende por estrangulación para formar un **endosoma** en el citoplasma. Durante la forma mejor estudiada de endocitosis, se forman regiones especiales de

Célula animal

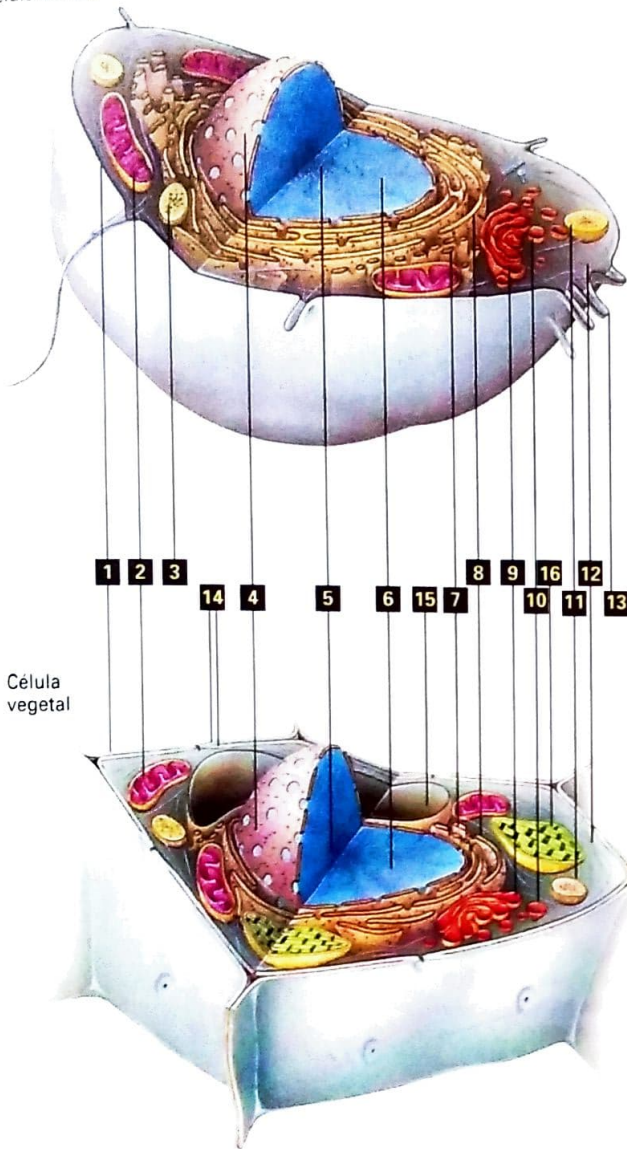


FIGURA 9-32 Panorama general esquemático de una célula animal "típica" (arriba) y una célula vegetal (abajo) y sus principales subestructuras. Cada célula no tendrá todos los orgánulos, gránulos y estructuras

la membrana plasmática llamadas *fositas recubiertas* en las cuales los receptores se reúnen y atraen moléculas o partículas específicas al interior de la célula (Fig. 9-33a). Este proceso se conoce como **endocitosis mediada por receptor**. Una vez que los materiales son internalizados, son clasificados y pueden a su vez regresar a la membrana plasmática o ser distribuidos a los *lisosomas* para degradación. Los lisosomas contienen una batería de enzimas degradativas que pueden degradar cualquier molécula biológica en componentes pequeños. El lumen de los lisosomas tiene un pH ácido de 4,5; esto contribuye a desnaturalizar proteínas y las enzimas degradativas —conocidas colectivamente como *hidrolasas ácidas*— pueden resistir este ambiente y, en efecto, funcionan de manera óptima a ese pH.

El sistema de membrana interna más grande es un orgánulo conocido como **retículo endoplasmático (RE)**, que consiste en una red extensa interconectada de sacos aplanados y túbulos unidos a la

- 1** La membrana plasmática controla el movimiento de las moléculas hacia adentro y hacia afuera de la célula y actúa en la señalización célula-célula y en la adhesión celular.
- 2** Las mitocondrias, que están rodeadas por una membrana doble, generan ATP por oxidación de la glucosa y los ácidos grasos.
- 3** Los lisosomas, que tienen una luz ácida, degradan el material internalizado por la célula y desgastan las membranas celulares y los orgánulos.
- 4** La envoltura nuclear, una membrana doble, encierra los contenidos del núcleo; la membrana nuclear externa se continúa con el RE rugoso.
- 5** El nucléolo es un subcompartimento donde se sintetiza la mayor parte del rRNA de la célula.
- 6** El núcleo está lleno de cromatina compuesta de DNA y proteínas; es el sitio de síntesis del tRNA y el mRNA.
- 7** El retículo endoplasmático liso sintetiza lípidos y detoxifica ciertos compuestos hidrófobos.
- 8** El retículo endoplasmático rugoso (RE) funciona en la síntesis, el procesamiento y la clasificación de las proteínas secretadas, las proteínas lisosomales y ciertas proteínas de membrana.
- 9** El complejo de Golgi procesa y clasifica las proteínas secretadas, las proteínas lisosomales y las proteínas de membrana sintetizadas en el RE rugoso.
- 10** Las vesículas secretoras almacenan proteínas secretadas y se fusionan con la membrana plasmática para liberar sus contenidos.
- 11** Los peroxisomas detoxifican diversas moléculas y también degradan ácidos grasos para producir grupos acetilos para la biosíntesis.
- 12** Las fibras del citoesqueleto forman redes y haces que sostienen las membranas celulares, ayudan a organizar los orgánulos y participan en el movimiento celular.
- 13** Las microvellosidades incrementan la superficie para la absorción de los nutrientes del medio que las rodea.
- 14** La pared celular, compuesta en gran parte por celulosa, ayuda a mantener la forma de la célula y proporciona protección contra el estrés mecánico.
- 15** Las vacuolas almacenan agua, iones y nutrientes, degradan moléculas y actúan en la elongación celular durante el crecimiento.
- 16** Los cloroplastos, que llevan a cabo la fotosíntesis, están rodeados por una membrana doble y contienen una red de sacos internos delimitados por membrana.

fibras que se muestran aquí, y en algunas pueden estar presentes otras subestructuras. Las células también difieren considerablemente en forma y en la prominencia de diversos orgánulos y subestructuras.

membrana. El RE se puede dividir en *retículo endoplasmático liso*, denominado así debido a que la membrana tiene una superficie lisa, y *retículo endoplasmático rugoso*, el cual está revestido por ribosomas (Fig. 9-33b). El retículo endoplasmático liso es el sitio de síntesis de ácidos grasos y fosfolípidos. Por el contrario, el retículo endoplasmático rugoso, con sus ribosomas asociados, es el sitio de la síntesis de las proteínas de membrana y las proteínas que serán secretadas fuera de la célula, y representan alrededor de un tercio de todos los tipos diferentes de proteínas sintetizadas por una célula. Después de la síntesis en el RE, las proteínas destinadas a la membrana plasmática o para secreción son transportadas primero al **complejo de Golgi**, una pila de membranas aplanadas llamadas *cisternas* (Fig. 9-33b), en las cuales las proteínas son modificadas y clasificadas antes de ser transportadas a sus destinos a la membrana plasmática o, en algunos casos, distribuidas a los endosomas. Debido a que las proteínas destinadas a la se-

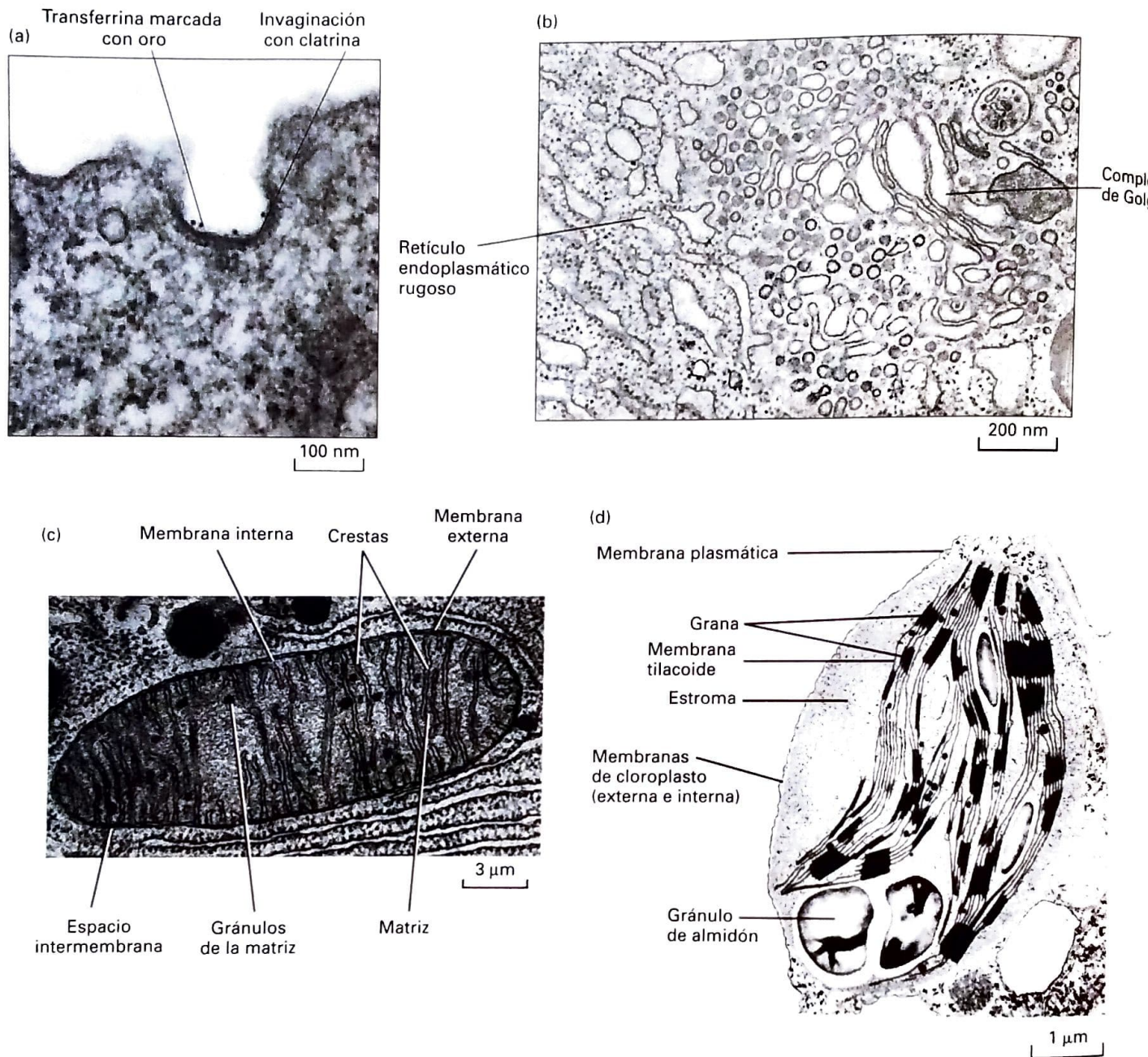


FIGURA 9-33 Ejemplos de orgánulos visualizados por microscopía electrónica de transmisión de cortes delgados. (a) La membrana plasmática contiene una invaginación recubierta con clatrina. Antes de la fijación, las células se incubaron con transferrina marcada con oro coloidal, una proteína involucrada en la captación de hierro a través de un receptor localizado en las invaginaciones recubiertas (véase el Cap. 14). (b) Una sección a través de una célula secretora muestra el retículo endoplasmático rugoso tachonado con ribosomas y el

complejo de Golgi. (c) Se muestran las dos membranas de una mitocondria y las invaginaciones de la membrana llamadas crestas. (d) Las plantas contienen cloroplastos, otro orgánulo con membrana doble. Las membranas de tilacoides contienen las enzimas de la vía fotosintética que involucra la conversión de la energía luminica en ATP. (parte (a) de C. Lamaze y cols., 1997, *Journal of Biological Chemistry* 272:20332; parte (b) de la colección F. Palade; parte (c) de L. W. Haworth, 1981, *The Cell*, 2^a ed., Saunders, p. 415; parte (d) cortesía de Bioglycogen Associates/M. C. Ledbetter/Brookhaven National Laboratory)

creción son sintetizadas en el retículo endoplasmático, transportadas a través del complejo de Golgi y liberadas desde la célula, este proceso completo se conoce colectivamente como *vía secretora*, aunque tam-

bién incluye la síntesis y el transporte de proteínas de membrana que permanecerán en el retículo endoplasmático, el complejo de Golgi y la membrana plasmática y, por ende, no se secretan. Estas también

llamadas *vías de tránsito a las membranas* comprenden tanto vías endocíticas como secretoras, y se analizan en detalle en el Capítulo 14.

Otro orgánulo común es el **peroxisoma**, una clase de orgánulo esférico que contiene *oxidasas* —enzimas que usan oxígeno molecular para oxidar toxinas para elaborar productos inofensivos y para la oxidación de ácidos grasos para la producción de grupos acetilos, un tema que se trata en el Capítulo 12.

Todos los orgánulos que se analizaron hasta el momento están encerrados por una única membrana de bicapa lipídica. Algunos orgánulos, como el **núcleo**, las **mitocondrias** y, en las células vegetales, los **cloroplastos** tienen una membrana adicional que cumple diversas funciones, como se describe a continuación.

El núcleo contiene el DNA del genoma y es el sitio de transcripción del DNA a RNA mensajero. El núcleo tiene una membrana interna que define al núcleo en sí mismo. También contiene una membrana externa que se continúa con la membrana del retículo endoplasmático de tal forma que el espacio entre la membrana interna y la externa se continúa con el retículo endoplasmático (véase la Fig. 9-32). El acceso al interior y al exterior del núcleo es proporcionado por conexiones tubulares entre las membranas interna y externa estabilizadas por estructuras llamadas **poros nucleares**. Los poros nucleares no solo definen el sitio de transporte a través de la membrana nuclear sino que actúan como porteros, que permiten solo el transporte de macromoléculas hacia afuera y hacia adentro del núcleo —un tema importante y fascinante que se mencionó en el Capítulo 8 y será analizado en más detalle en el Capítulo 13—.

Las mitocondrias y los cloroplastos se cree que evolucionaron a partir de un acontecimiento hace mucho tiempo cuando una célula eucarionte engulló un tipo de bacteria que dio origen a las mitocondrias y una clase diferente que dio origen a los cloroplastos. Esas mitocondrias y esos cloroplastos tienen dos membranas y es la evidencia que avala esta hipótesis. La membrana interna es muy probable que haya derivado de la membrana original de la bacteria, mientras que la membrana externa es un vestigio de la membrana plasmática del acontecimiento de engullido. Existe mucha evidencia del origen bacteriano de estos orgánulos, que incluye el hecho de que las mitocondrias y los cloroplastos tienen ambos su propio genoma de DNA y la biosíntesis de las proteínas en estos orgánulos es más similar a la síntesis proteica bacteriana que a la de eucariontes.

Las mitocondrias pueden ocupar casi el 25% del volumen del citoplasma. Son orgánulos similares a cuentas en los cuales la membrana externa contiene proteínas porinas que tornan permeable a la membrana para incorporar moléculas de un peso molecular de hasta 10 000. La membrana mitocondrial interna está altamente plegada, con invaginaciones llamadas *crestas* que sobresalen hacia el espacio central interno, llamado *matriz* (Fig. 9-33c). Una función principal de la mitocondria es la de completar las etapas finales de la degradación de la glucosa mediante oxidación para generar la mayor parte del ATP suministrado a la célula. Así, las mitocondrias pueden considerarse las “centrales de energía” de la célula.

Todas las plantas y algas verdes se caracterizan por la presencia de cloroplastos (Fig. 9-33d), orgánulos que usan la *fotosíntesis* para capturar la energía lumínica con pigmentos coloreados, incluido el pigmento verde *clorofila*, y, en última instancia, almacenar la energía capturada en la forma de ATP. Los procesos mediante los cuales se sintetiza ATP en las mitocondrias y los cloroplastos se describen en el Capítulo 12.

La rotura de las células libera sus orgánulos y otros contenidos

El paso inicial en la purificación de las estructuras subcelulares es liberar los contenidos de la célula mediante rotura de la membrana plasmática y la pared celular, si está presente. Primero, se suspenden las células en una solución de pH y contenido salino adecuados, en general sacarosa isotónica (0,25 M) o una combinación de sales similar en composición a la del interior de la célula. Muchas células se pueden romper mediante agitación de la suspensión celular en una licuadora de alta velocidad o por exposición a sonido de frecuencia ultraalta (*sonicación*). Alternativamente, las membranas plasmáticas se pueden romper mediante homogeneizadores especiales de tejido presurizados en los cuales las células son forzadas a pasar a través de un espacio muy estrecho entre un émbolo y la pared del vaso; la presión de forzar las células a pasar entre la pared del vaso y el émbolo rompe la célula.

Recuérdese que el agua fluye al interior de las células cuando son colocadas en una solución hipotónica, es decir, una con una concentración menor de iones y pequeñas moléculas que la que se encuentran en el interior de la célula. Este flujo osmótico se puede usar para que las células se hinchen, lo que debilita a la membrana plasmática y facilita su ruptura. En general, la solución celular se mantiene a 0 °C para una mejor preservación de las enzimas y otros componentes después de liberarlas de las fuerzas de estabilización de la célula.

La rotura de la célula produce una mezcla de componentes celulares suspendidos, el homogenado, a partir del cual se obtienen los orgánulos. Debido a que el hígado de rata contiene abundancia de tipos celulares únicos, este tejido se utiliza en muchos estudios clásicos de orgánulos celulares. Sin embargo, los mismos principios de aislamiento se aplican a virtualmente todas las células y tejidos, y las modificaciones de estas técnicas de fraccionamiento celular se pueden usar para separar y purificar cualquier componente deseado.

La centrifugación puede separar muchos tipos de orgánulos

En el Capítulo 3 se consideraron los principios de centrifugación y los usos de técnicas de centrifugación para la separación de proteínas y ácidos nucleicos. Se utilizan técnicas similares para separar y purificar los diversos orgánulos, que difieren tanto en tamaño como en densidad y, por lo tanto, sufren sedimentación a velocidades diferentes.

La mayoría de los procedimientos de fraccionamiento celular comienzan con la *centrifugación diferencial* de un homogenado celular filtrado a velocidades crecientes (Fig. 9-34). Después de la centrifugación a cada velocidad durante un tiempo adecuado, el líquido que permanece en la parte superior del recipiente, denominado *sobrenadante*, es separado y centrifugado a velocidad más elevada. Las fracciones de precipitado obtenidas por centrifugación diferencial en general contienen una mezcla de orgánulos, aunque los núcleos y las partículas virales a veces pueden ser purificados por completo mediante este procedimiento.

Una fracción de orgánulos impuros obtenidos por centrifugación diferencial puede ser purificada aún más mediante *centrifugación por gradiente de densidad*, que separa los componentes celulares de acuerdo con sus densidades. Después de volver a suspender la fracción, esta forma una capa en la parte superior de una solución que contiene un gradiente de una sustancia no iónica densa (p. ej., sacarosa o glicerol).

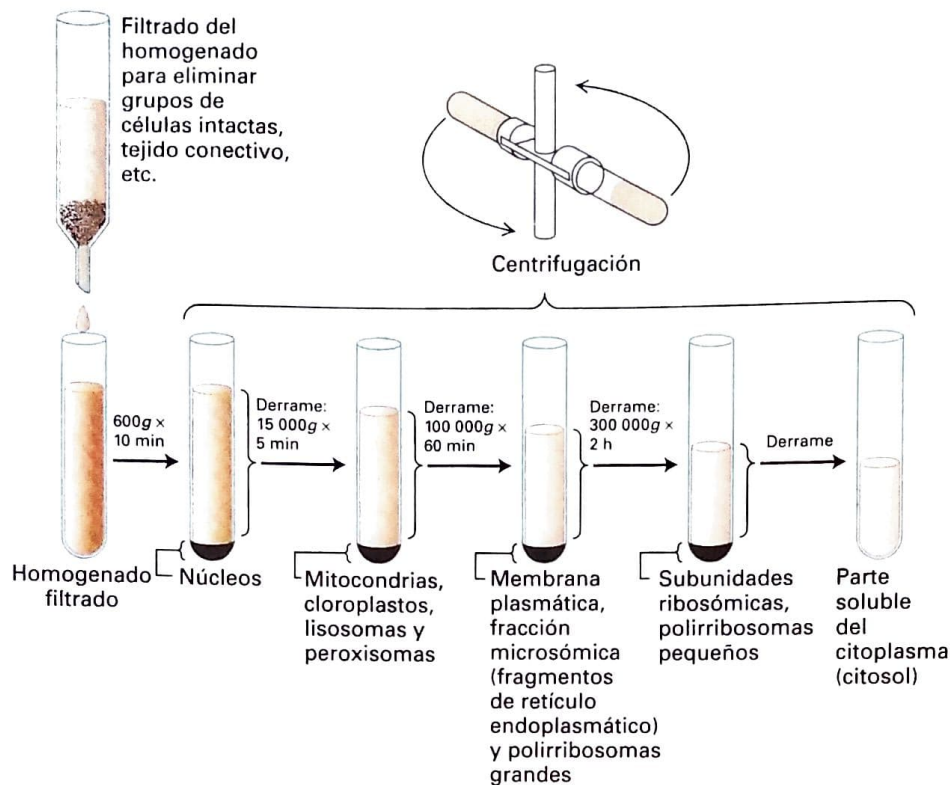


FIGURA 9-34 La centrifugación diferencial es el primer paso en el fraccionamiento de un homogenado celular. El homogenado resultante de la degradación celular suele filtrarse para eliminar las células intactas y luego se centrifuga a una velocidad baja para precipitar selectivamente el núcleo –el orgánulo más grande–. El material que no se deposita (el sobrenadante) es a continuación centrifugado a una velocidad más alta para sedimentar las mitocondrias, los cloroplastos, los lisosomas y los peroxisomas. Centrifugaciones

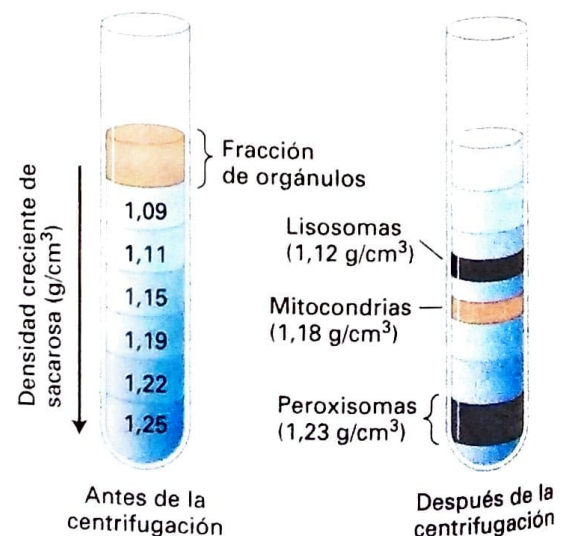
subsiguientes en la ultracentrífuga a 100 000 g durante 60 minutos produce depósitos de la membrana plasmática, fragmentos del retículo endoplasmático y polirribosomas grandes. La recuperación de subunidades ribosómicas, polirribosomas pequeños y partículas como complejos de enzimas requiere la centrifugación adicional a velocidades aún mayores. Solo el citosol –la parte acuosa soluble del citoplasma– permanece en el sobrenadante después de centrifugaciones a 300 000 g durante 2 horas.

El tubo es centrifugado a alta velocidad (alrededor de 40 000 rpm) durante varias horas, lo que permite que cada partícula migre hacia una posición de equilibrio donde la densidad del líquido que la rodea es igual a la densidad de la partícula (Fig. 9-35). Las diferentes capas de líquido luego son recuperadas mediante bombeo de los contenidos del tubo de centrifuga a través de una pieza estrecha de tubular y recolección de las fracciones.

Debido a que cada orgánulo tiene características morfológicas únicas, la pureza de las preparaciones de orgánulos se puede evaluar mediante examen en un microscopio electrónico. Alternativamente, se

pueden cuantificar las moléculas marcadoras específicas de orgánulos. Por ejemplo, la proteína citocromo c está presente solo en la mitocondria, por lo tanto la presencia de esta proteína en una fracción de lisosomas podría indicar su contaminación por mitocondrias. De modo similar, la catalasa está presente solo en los peroxisomas, la fosfatasa

FIGURA 9-35 La fracción de orgánulos mezclados puede separarse aún más mediante centrifugación por gradiente de densidad. En este ejemplo, en el que se utiliza hígado de rata, el material en el precipitado de la centrifugación a 15 000g (véase la Fig. 9-34) se vuelve a suspender y se encuentra como una capa sobre un gradiente de solución de sacarosa de densidad creciente en un tubo de centrifuga. Durante la centrifugación por varias horas, cada orgánulo migra a su equilibrio de densidad apropiado y permanece allí. Para obtener una buena separación de lisosomas respecto de las mitocondrias, el hígado se perfunde con una solución que contiene una cantidad pequeña de detergente antes de que el tejido sea disgregado. Durante el período de perfusión, el detergente es incorporado a las células mediante endocitosis y transferido a los lisosomas, tornándolos menos densos de lo que normalmente sería y permitiendo una separación “limpia” de los lisosomas respecto de las mitocondrias.



acida solo en los lisosomas y los ribosomas solo en el retículo endoplasmático rugoso o el citosol.

Los anticuerpos específicos de orgánulos son útiles en la preparación de orgánulos altamente purificados

Las fracciones celulares que permanecen después de la centrifugación por gradiente de densidad y de la centrifugación diferencial suelen contener más de un tipo de orgánulo. Los anticuerpos monoclonales para varias proteínas de membrana específicas de orgánulo son una herramienta poderosa para la posterior purificación de las fracciones. Un ejemplo es la purificación de vesículas cuyas superficies externas están cubiertas por la proteína **clatrina**; estas vesículas recubiertas derivan de las invaginaciones recubiertas en la membrana plasmática durante la endocitosis mediada por receptor (véase la Fig. 9-33a), un tema que se analiza en detalle en el Capítulo 14. Un anticuerpo para clatrina, unido a un transportador bacteriano, puede unir selectivamente estas vesículas en una preparación cruda de membranas, y luego el complejo de anticuerpos entero se puede aislar mediante centrifugación a baja velocidad (Fig. 9-36). Una técnica relacionada utiliza esferas metálicas diminutas recubiertas por anticuerpos específicos. Los orgánulos que se unen a los anticuerpos, y que se unen a las esferas metálicas, son recuperados de la preparación mediante adhesión a un imán pequeño al costado del tubo de ensayo.

Todas las células contienen docenas o más de diferentes tipos de pequeñas vesículas rodeadas de membrana de alrededor del mismo

tamaño (50-100 nm de diámetro) y densidad, lo cual las torna difíciles de separar unas de otras mediante técnicas de centrifugación. Las técnicas inmunológicas son particularmente útiles para purificar clases específicas de tales vesículas. Las células musculares y las células grasas, por ejemplo, contienen un transportador de glucosa particular (GLUT4) que está localizado en la membrana de unos de estos tipos de vesículas. Cuando se añade insulina a las células, estas vesículas se fusionan con la membrana plasmática e incrementa el número de transportadores de glucosa capaces de incorporar glucosa desde la sangre. Como se vio en el Capítulo 15, este proceso es crítico para mantener la concentración adecuada de azúcar en la sangre. Las vesículas que contienen GLUT4 se pueden purificar utilizando un anticuerpo que se une a un segmento de la proteína GLUT4 que se encuentra hacia el citosol. Igualmente, las diversas vesículas que se describen en el Capítulo 14 se caracterizan por proteínas de superficies únicas que permiten sus separaciones con la adición de anticuerpos específicos.

Cuando no se encuentran disponibles anticuerpos específicos para los orgánulos se utiliza una variación de esta técnica. Un gen que codifica una proteína de membrana específica de orgánulo es modificado por la adición de un segmento que codifica un marcaje con epítopo; el marcaje se coloca sobre un segmento de la proteína orientada hacia el citosol. A continuación de la expresión estable de la proteína recombinante en la célula en estudio, se puede usar un anticuerpo monoclonal contra ese epítopo (descrito anteriormente) para purificar el orgánulo.

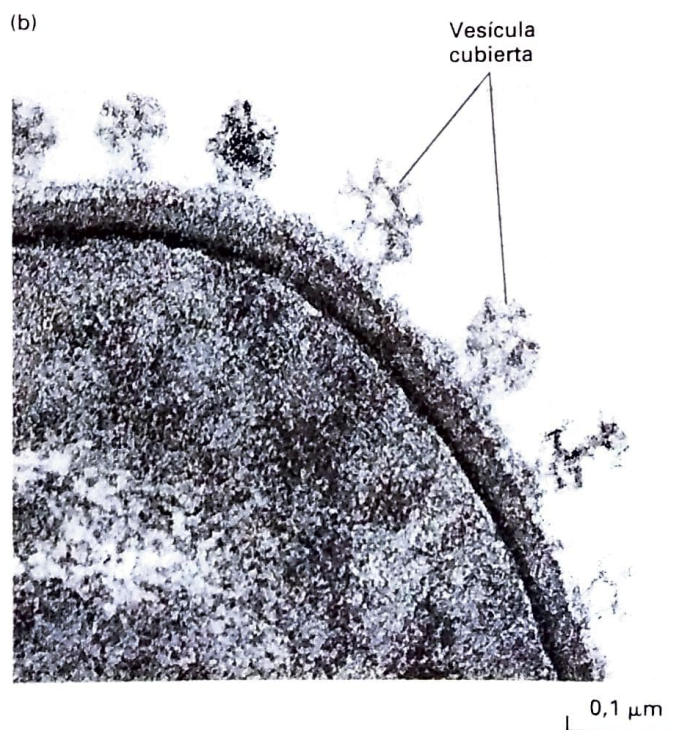
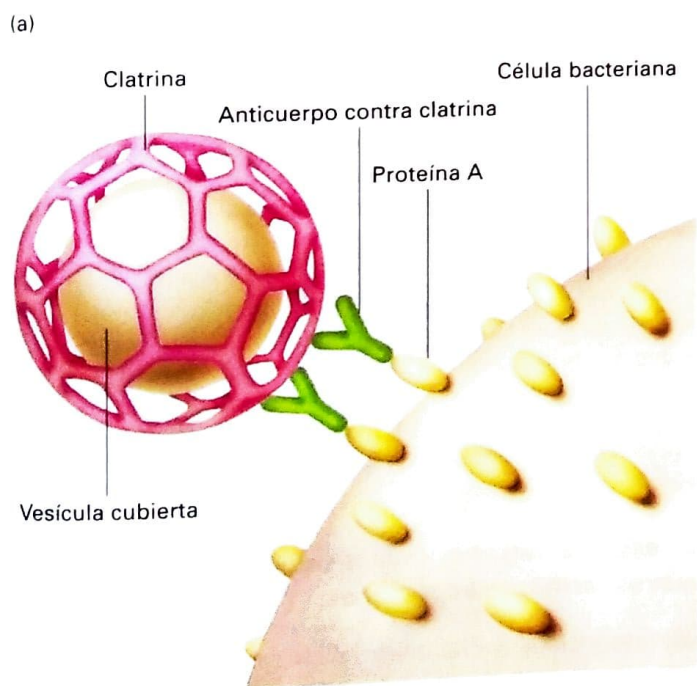


FIGURA 9-36 Se pueden purificar pequeñas vesículas recubiertas mediante la unión de un anticuerpo, unido a células bacterianas, específico para una proteína de superficie de las vesículas. En este ejemplo, se incubó una suspensión de membranas de hígado de rata con un anticuerpo específico para clatrina, una proteína que cubre la superficie externa de ciertas vesículas citosólicas. A esta mezcla se añade una suspensión de bacterias *Staphylococcus aureus* muertas, cuya membrana de superficie contiene proteína A.

que se une a la región constante (Fc) de los anticuerpos. (a) La interacción de la proteína A con los anticuerpos unidos a las vesículas recubiertas con clatrina une las vesículas a las células bacterianas. Los complejos vesícula-bacteria pueden ser recuperados mediante centrifugación a baja velocidad. (b) Una microfotografía electrónica de corte delgado revela las vesículas recubiertas con clatrina unidas a una célula de *S. aureus*. (Véase E. Merisko y cols., 1982, *J. Cell Biol.* 93:46. Microfotografía cortesía de G. Palade.)

La proteómica revela la composición de proteínas de los orgánulos

Para identificar todas las proteínas en un orgánulo se requieren tres pasos. Primero, uno tiene que ser capaz de obtener el orgánulo en alta pureza. Segundo, se debe tener una forma de identificar todas las secuencias de las proteínas en el orgánulo. Esta identificación suele realizarse mediante digestión de todas las proteínas con una proteasa tal como la tripsina, que corta todos los polipéptidos en los residuos de lisina y arginina, y luego determinar la masa y la secuencia de todos estos péptidos mediante espectrometría de masa. Tercero, uno tiene que tener la secuencia genómica para identificar las proteínas a partir de las cuales provienen todos los péptidos. De esta forma se ha determinado el “proteoma” de muchos orgánulos. A modo de ejemplo, un estudio proteómico reciente en mitocondrias purificadas a partir de cerebro, corazón, riñón e hígado murinos reveló 591 proteínas mitocondriales, incluidas 163 proteínas que no se sabía con anterioridad que estaban asociadas con este orgánulo. Se encontraron diversas proteínas en las mitocondrias solo en tipos celulares específicos. El principal objetivo de la investigación actual de este orgánulo es la determinación de las funciones asociadas con estas proteínas mitocondriales recientemente descubiertas.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 9.4

Aislamiento y caracterización de orgánulos celulares

- La microscopia ha revelado un conjunto común de orgánulos presentes en las células eucariontes (véase la Fig. 9-32).
- La rotura de las células por homogeneización vigorosa, sonicación u otras técnicas liberan estos orgánulos. La hinchazón de las células en una solución hipotónica debilita la membrana plasmática y facilita su rotura.
- La centrifugación diferencial secuencial de un homogenado celular produce fracciones de orgánulos parcialmente purificados que difieren en masa y densidad.
- La centrifugación de gradiente de densidad, que separa los componentes celulares de acuerdo con sus densidades, puede purificar aún más las fracciones celulares obtenidas por centrifugación diferencial.
- Las técnicas inmunológicas que utilizan anticuerpos contra proteínas de membrana específicas de orgánulo son particularmente útiles en la purificación de orgánulos y vesículas de tamaños y densidades similares.
- El análisis de proteómica puede identificar todos los componentes proteicos en una preparación de un orgánulo purificado.

9.5 Perturbación de funciones celulares específicas

¿Qué técnicas generales utilizan los científicos para comprender la función de proteínas específicas en los procesos biológicos celulares? En el

Capítulo 3 hemos analizado cómo se pueden purificar las proteínas y caracterizar sus propiedades en detalle. En muchos casos, esto ha llevado a la reconstrucción bioquímica de procesos bioquímicos complicados, tales como la replicación del DNA o la síntesis proteica. Estas técnicas bioquímicas se han complementado con técnicas genéticas, y como se vio en el Capítulo 5, se pueden utilizar mutaciones para identificar genes cuyos productos cumplen funciones específicas. Como se verá en los Capítulos 14 y 19, se utilizaron búsquedas genéticas clásicas en levadura para identificar proteínas que participan en la vía secretora y en el ciclo celular, respectivamente. Las técnicas genéticas en otros organismos, como el gusano nematodo, la mosca de la fruta y el ratón, han contribuido en gran medida a descubrir los aspectos básicos de la biología y el desarrollo celulares (véase el Cap. 1).

Durante los últimos años, se han desarrollado técnicas nuevas muy poderosas para modificar componentes específicos en las células vivas y así esclarecer sus funciones. En esta sección analizaremos dos de estas técnicas: el uso de químicos específicos para perturbar la función celular y el uso del RNA de interferencia para suprimir la expresión de genes específicos.

En biología celular se utilizan fármacos

Desde hace siglos se utilizan fármacos que se producen naturalmente, pero no se conocía cómo funcionaban con exactitud. Por ejemplo, extractos de azafrán de la pradera se utilizaban para tratar la gota, una enfermedad que resulta de la inflamación de las articulaciones. En la actualidad se sabe que el extracto contiene colchicina, un fármaco que despolimeriza los microtúbulos e interfiere con la capacidad de los glóbulos blancos de moverse hacia los sitios de la inflamación (véase el Cap. 18). Alexander Fleming descubrió que ciertos hongos secretan compuestos que matan bacterias (antibióticos), lo que dio como resultado el descubrimiento de la penicilina. Solo después se descubrió que la penicilina inhibe la división bacteriana mediante bloqueo del ensamblaje de las paredes celulares de ciertas bacterias.

Muchos ejemplos como este dieron como resultado el descubrimiento de una amplia gama de fármacos disponibles para inhibir procesos específicos y esenciales de las células. En la mayoría de los casos, los investigadores han sido capaces de identificar finalmente los blancos moleculares del fármaco. Por ejemplo, hay muchos otros antibióticos que afectan aspectos de la síntesis de proteínas procariontes. En el Cuadro 9-1 se enumera una selección de algunos de los fármacos que se utilizan con mayor frecuencia y que afectan a una amplia variedad de procesos biológicos celulares, agrupados de acuerdo con el proceso que inhiben.

Las exploraciones químicas pueden identificar nuevos fármacos específicos

¿Cómo se realiza el descubrimiento de fármacos nuevos? Un método muy utilizado hace uso de las *bibliotecas químicas* que consisten en 10 000 a 100 000 compuestos diferentes para buscar químicos que inhiban un proceso específico. La búsqueda de bibliotecas químicas en conjunto con las técnicas de microscopia de alto rendimiento se ha convertido en la actualidad en una de las vías principales que llevan al descubrimiento de fármacos. Aquí se verá un caso para ilustrar cómo funciona este tipo de enfoque.

En nuestro ejemplo (Fig. 9-37a), los investigadores querían identificar compuestos que inhiban la mitosis, el proceso donde los cromosomas

Cuadro 9-1 Grupo seleccionado de moléculas pequeñas utilizadas en investigación biológica celular

Algunas de las siguientes moléculas tienen una especificidad amplia, mientras que otras son altamente específicas. En los capítulos relevantes de este libro se puede encontrar más información de muchos de estos compuestos.

Inhibidores de la replicación del DNA	Afidicolina (inhibidor de la DNA polimerasa eucarionte); camptotecina, etopósido (inhibidores de topoisomerasa eucarionte)
Inhibidores de la transcripción	α -amanitina (inhibidor de la RNA polimerasa II); actinomicina D (inhibidor de la elongación de la transcripción eucarionte); rifampicina (inhibidor de la RNA polimerasa bacteriana); tiolutina (inhibidor de la RNA polimerasa bacteriana y de levadura)
Inhibidores de la síntesis de proteína-bloqueo de la producción general de proteínas; tóxico después de exposición prolongada	Cicloheximida (inhibidor de la traducción en eucariontes); geneticina/G418, higromicina, puromicina (inhibidores de la traducción en bacterias y eucariontes); cloranfenicol (inhibidor de la traducción en bacterias y mitocondrias); tetraciclina (inhibidor de la traducción en bacterias)
Inhibidores de proteasas-bloqueo de la degradación de proteínas	MG-132, lactacistina (inhibidores de proteosoma); E-64, leupeptina (inhibidores de serina o cisteína proteasa); fenilmetanosulfonilfluoruro (PMSF) (inhibidor de serina-proteasa); tosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK) (inhibidor de serina-proteasa similar a tripsina)
Compuestos que afectan al citoesqueleto	Faloidina; jasplaquinolida (estabilizador de F-actina); latrunculina, citocalasina (inhibidores de la polimerización de F-actina); taxol (estabilizador de microtúbulos); colchicina, nacodazol, vinblastina, podofilotoxina (inhibidores de la polimerización de microtúbulos); monastrol (inhibidor de cinesina-5)
Compuestos que afectan el tránsito de membrana, el movimiento intracelular y la vía secretora, glucosilación de proteínas	Brefeldina A (inhibidor de secreción); leptomicina B (inhibidor de la exportación de proteína nuclear); dinasora (inhibidor de la dinamina); tunicamicina (inhibidor de la glucosilación ligada a N)
Inhibidores cinasa	Genisteína, rapamicina, Glivec® (inhibidores de tirosina-cinasa con varias especificidades); wortmanina, LY294002 (inhibidores de la PI3 cinasa); estaurosporina (inhibidor de proteína-cinasa); roscovitina (inhibidores de CDK1 y CDK2 del ciclo celular)
Inhibidores de fosfatasa	Ciclosporina A, FK506, calcicolina (inhibidores de proteína-fosfatasa con diversas especificidades); ácido ocaidaico (inhibidor general de serina/treonina-fosfatasa); óxido de fenilarsina, ortovanadato de sodio (inhibidores de tirosina-fosfatasa)
Compuestos que afectan a las concentraciones de cAMP intracelular	Foskolina (activador de adenilato ciclasa)
Compuestos que afectan a los iones (p. ej., K^+ Ca^{2+})	A23187 (ionóforo de Ca^{2+}); valinomicina (ionóforo de K^+); BAPTA (agente de unión/capturador de catión divalente [p. ej., Ca^{2+}]); tapsigargina (inhibidor de ATPasa de Ca^{2+} de retículo endoplasmático); ouabaina (inhibidor de Na^+/K^+ ATPasa)
Algunos fármacos utilizados en medicina	Propanolol (antagonista de receptor β -adrenérgico), estatinas (inhibidores de HMG-CoA reductasa, bloquea la síntesis de colesterol)

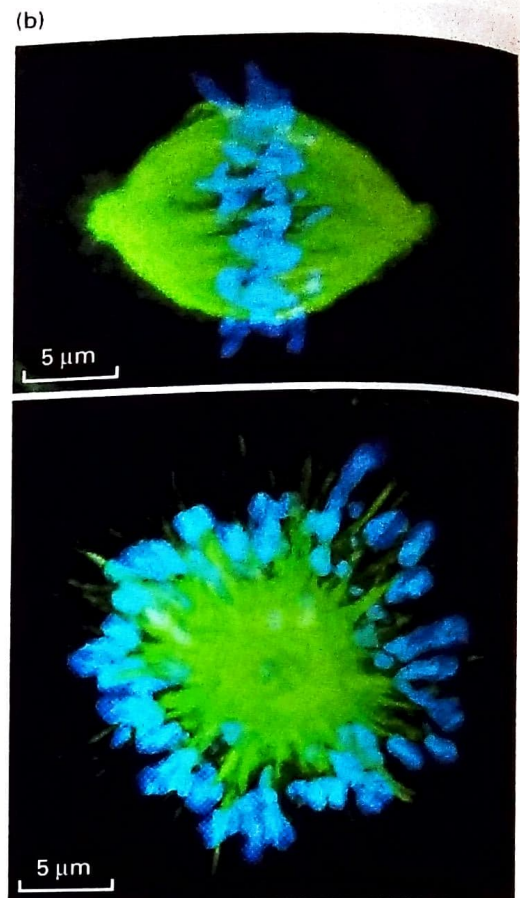
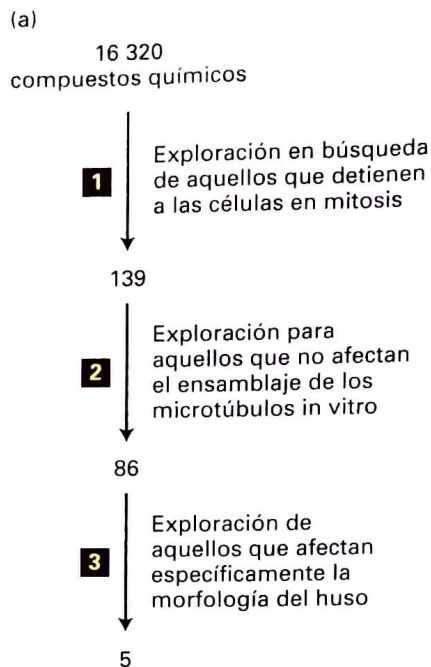
somas duplicados son segregados en forma precisa por una maquinaria basada en microtúbulos llamada huso mitótico (descrito en el Cap. 18). Se sabe que si está comprometido el ensamblaje, las células se detienen en mitosis. Por ende, la búsqueda primero utiliza un método de robótica automatizado para buscar compuestos que detengan a las células en mitosis. Las bases para la inhibición de los compuestos candidatos luego se analizaron para ver si afectaban el ensamblaje de los microtúbulos. Puesto que la inhibición del ensamblaje de los microtúbulos no era de interés, el efecto de los candidatos restantes en la estructura del huso se determinó por microscopía de inmunofluorescencia con

anticuerpos contra tubulina, la principal proteína de los microtúbulos. De los 16 000 compuestos rastreados, se identificó un compuesto en células con husos anómalos –en lugar de tener dos ásteres, tenían un único áster, que se denominó disposición monoastral– (Fig. 9-37b). Este fármaco, ahora conocido como *monastrol*, se encontró que interfiere con el ensamblaje del huso mediante inhibición de un motor basado en microtúbulos denominado cinesina 5 (véase el Cap. 18 para más detalles acerca del huso mitótico). En la actualidad se conocen derivados de monastrol que están siendo analizados como agentes antitumorales para el tratamiento de ciertos cánceres.

FIGURA 9-37 Búsqueda sistemática de fármacos que afectan a los procesos biológicos específicos.

En este ejemplo, una biblioteca química de 16 320 químicos diferentes se sometió a una serie de detecciones sistemáticas para inhibidores de mitosis. Debido a que un inhibidor se espera que detenga a las células en la etapa mitótica del ciclo celular, la primera exploración o búsqueda **1** fue ver si cualquiera de los químicos incrementaba la concentración de un marcador para células mitóticas, y esto produjo 139 candidatos. Los microtúbulos forman la estructura de los husos mitóticos, y los investigadores no estaban interesados en fármacos nuevos dirigidos contra los microtúbulos, de manera tal que en la segunda exploración **2** probaron a los 139 compuestos por su capacidad de afectar el ensamblaje de los microtúbulos, y esto eliminó 53 candidatos. Después se utilizó la microscopia de inmunofluorescencia con anticuerpos contra la tubulina (la principal subunidad de los microtúbulos) junto con una tinción para el DNA en la tercera exploración **3** para identificar los compuestos que interrumpieron la estructura del huso. (b) La localización de la tubulina (verde) y el DNA (azul) se muestra para un huso mitótico no tratado y uno tratado con uno de los compuestos recuperados, ahora llamado monastrol. El monastrol inhibe a un motor basado en microtúbulos llamado cinesina 5, analizado en el Capítulo 18, necesario para separar los polos del huso mitótico. Cuando la cinesina 5 está inhibida, los dos polos permanecen asociados para dar un huso monopolar. (Parte [b] T. U.

Mayer y cols., *Science* **286**:971-974.)



Los RNA de interferencia pequeños (siRNA) pueden inhibir la expresión de proteínas específicas

La interferencia por RNA (RNAi) es un mecanismo que utilizan las células para silenciar la expresión de los genes ya sea mediante bloqueo de la traducción de mRNA específicos a través de los microRNA (miRNA) o por degradación de los mRNA específicos mediante los RNA de interferencia pequeños (siRNA). El amplio uso de los miRNA para regular la expresión génica, en especial durante el desarrollo, se analizó en el Capítulo 8. Aquí nos centraremos en el uso experimental de la tecnología de siRNA para suprimir la expresión de genes en células animales.

El descubrimiento de la vía siRNA surge a partir de muchas observaciones. Por ejemplo, se descubrió en las plantas que la expresión recombinante de un gen podía llevar a la regulación negativa del gen diana en lugar de al resultado esperado de aumento de la expresión. En el nematodo *C. elegans* se observó un tipo de resultado similar. Al investigar este fenómeno, Andrew Fire y Craig Mello informaron en 1998 que la supresión no se podía lograr por medio de la expresión del mRNA en sentido o en antisentido, sino que era necesaria la expresión de RNA de doble hebra. Fire y Mello fueron galardonados con el premio Nobel en Fisiología o Medicina en 2006 por este descubrimiento. Trabajos posteriores en diversos sistemas demostraron que el RNA de doble hebra tiene que ser cortado por una proteína llamada Dicer para producir fragmentos doble hebra de 21 a 23 pares de bases con dos nucleótidos que sobresalen en cada uno de los extremos 3'. Este RNA de doble hebra es reconocido por RISC (complejo de silenciamiento indu-

cido por RNA [RNA-induced silencing complex]) y una de las hebras es degradada por la proteína argonauta asociada. Si la secuencia de siRNA de simple hebra se puede aparear exactamente con una secuencia de mRNA diana, el complejo RNA-proteína argonauta asociada corta el mRNA diana, que luego es degradado (Fig. 9-38a). Aunque este sistema probablemente evolucionó como un mecanismo de defensa contra virus invasores, ha proporcionado a los investigadores una herramienta muy poderosa para suprimir experimentalmente la expresión de genes particulares y explorar las consecuencias resultantes. Se ha utilizado muy eficazmente en muchos sistemas diferentes, como se resume a continuación.

Silenciamiento por siRNA en células cultivadas Desde el descubrimiento en 2001 de que el tratamiento de células cultivadas con siRNA inhibe la expresión génica mediante degradación del mRNA diana, los siRNA se han utilizado en miles de estudios para inhibir —o “silenciar”— las concentraciones de proteínas diana. Para realizar esto, los investigadores utilizan programas informáticos para identificar una secuencia de ~ 21 pares de bases en el mRNA que es única para el gen diana y tiene las características óptimas para el siRNA. Luego se sintetiza el RNA de doble hebra y se lo aplica a células en cultivo (Fig. 9-38a). Si es eficaz, esto resultará en la degradación del mRNA específico y no se sintetizará proteína diana nueva. Sin embargo, la proteína diana está presente al comienzo del experimento, por ende, las células son capaces de crecer y permitir que la proteína endógena experimente su recambio normal y se diluya con las divisiones celulares —esto suele necesitar de 24 a 72 horas—. La concentración de proteína diana suele determinarse

(a)

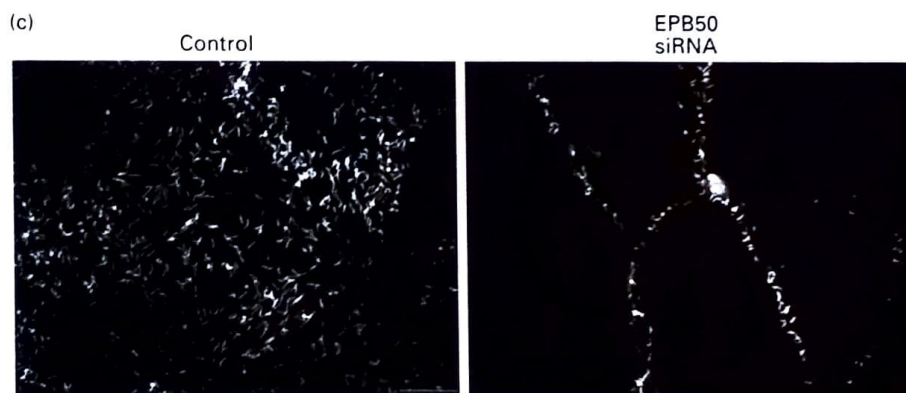
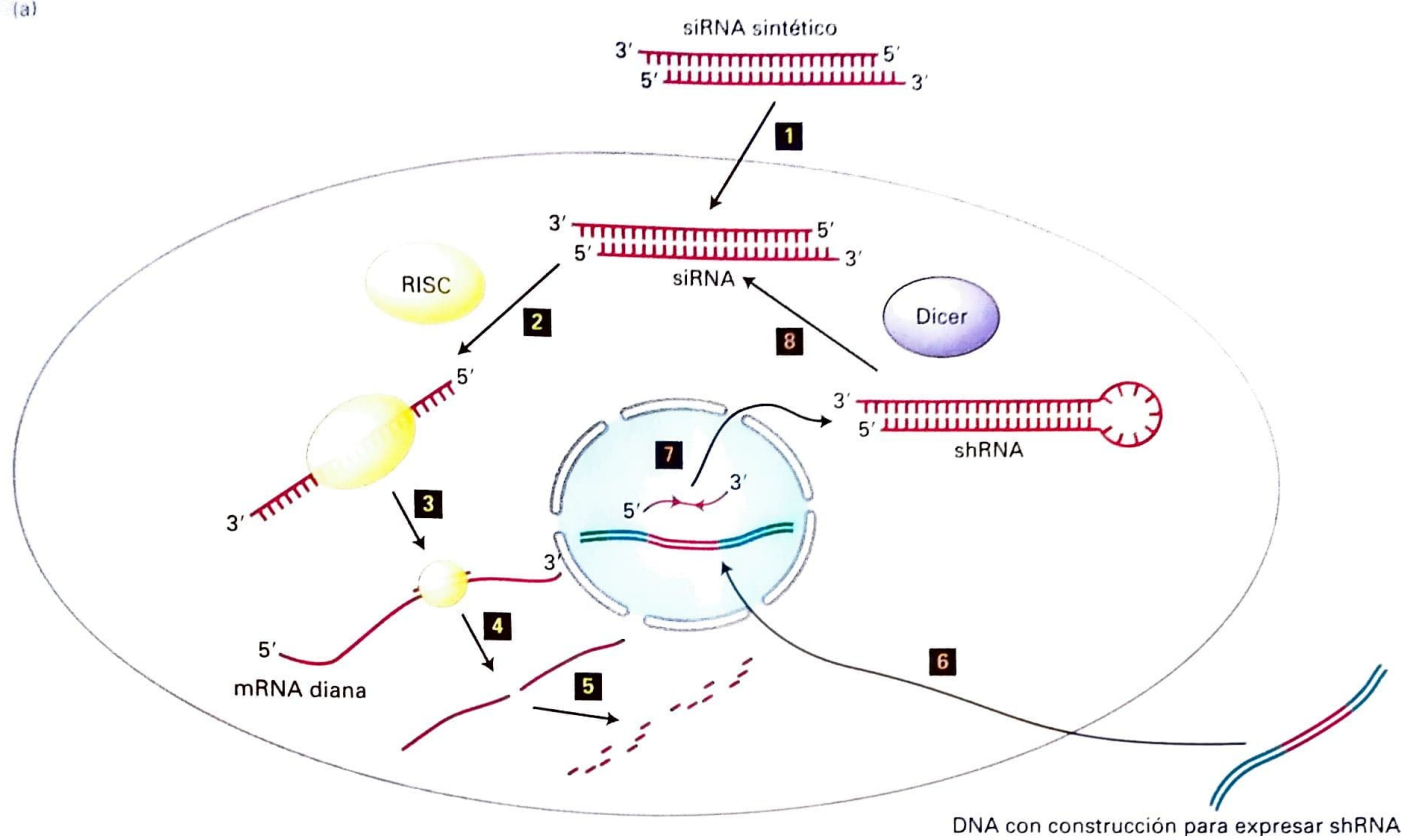


FIGURA 9-38 El siRNA y el DNA que expresan shRNA pueden utilizarse para la degradación de los mRNA específicos en células cultivadas.

En el primer paso (1), un siRNA de doble hebra que tiene homología con el mRNA diana es introducido a las células por transfección. Este RNA de doble hebra es reconocido por el complejo RISC (2) que degrada una hebra del RNA y dirige el mRNA con la secuencia homóloga (3). El mRNA diana es cortado (4) y degradado (5). En una estrategia alternativa, una construcción de DNA que contiene una secuencia que al ser transcrita formará una horquilla es introducida a la célula (6). Este DNA se puede introducir mediante transfección o llevarse en una partícula viral. En cualquier caso, es modificado genéticamente para que lleve con él un marcador seleccionable por fármaco (no se muestra), de manera tal que se puedan seleccionar las células en las cuales este DNA se integre al genoma. Cuando es transcrito (7) y transpor-

tado fuera del núcleo, la horquilla de RNA se convierte en un sustrato de la nucleasa Dicer para generar el siRNA adecuado. (b) Como ejemplo de esta tecnología, los investigadores querían analizar los efectos del silenciamiento de una proteína, llamada EBP50, que es un componente de la superficie celular de las microvellosidades (véase la Fig. 17-21d). Se diseñaron siRNA y sus capacidades para silenciar EBP50 en células cultivadas fue evaluada mediante una inmunotransferencia con anticuerpos EBP50 y anticuerpos para tubulina como control. (c) Después analizaron las células para las microvellosidades mediante tinción para la proteína específica ezrin. En estas secciones confocales en la parte superior de la célula, las células no tratadas tienen abundantes microvellosidades, mientras que las células en las que EBP50 ha sido silenciada solo tienen unas pocas microvellosidades alrededor de su periferia. (Partes (b) y (c) de Hanono y cols. *J. Cell Biol.* 175:893.)

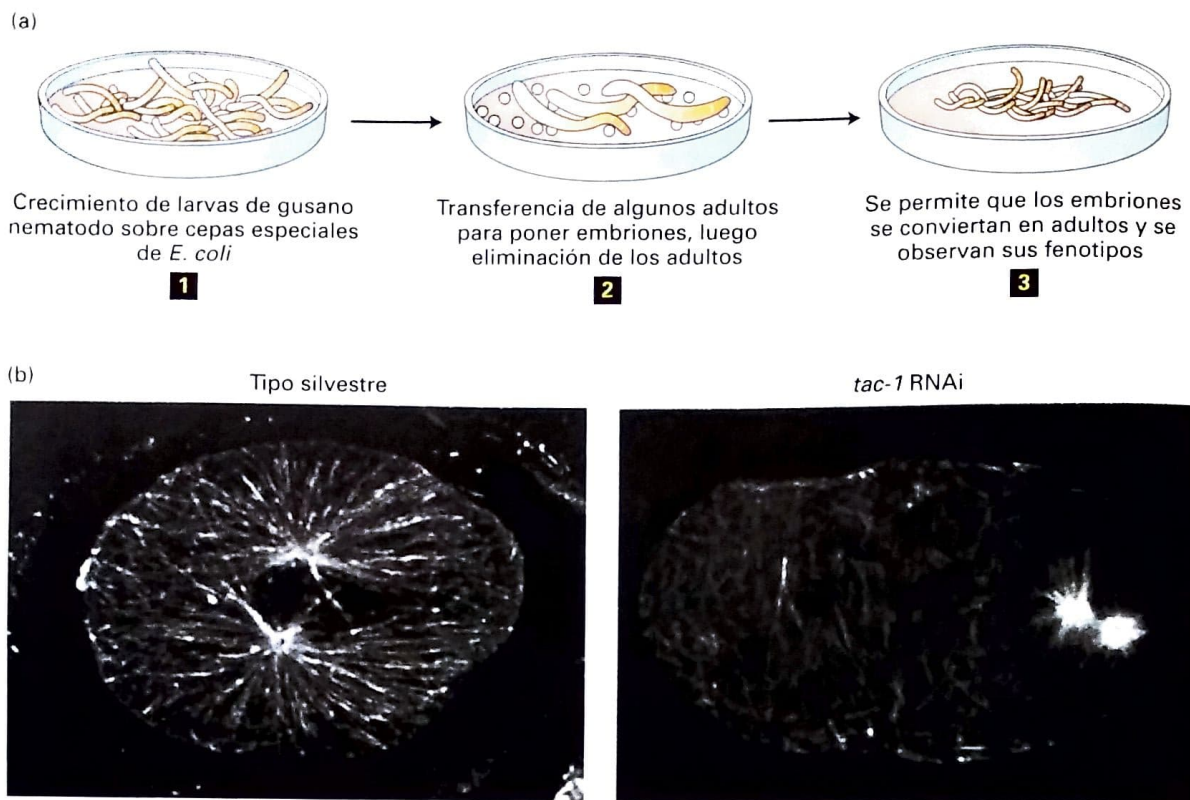


FIGURA 9-39 Las búsquedas por RNAi pueden explorar la función de todos los genes en el nematodo *Caenorhabditis elegans*. La determinación de la secuencia del genoma de *C. elegans* en 1998 reveló que contiene alrededor de 20 000 genes que codifican proteínas. Esta información abrió la posibilidad de usar RNAi para silenciar la expresión de cada gen para explorar qué efecto tendría. En la actualidad, esto se realiza de rutina. El nematodo puede vivir alimentándose de la bacteria *Escherichia coli*, y es posible expresar en la bacteria un segmento largo de RNA de doble hebra que corresponde a un único gen de nematodo. Notablemente, cuando el nematodo se alimenta de la bacteria, el RNA de doble hebra entra a las células del intestino y es reconocido por Dicer y procesado para dar los siRNA que se diseminan a casi todas las células en el animal. Por lo tanto, los investigadores han construido una biblioteca de cepas de *E. coli*, cada una de las cuales expresa el RNA de

doble hebra correspondiente a un gen de nematodo. (a) En este enfoque, se utiliza una cepa específica de *E. coli* para alimentar a larvas de nematodos **1** y se suprime la expresión del gen diana en la línea germinal. Debido a que estos nematodos son hermafroditas que se autofecundan (tienen los órganos reproductores de ambos sexos), no es necesario que se apareen sino que simplemente se deja que los gusanos adultos pongan huevos **2**. Cuando éstos crecen y se convierten en adultos, se puede evaluar el efecto de la RNAi en el gen diana. (b) En este ejemplo, los investigadores buscaban genes necesarios para el movimiento nuclear. Se identificó un gen llamado TAC-1, cuyo producto se localizó en los centrómeros y es necesario para la distribución normal de los microtúbulos, como lo revela la microscopía de inmunofluorescencia con anticuerpos contra tubulina. (Parte [b] de N. Le Bot y cols., *Current Biology* **13**:1499 (2003))

mediante inmunotransferencia (véase la Fig. 3-39) y, si se reduce significativamente, se analiza el fenotipo de la célula. La inhibición de la expresión génica por siRNA se ha convertido en una técnica estándar; en la Figura 9-38b y 9-38c se muestra un ejemplo y, a lo largo de todo el libro, se pueden encontrar muchos otros ejemplos.

Una estrategia alternativa para inhibir la expresión de proteínas es introducir construcciones de DNA adecuadas dentro de las células que generarán los siRNA cuando sean transcritas (véase la Fig. 9-38a). Para lograr esto, la secuencia blanco está presente como una repetición invertida en la secuencia de DNA. Cuando se transcribe, el mRNA formará una horquilla de RNA corto de doble hebra (shRNA), que es reconocida y cortada por Dicer para generar siRNA. Esta técnica tiene la ventaja de que una vez que se expresa el shRNA, siempre se sintetizan los siRNA, lo que da como resultado un silenciamiento permanente de la proteína diana. Esto no funcionará si la proteína es esencial, en cuyo caso el método de elección es tratar a las células con siRNA. La construcción de DNA para expresar shRNA se puede introducir en las células mediante adición simple de DNA en condiciones adecuadas para

permitir que las células lo incorporen o mediante el uso de vectores virales que introducen el DNA de modo más eficiente.

En la actualidad se están haciendo enormes esfuerzos para explorar los efectos de la inactivación de la expresión de cada gen en líneas celulares cultivadas y luego analizar sus efectos en vías específicas. Este esfuerzo está en sus etapas iniciales, por lo tanto, perfeccionamientos futuros proporcionarán una visión de la “biología de sistemas” de la organización y función celular.

La búsqueda genómica utiliza siRNA en el nematodo *C. elegans*

Cuando en 1998 se determinó la secuencia genómica registrada del gusano nematodo *Caenorhabditis elegans*, proporcionó el primer catálogo de todos los genes presentes en un animal. También proveyó la posibilidad de explorar la función de cada gen utilizando RNAi para suprimir la expresión de cada gen individual. En efecto, este nematodo

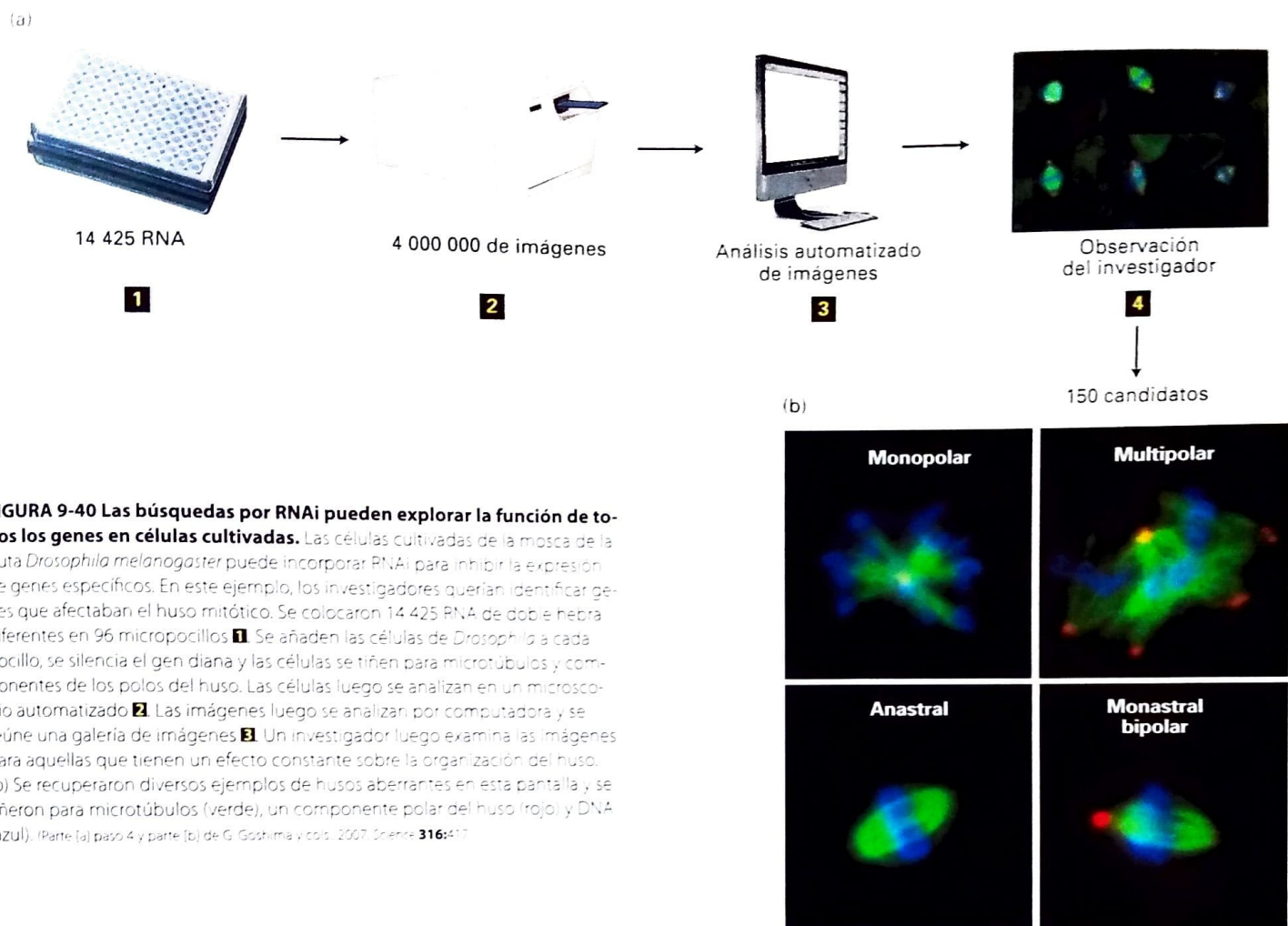


FIGURA 9-40 Las búsquedas por RNAi pueden explorar la función de todos los genes en células cultivadas. Las células cultivadas de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* puede incorporar RNAi para inhibir la expresión de genes específicos. En este ejemplo, los investigadores querían identificar genes que afectaban el huso mitótico. Se colocaron 14 425 RNA de doble hebra diferentes en 96 micropocillos **1**. Se añaden las células de *Drosophila* a cada pocillo, se silencia el gen diana y las células se tiñen para microtúbulos y componentes de los polos del huso. Las células luego se analizan en un microscopio automatizado **2**. Las imágenes luego se analizan por computadora y se reúne una galería de imágenes **3**. Un investigador luego examina las imágenes para aquellas que tienen un efecto constante sobre la organización del huso. (b) Se recuperaron diversos ejemplos de husos aberrantes en esta pantalla y se tiñeron para microtúbulos (verde), un componente polar del huso (rojo) y DNA (azul). (Parte (a) paso 4 y parte (b) de G. Goshima y cols., 2007, *Science* **316**:417).

fue el primer animal en el cual se intentó una búsqueda genómica por RNAi. *C. elegans* puede vivir alimentándose de la bacteria *E. coli*. Notablemente, si la bacteria expresa un RNA de doble hebra homólogo a un gen de nematodo, cuando las bacterias son ingeridas son degradadas y el RNA es absorbido a través del intestino, y luego es procesado por Dicer para suprimir la expresión del gen diana. Debido a que existen alrededor de 20 000 genes diferentes en el nematodo, se generaron muchas cepas de *E. coli* diferentes, cada una expresando RNA de doble hebra dirigido contra un gen nematodo específico. En un experimento típico para eliminar la expresión de un gen único (Fig. 9-39a), los nematodos son criados sobre las bacterias que expresan el RNA de doble hebra específico, y esto suprime la expresión del gen diana en sus embriones. Después de que los nematodos adultos han depositado sus huevos, son eliminados y se analiza el efecto sobre los embriones en crecimiento (Fig. 9-39b).

Búsquedas genómicas usando siRNA en moscas de la fruta La mosca de la fruta tiene alrededor de 14 000 genes que codifican proteínas, y se han desarrollado técnicas para explorar la consecuencia del uso de siRNA para suprimir cada una de estas en las células de mosca de la

fruta cultivadas. Debido al número elevado de genes para ser analizados, se desarrollaron técnicas automatizadas a gran escala (Fig. 9-40a). Por ejemplo, se fabricaron alrededor de 15 096 microplacas cada una conteniendo un RNA de doble hebra para un gen específico. Se añadieron las células y el RNA de doble hebra fue incorporado y procesado por Dicer para dar siRNA, que a su vez suprimieron la expresión del gen diana. Las células se pueden analizar para un fenotipo específico. En el ejemplo que se muestra en la Figura 9-40b, los investigadores exploraron el efecto de la supresión génica en las células detenidas en mitosis. Como esto es una búsqueda morfológica, las células se tiñen con marcadores adecuados y se utiliza un microscopio robótico para tomar imágenes que se analizan mediante un programa informático. De este modo ellos identificaron alrededor de 150 genes nuevos cuyos productos contribuyen a la mitosis y, por lo tanto, son excelentes candidatos para posteriores estudios de mayor profundidad.

A diferencia del nematodo recién descrito, no es posible eliminar la expresión de genes alimentando las larvas con RNA de doble hebra. Sin embargo, es posible utilizar RNAi para la supresión específica de tejido. Esto se logra con una mosca en la cual una horquilla de RNA específico se exprese detrás de una secuencia de activación corriente

arriba (UAS, *upstream-activating sequence*) para la proteína de unión al DNA Gal4. En ausencia de Gal4, la horquilla no se expresa, por lo tanto no se produce la supresión. Sin embargo, si Gal4 se expresa detrás de un promotor específico de tejido, se expresará en ese tejido, se unirá a la UAS y conducirá la expresión de la horquilla de RNA, que será procesada por Dicer para dar siRNA y suprimir al gen específico (Fig. 9-41a). El sistema se ha establecido de esta forma de manera tal que pueda realizarse a escala genómica: se han construido 14 000 líneas de moscas diferentes, cada una de las cuales con la UAS para regular la expresión de una horquilla específica para un gen diana. Cuando cada una de estas moscas se aparea con una mosca que porta el gen Gal4

específico de tejido, el efecto de la supresión de cada gen en el genoma puede evaluarse en cada tejido. Este tipo de técnica está actualmente en curso y se esperan resultados sorprendentes en el futuro cercano.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 9.5

Perturbación de funciones celulares específicas

- Las técnicas de genética han sido cruciales en el análisis de vías biológicas celulares complejas. En la actualidad, las técnicas genéticas se están extendiendo y complementando con búsquedas químicas y el uso de la tecnología por RNAi.
- Se pueden analizar bibliotecas químicas grandes en búsqueda de compuestos dirigidos contra procesos específicos para estudiar aquellos procesos e identificar componentes nuevos.
- El tratamiento de células cultivadas con siRNA adecuados conduce a la destrucción de los mRNA diana y, por lo tanto, al "silenciamiento" de la proteína codificada.
- Con la disponibilidad de los genomas registrados, las búsquedas de RNAi se pueden usar para investigar los efectos de la supresión de la expresión de cada gen individual en un organismo. Esto se ha logrado en el gusano nematodo y en células cultivadas a partir de la mosca de la fruta.
- La RNAi se puede utilizar para suprimir la expresión de genes específicos de tejido en un esquema específico de tejido; en la actualidad se está aplicando esta técnica a escala genómica en la mosca de la fruta.

Perspectivas para el futuro

Este capítulo ha introducido muchos aspectos de la tecnología que en la actualidad utilizan los biólogos celulares. La ciencia es conducida por la tecnología disponible y con cada desarrollo podemos mirar más profundamente en los misterios de la vida.

La capacidad para hacer crecer células en cultivo fue un avance gigante en tecnología –permitió a los investigadores analizar y explorar los funcionamientos internos de las células–. Las técnicas en cultivos celulares aún se encuentran en desarrollo; por ejemplo, en la actualidad contribuyen al fascinante desarrollo de la investigación de las células madre (véase el Cap. 21). Aunque la mayoría de los estudios utilizan placas planas para cultivar estas células, en el cuerpo estas forman estructuras tridimensionales. Las áreas más importantes de investigación están analizando en la actualidad las funciones de las células en ambientes tridimensionales y generando organizaciones celulares tridimensionales, como los tubos epiteliales, en sistemas de cultivo con soporte.

El descubrimiento y el uso de PFV y otras proteínas fluorescentes han revolucionado la biología celular. Al marcar las proteínas con PFV y seguir sus localizaciones en las células vivas se ha aclarado que el citoplasma de las células es mucho más dinámico de lo anteriormente previsto. Cada año aparecen nuevas tecnologías asociadas con las proteínas fluorescentes; técnicas como FRAP, FRET y TIRF se han convertido en herramientas generalizadas para explorar las dinámi-

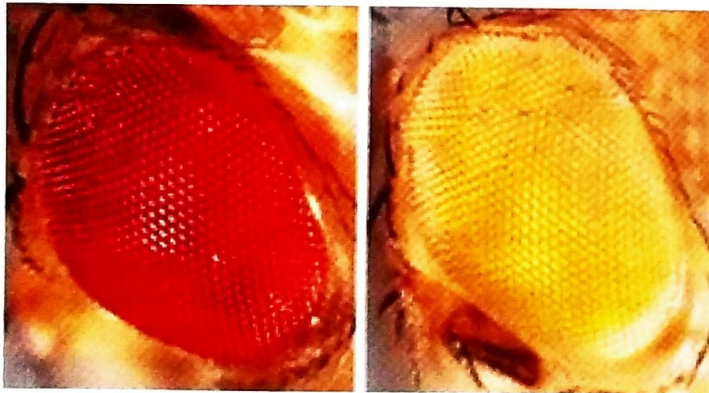
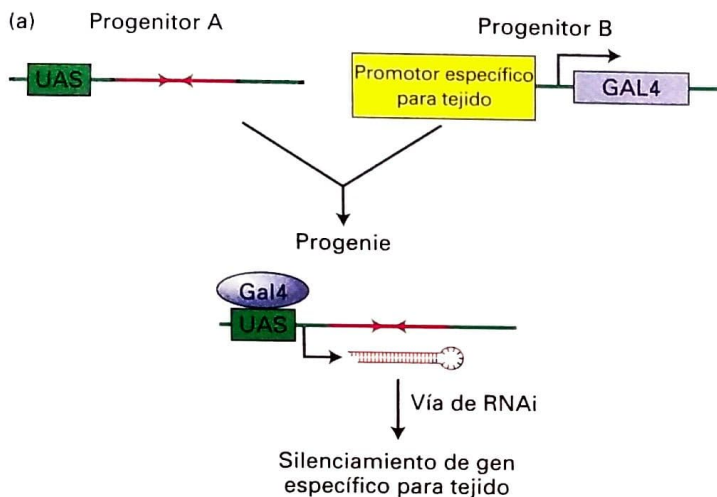


FIGURA 9-41 La RNAi se puede usar para suprimir genes de una manera específica para tejido en la mosca de la fruta. Se han utilizado enfoques genéticos para desarrollar métodos para suprimir la expresión de genes diana en tejidos específicos.

Esto implica utilizar dos grupos grandes de moscas. En el primer grupo, de alrededor de 14 000 moscas diferentes cada una designada para un gen diana (grupo A), se generaron moscas en las cuales una horquilla de RNA específica para el gen diana se encuentra bajo el control de una secuencia de activación corriente arriba (UAS) para el activador transcripcional Gal4. En cada una de las moscas del segundo grupo (grupo B), la expresión de GAL4 está controlada por un promotor específico de tejido. Cuando una mosca del grupo A se aparea con una mosca del grupo B, Gal4 se expresará en un tejido y, por lo tanto, la horquilla de RNAi se expresará y el gen se silenciará en este tejido. (b) Un ojo de mosca de tipo silvestre (izquierda) y uno en el cual el gen *white* ha sido silenciado específicamente en el ojo (derecha). (Parte [b] de N Perrimon y cols., 2010, *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 2:a003640.)

cas y los mecanismos moleculares de las proteínas, ya sea *in vivo* o *in vitro*. En el momento que se escribió este libro, estábamos viendo una revolución en la microscopia de superresolución, desplegando la capacidad de localizar moléculas por microscopia óptica con una precisión varias veces superior a lo que se creía era posible. La microscopia de superresolución actualmente sólo puede realizarse sobre muestras fijadas; los optimistas creen que pronto será posible lograr este nivel de resolución en células vivas y, por lo tanto, abre la posibilidad de observar los procesos dinámicos a nivel molecular. A medida que se desarrollan estas técnicas, menos personas necesitan utilizar la microscopia electrónica y, en consecuencia, están disminuyendo los expertos en esta área importante.

La RNAi ha proporcionado nueva tecnología impresionante e inesperada al arsenal de técnicas disponibles para los biólogos celulares y del desarrollo. La capacidad para realizar búsquedas en todo el genoma, tanto en el gusano nematodo como en la mosca de la fruta, ha hecho que los sistemas biológicos tradicionalmente excelentes sean aún más poderosos. El acoplamiento de estas tecnologías con las búsquedas visuales abre otra dimensión. Considere el siguiente problema: ¿cuál de los genes en el nematodo afecta la organización de un pequeño subgrupo de neuronas? Hace unos pocos años, esto podría haber sido un problema técnicamente desafiante. En la actualidad es posible obtener un nematodo en el cual solo esas neuronas estén marcadas con PFV y luego someterlas a una búsqueda por RNAi en genómica para ver qué productos génicos son necesarios para la morfología normal de esas neuronas. Se están desarrollando cada vez más técnicas imaginativas en combinación con la RNAi con búsquedas funcionales y visuales, tanto en los gusanos nematodos como en la mosca de la fruta, lo cual permite una comprensión cada vez más profunda de los procesos de la vida. Además, se están haciendo todos los esfuerzos para explorar los efectos del silenciamiento de la expresión de cada gen en las líneas celulares cultivadas para luego analizar los efectos en vías específicas. Este esfuerzo se encuentra en su primera etapa, por lo tanto, futuros perfeccionamientos y análisis proporcionarán una visión de los sistemas biológicos en cuanto a la organización y la función celular.

¿Se puede utilizar la tecnología RNAi en medicina? ¿Podría esto ser utilizado para inhibir la expresión de los oncogenes en el tratamiento del cáncer? Los problemas de distribución tecnológica son significativos puesto que siRNA necesita llegar a las células indicadas, permanecer estable en el paciente y ser eficaz en silenciar a la proteína adecuada. En la actualidad se está evaluando la posible utilidad de esta técnica en al menos una docena de ensayos clínicos. Si se pueden superar los obstáculos técnicos, la RNAi podría convertirse en una clase importante de agente terapéutico.

¿Qué tecnologías nuevas traerá la nueva década? En la última década, la RNAi y la PFV han revolucionado la biología celular. No caben dudas de que la siguiente década traerá nuevos desarrollos inesperados, por lo que debemos estar muy entusiasmados por lo que ha de venir.

Palabras clave

microscopia óptica
de campo claro 404
línea celular 400
cepa celular 399
proteínas quiméricas 398

cloroplasto 427
clon 398
microscopia confocal 413
microscopia crioelectrónica 422
cultivo 397

citoplasma 424
microscopia de desconvolución 412
centrifugación diferencial 427
microscopia de contraste
por interferencia
diferencial (DIC) 427
retículo endoplasmático
(ER) 425
endosoma 425
centrifugación por gradiente
de densidad 427
clasificador celular activado
por fluorescencia (FACS) 401
recuperación de la fluorescencia
después del fotoblanqueamiento
(FRAP) 416
tinción fluorescente 408
transferencia de energía de
resonancia de Förster (FRET) 416
complejo de Golgi 425
hibridoma 403
microscopia de
inmunofluorescencia 398
microscopia de inmunofluorescencia
indirecta 410
lisosoma 425
proteína de transporte
de membrana 424
sombreado metálico 420
mitocondria 427
anticuerpo monoclonal 403
orgánulo 398
peroxisoma 427
microscopia de contraste
de fase 407
microscopia de localización
fotoactivada (PALM) 418
anticuerpo policlonal 403
resolución 405
microscopio electrónico
de barrido (SEM) 419
microscopia de fluorescencia
por reflexión interna
total (TIRF) 415
microscopio electrónico
de transmisión (TEM) 419

Revisión de los conceptos

1. Tanto la microscopia óptica como la electrónica se suelen utilizar con frecuencia para visualizar células, estructuras celulares y la localización de moléculas específicas. Explique por qué un científico puede elegir una u otra técnica de microscopia para usar en investigación.
2. La amplificación posible con cualquier tipo de microscopio es una propiedad importante, pero su resolución, la capacidad para distinguir entre dos objetos muy juntos, es incluso más importante. Describa por qué el poder de resolución de un microscopio es más importante para visualizar detalles finos que su amplificación. ¿Cuál es la fórmula para describir la resolución de una lente de microscopio y cuáles son las limitaciones en cuanto a los valores en esta fórmula?
3. ¿Por qué son necesarias las cepas químicas para visualizar las células y los tejidos con el microscopio óptico básico? ¿Qué ventajas proporcionan los colorantes fluorescentes y la microscopia de fluorescencia en comparación con los colorantes químicos usados para teñir muestras para microscopia óptica? ¿Qué ventajas proporciona la microscopia de barrido confocal y la microscopia de desconvolución en comparación con la microscopia de fluorescencia convencional?
4. En ciertos métodos de microscopia electrónica no se obtiene la imagen directa de la muestra. ¿Cómo brindan estos métodos la información acerca de la estructura celular y qué tipos de estructuras se visualizan? ¿Qué limitaciones tienen la mayoría de las formas de microscopia electrónica?
5. ¿Cuál es la diferencia entre una cepa celular, una línea celular y un clon?
6. Explique por qué el proceso de fusión celular es necesario para producir anticuerpos monoclonales usados para investigación.
7. Mucho de lo que sabemos acerca de la función celular depende de los experimentos que utilizan células específicas y partes específicas (p. ej.,

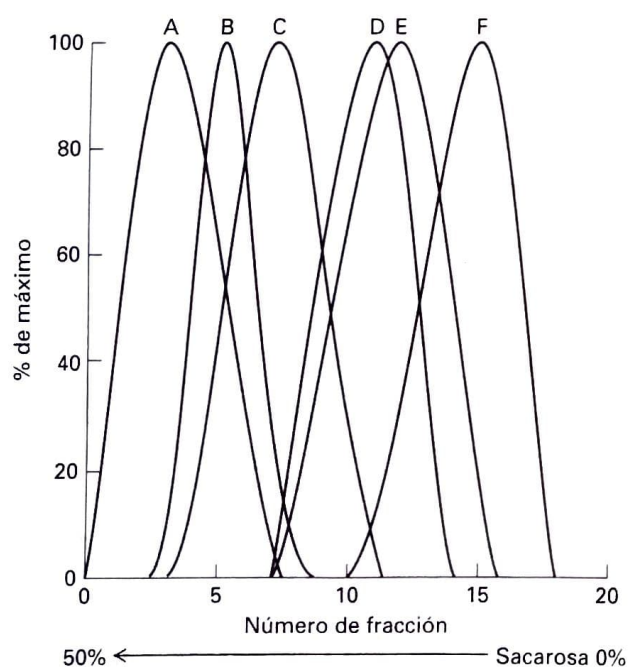
orgánulos) de células. ¿Qué técnicas utilizan comúnmente los científicos para aislar células y orgánulos a partir de mezclas complejas y cómo funcionan estas técnicas?

8. Hoechst 33258 es un colorante químico que se une específicamente al DNA en las células vivas y, cuando es excitado por la luz UV, fluoresce en el espectro visible. Nombre y describa un método específico, empleando Hoechst 33258, que podría utilizar un investigador para aislar fibroblastos en la fase G2 del ciclo celular a partir de los fibroblastos en interfase.

9. shRNA y siRNA se pueden utilizar para silenciar exitosamente la expresión de cualquier proteína específica en una línea celular u organismo dado. La utilidad de uno sobre otro es debatible, pero existen motivos para usar uno de ellos para aplicaciones terapéuticas en un organismo vivo. ¿Cuál de los dos métodos es probable que sea más ventajoso a largo plazo y cuál es una de sus limitaciones?

Análisis de los datos

1. Las células hepáticas murinas se homogeneizaron y el homogenado se sometió a centrifugación por gradiente de densidad con gradientes de sacarosa. Las fracciones obtenidas a partir de estos gradientes se analizaron en busca de moléculas marcadoras (es decir, moléculas que están limitadas a orgánulos específicos). Los resultados de estos ensayos se muestran en la figura. Las moléculas marcadoras tienen las siguientes funciones: citocromo oxidasa es una enzima involucrada en el proceso por el cual se forma el ATP en la degradación aeróbica completa de la glucosa o los ácidos grasos; el RNA ribosómico forma parte de los ribosomas que sintetizan proteínas; la catalasa cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno; la fosfatasa ácida hidroliza a los ésteres



Curva A = citocromo oxidasa

Curva B = RNA ribosómico

Curva C = catalasa

Curva D = fosfatasa ácida

Curva E = citidil transferasa

Curva F = aminoácido permeasa

monofosfóricos a pH ácido; la citidil transferasa está involucrada en la biosíntesis de fosfolípidos y la aminoácido permeasa en el transporte de aminoácidos a través de membranas.

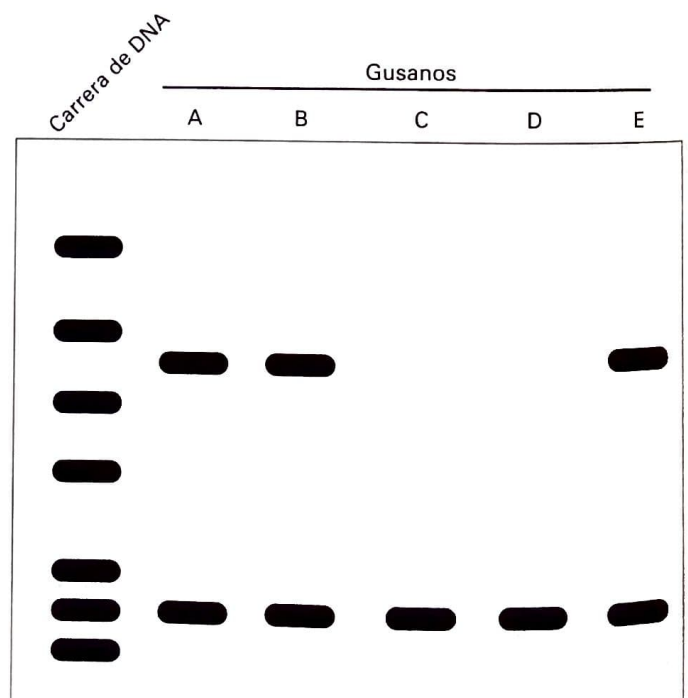
a. Nombre a la molécula marcadora y asigne el número de fracción que está más enriquecida con cada uno de los siguientes componentes: lisosomas; peroxisomas; mitocondrias; membrana plasmática; retículo endoplasmático rugoso; retículo endoplasmático liso.

b. ¿El retículo endoplasmático rugoso es más o menos denso que el retículo endoplasmático liso? ¿Por qué?

c. Describa un enfoque alternativo mediante el cual usted podría identificar cuál fracción está enriquecida con cada orgánulo.

d. ¿De qué forma podría la adición de un detergente al homogenado, el cual rompe las membranas al solubilizar sus componentes lipídicos y proteicos, afectar los resultados del equilibrio de gradiente de densidad?

2. El gusano nematodo *C. elegans* es adecuado como modelo para los estudios de siRNA. En este experimento, los nematodos adultos se alimentan con una bacteria que expresa un RNA de doble hebra para suprimir la expresión del gen *unc18*, cuyo homólogo en mamíferos codifica una proteína que participa en la integración de las vesículas de almacenamiento de GLUT4 en la membrana plasmática. Antes de evaluar los efectos en el organismo mismo, es necesario utilizar RT-PCR para analizar si el experimento de siRNA funcionó. Las muestras son de embriones provenientes de cinco adultos alimentados con las bacterias, y a continuación se muestran los resultados obtenidos después de aplicar RT-PCR usando cebadores para amplificar los mRNA de dos genes diferentes, *unc18* y GLUT4.



a. De los embriones analizados, ¿qué muestras demuestran que los adultos incorporaron exitosamente las bacterias conteniendo el RNA de doble hebra *unc18*? ¿Basándose en qué llegó usted a esta conclusión?

b. Marcar cuáles grupos de bandas resultan de la amplificación con los cebadores unc18 y cuáles de los cebadores para GLUT4. ¿Por qué se utilizó como control positivo para la RT-PCR a los cebadores para GLUT4? ¿Qué le dice esto a usted acerca de la relación entre el silenciamiento del mRNA de unc18 y de GLUT4?

c. Con anticuerpos contra unc18, esquematice una inmunotransferencia (Western blot) que muestre los resultados esperados a partir de muestras de proteínas de cada una de las 5 muestras.

d. Para investigar aún más la relación entre las proteínas unc18 y GLUT4, se repite el experimento con siRNA, pero en células embrionarias que expresan una proteína GLUT4 marcada con PFV. Dibuje una célula que incluya sus mitocondrias, núcleo y retículo endoplasmático rugoso y muestre dónde, si se utiliza un microscopio confocal de barrido láser, se podría localizar la fluorescencia de PFV en las células que expresan siRNA unc18. No se olvide de dibujar la célula que representa el control.

e. La capacidad de una proteína para colocarse con otra proteína sugiere pero no prueba que las dos interactúan físicamente una con otra. Tener ambas proteínas marcadas, en este caso unc18 con proteína verde fluorescente y GLUT4 con proteína roja fluorescente, proporciona al experimentador los reactivos para separar la cuestión de colocación respecto de la interacción. Usando estos reactivos, describa una técnica que podría simplemente demostrar que unc18 se coloca con GLUT4 y otra técnica que pruebe la interacción física de las dos proteínas.

Referencias

Crecimiento de células en cultivo

Bissell, M. J., A. Rizki, and I. S. Mian. 2003. Tissue architecture: the ultimate regulator of breast epithelial function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**:753-762.

Battye, F. L., and K. Shortman. 1991. Flow cytometry and cell-separation procedures. *Curr. Opin. Immunol.* **3**:238-241.

Davis, J. M., ed. 1994. *Basic Cell Culture: A Practical Approach*. IRL Press.

Edwards, B., et al. 2004. Flow cytometry for high-throughput, high-content screening. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **8**:392-398.

Goding, J. W. 1996. *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. Production and Application of Monoclonal Antibodies in Cell Biology, Biochemistry, and Immunology*, 3d ed. Academic Press.

Griffith, L., G., and M. A. Swartz. 2006. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **7**:211-224.

Krutzik, P., et al. 2004. Analysis of protein phosphorylation and cellular signaling events by flow cytometry: techniques and clinical applications. *Clin. Immunol.* **110**:206-221.

Paszek, M. J., and V. M. Weaver. 2004. The tension mounts: mechanics meets morphogenesis and malignancy. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **9**:325-342.

Shaw, A. J., ed. 1996. *Epithelial Cell Culture*. IRL Press.

Tyson, C. A., and J. A. Frazier, eds. 1993. *Methods in Toxicology. Vol. 1 (Part A): In Vitro Biological Systems*. Academic Press. Describes methods for growing many types of primary cells in culture.

Microscopía óptica: exploración de las estructuras celulares y visualización de las proteínas dentro de las células

Chen, X., M. Velliste, and R. F. Murphy. 2006. Automated interpretation of subcellular patterns in fluorescence microscope images for location proteomics. *Cytometry (Part A)* **69A**:631-640.

Egner, A., and S. Hell. 2005. Fluorescence microscopy with super-resolved optical sections. *Trends Cell Biol.* **15**:207-215.

Gaietta, G., et al. 2002. Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. *Science* **296**:503-507.

Giepmans, B. N. G., et al. 2006. The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* **312**:217-224.

Gilroy, S. 1997. Fluorescence microscopy of living plant cells. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**:165-190.

Huang, B., H. Babcock, and X. Zhuang. 2010. Breaking the diffraction barrier: super-resolution imaging of cells. *Cell* **143**:1047-1058.

Inoué, S., and K. Spring. 1997. *Video Microscopy*, 2d ed. Plenum Press.

Lippincott-Schwartz, J. 2010. Imaging: visualizing the possibilities. *J. Cell Science* **123**:3619-3620.

Lippincott-Schwartz, J. 2011. Emerging in vivo analyses of cell function using fluorescence imaging. *Ann. Rev. Biochem.* **80**:327-332.

Matsumoto, B., ed. 2002. *Methods in Cell Biology. Vol. 70: Cell Biological Applications of Confocal Microscopy*. Academic Press.

Mayor, S., and S. Bilgrami. 2007. Fretting about FRET in cell and structural biology. In *Evaluating Techniques in Biochemical Research*, D. Zuk, ed. Cell Press.

Misteli, T., and D. L. Spector. 1997. Applications of the green fluorescent protein in cell biology and biotechnology. *Nature Biotech.* **15**:961-964.

Pepperkok, R., and Ellenberg, J. 2006. High-throughput fluorescence microscopy for systems biology. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* AOP, published online July 19, 2006 (doi:10.1038/nrml979).

Roukos, V., T. Misteli, and C. K. Schmidt. 2010. Descriptive no more: the dawn of high-throughput microscopy. *Trends in Cell Biology* **20**:503-506.

Sako, Y., S. Minoguchi, and T. Yanagida. 2000. Single-molecule imaging of EGFR signalling on the surface of living cells. *Nature Cell Biol.* **2**:168-172.

Simon, S., and J. Jaiswal. 2004. Potentials and pitfalls of fluorescent quantum dots for biological imaging. *Trends Cell Biol.* **14**:497-504.

Sluder, G., and D. Wolf, eds. 1998. *Methods in Cell Biology. Vol. 56: Video Microscopy*. Academic Press.

So, P. T. C., et al. 2000. Two-photon excitation fluorescence microscopy. *Ann. Rev. Biomed. Eng.* **2**:399-429.

Tsien, R. Y. 2009. Indicators based on fluorescence resonance energy transfer (FRET). *Cold Spring Harbor Protoc.* doi:10.1101/pdb.top57.

Willig, K. I., et al. 2006. STED microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis. *Nature* **440**:935-939.

Microscopía electrónica: imagen de alta resolución

Beck, M., et al. 2004. Nuclear pore complex structure and dynamics revealed by cryoelectron tomography. *Science* **306**:1387-1390.

Frey, T. G., G. A. Perkins, and M. H. Ellisman. 2006. Electron tomography of membrane-bound cellular organelles. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **35**:199-224.

Hyatt, M. A. *Principles and Techniques of Electron Microscopy*, 4th ed. 2000. Cambridge University Press.

Koster, A., and J. Klumperman. 2003. Electron microscopy in cell biology: integrating structure and function. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **4**:SS6-SS10.

Lučić, V., et al. 2005. Structural studies by electron tomography: from cells to molecules. *Ann. Rev. Biochem.* **74**:833-865.

Medalia, O., et al. 2002. Macromolecular architecture in eukaryotic cells visualized by cryoelectron tomography. *Science* **298**:1209-1213.

Nickell, S., et al. 2006. A visual approach to proteomics. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **7**:225-230.

Aislamiento y caracterización de orgánulos celulares

Bainton, D. 1981. The discovery of lysosomes. *J. Cell Biol.* **91**:66s-76s.

- Cuervo, A. M., and J. E. Duce. 1998. Lysosomes: a meeting point of proteins, chaperones, and proteases. *J. Mol. Med.* **76**:6-12.
- de Duve, C. 1996. The peroxisome in retrospect. *Ann. NY Acad. Sci.* **804**:1-10.
- de Duve, C. 1975. Exploring cells with a centrifuge. *Science* **189**:186-194. The Nobel Prize lecture of a pioneer in the study of cellular organelles.
- de Duve, C., and H. Beaufay. 1981. A short history of tissue fractionation. *J. Cell Biol.* **91**:293s-299s.
- Foster, L. J., et al. 2006. A mammalian organelle map by protein correlation profiling. *Cell* **125**:187-199.
- Holtzman, E. 1989. *Lysosomes*. Plenum Press.
- Howell, K. E., E. Devaney, and J. Gruenberg. 1989. Subcellular fractionation of tissue culture cells. *Trends Biochem. Sci.* **14**:44-48.
- Lamond, A., and W. Earnshaw. 1998. Structure and function in the nucleus. *Science* **280**:547-553.
- Mootha, V. K., et al. 2003. Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria. *Cell* **115**:629-640.
- Palade, G. 1975. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* **189**:347-358. The Nobel Prize lecture of a pioneer in the study of cellular organelles.
- Ormerod, M. G., ed. 1990. *Flow Cytometry: A Practical Approach*. IRL Press.
- Rickwood, D. 1992. *Preparative Centrifugation: A Practical Approach*. IRL Press.
- Wanders, R., and H. R. Waterham. 2006. Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Ann. Rev. Biochem.* **75**:295-332.

Perturbación de funciones celulares específicas

- Eggert, U. S., and T. J. Mitchison. 2006. Small molecule screening by imaging. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **10**:232-237.
- Elbashir, S. M., et al. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**:494-498.
- Fire, A., et al. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**:806-811.
- Goshima, G., et al. 2007. Genes required for mitotic spindle assembly in *Drosophila* S2 cells. *Science* **316**:417-421.
- Kamath, R. S., et al. 2003. Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* **421**:231-237.
- Mayer, T. U., et al. 1999. Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. *Science* **286**:971-974.
- Meister, G., and T. Tuschl. 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* **431**:343-349.
- Mohr, S., et al. 2010. Genomic screening with RNAi: result and challenges. *Ann. Rev. Biochem.* **79**:37-64.
- Perrimon, N., et al. 2010. In vivo RNAi: today and tomorrow. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* **2**:a003640.

Separación de orgánulos

H. Beaufay y cols., 1964, *Biochemical Journal* **92**:191

En las décadas de 1950 y 1960, los científicos utilizaban dos técnicas para estudiar los orgánulos celulares: microscopía y fraccionamiento. Christian de Duve estaba a la vanguardia del fraccionamiento celular. Al comienzo de la década de 1950, él utilizó la centrifugación para distinguir un orgánulo nuevo, el lisosoma, de los fraccionamientos previamente caracterizados: el núcleo, la fracción rica en mitocondrias y los microsomas. Pronto después de eso, utilizó la centrifugación en gradiente de densidad para descubrir otro orgánulo.

Antecedentes

Las células eucariontes están altamente organizadas y compuestas por estructuras celulares conocidas como orgánulos que realizan funciones específicas. Aunque la microscopía ha permitido a los biólogos describir la localización y la aparición de diversos orgánulos, tiene un uso limitado en cuanto a descubrir la función del orgánulo. Para realizar esto, los biólogos celulares han confiado en una técnica que se conoce como fraccionamiento celular. Aquí las células se rompen y los componentes celulares se separan sobre la base de su tamaño, masa y densidad con la utilización de una variedad de técnicas de centrifugación. Los científicos podrían luego aislar y analizar los componentes celulares de diferentes densidades, llamadas *fracciones*. Usando este método, los biólogos han dividido la célula en cuatro fracciones: núcleo, fracción rica en mitocondrias, microsomas y savia celular.

De Duve fue un bioquímico interesado en las localizaciones subcelulares de las enzimas metabólicas. Ya había completado un gran volumen de trabajo sobre el fraccionamiento de células hepáticas, en las cuales había determinado la localización subcelular de numerosas enzimas. Al localizar estas enzimas en fracciones celulares específicas, pudo comenzar a elucidar la función del orgánulo. Señaló que su trabajo estuvo guiado por dos hipótesis: el “postulado de homogeneidad bioquímica” y “el postulado de localización

única.” Brevemente, estas hipótesis proponen que la composición completa de una población subcelular contendrá las mismas enzimas y que cada enzima se localiza en un sitio independiente dentro de la célula. Con estas dos hipótesis y la poderosa herramienta de centrifugación, de Duve subdividió aún más la fracción rica en mitocondrias. Primero, identificó la fracción mitocondrial ligera, la cual está constituida por enzimas hidrolíticas. Luego, en una serie de experimentos descritos aquí, identificó otra fracción subcelular independiente, que denominó peroxisoma, dentro de la fracción rica en mitocondrias.

El experimento

De Duve estudió la distribución de las enzimas en las células hepáticas de rata. Altamente activas en el metabolismo energético, el hígado contiene una cantidad de enzimas útiles para estudiar. Para buscar la presencia de diversas enzimas durante el fraccionamiento, de Duve se basó en análisis conocidos, llamados ensayos enzimáticos, para la actividad enzimática. Para retener la máxima actividad enzimática había tomado precauciones, que incluían realizar todos los pasos del fraccionamiento a 0 °C para reducir la actividad de proteasas.

De Duve utilizó centrifugación con velocidad zonal para separar componentes celulares por sucesivos pasos de centrifugación. Extirpó el hígado de rata y lo disgregó por homogeneización. La preparación cruda de las células homogeneizadas se sometió luego a centrifugación a velocidad relativamente baja. Este paso inicial separaba el núcleo de las células, que se acumula como un sedimento en el fondo del tubo, del extracto citoplasmático, que permanece en el sobrenadante. A continuación, de Duve subdividió aún más el extracto citoplasmático en una fracción mitocondrial pesada, una fracción mitocondrial ligera y una fracción microsómica. Logró realizar la separación del citoplasma empleando sucesivos pasos de centrifugación de fuerza creciente. En cada paso recolectaba y almacenaba las fracciones para análisis en-

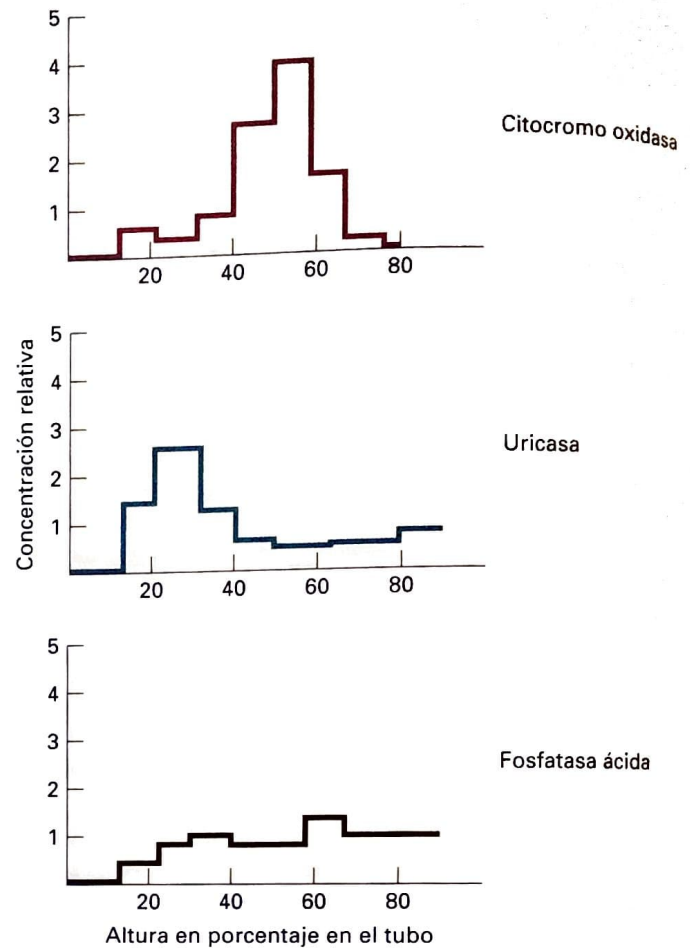
EXPERIMENTO CLÁSICO 9.1

zimático posterior. Una vez que completó el fraccionamiento, de Duve llevó a cabo ensayos enzimáticos para determinar la distribución subcelular de cada enzima. Representó luego la distribución de la enzima a través de toda la célula. Como se había demostrado anteriormente, la actividad de la citocromo oxidasa, una enzima importante en el sistema de transferencia electrónica, se encontró principalmente en las fracciones mitocondriales pesadas. La fracción microsómica se demostró que contenía otra enzima previamente caracterizada, la glucosa-6-fosfatasa.

La fracción mitocondrial ligera, que está formada por el lisosoma, mostró las actividades características de la fosfatasa ácida. Inesperadamente, de Duve observó un cuarto patrón cuando ensayó la actividad uricasa. En lugar de seguir el patrón de las enzimas de referencia, la actividad uricasa se concentró bruscamente dentro de la fracción mitocondrial ligera, lo cual le sugirió a de Duve que la uricasa podría estar aislada en otra población subcelular separada de las enzimas lisosómicas.

Para evaluar esta teoría, de Duve utilizó una técnica conocida como centrifugación en gradiente de densidad, que separa las macromoléculas sobre la base de la densidad. La centrifugación en gradiente de densidad se puede realizar usando una cantidad de diferentes gradientes, que incluyen sacarosa y glucógeno. Además, el gradiente se puede realizarse en agua o “agua pesada” que contiene el isótopo de hidrógeno deuterio en lugar del hidrógeno. En este experimento, de Duve separó la fracción rica en mitocondrias preparada por centrifugación zonal de velocidad en cada uno de estos gradientes diferentes (véase la Fig. 9-35). Si la uricasa fuese parte de un compartimento subcelular separado, se la podría separar de las enzimas lisosómicas en cada gradiente analizado. De Duve llevó a cabo los fraccionamientos en esta serie de gradientes, luego realizó ensayos enzimáticos como antes. En cada caso, la uricasa se encontró en una población separada de la enzima lisosómica fosfatasa ácida y la enzima mitocondrial citocromo oxidasa (Fig. 1). Al observar repetidamente la actividad uricasa

FIGURA 1 Representación gráfica del análisis enzimático de los productos a partir de un gradiente de sacarosa. La fracción rica en mitocondrias se separó como se describe en la Figura 9-45 y luego se realizaron ensayos enzimáticos. Se representa la concentración relativa de enzimas activas en el eje y, y la altura de los tubos en el eje x. El pico de actividades de la citocromo oxidasa (*arriba*) y la fosfatasa ácida (*abajo*) se observan cerca de la parte superior del tubo. El pico de actividad de la uricasa (*medio*) migra hacia la parte inferior del tubo.

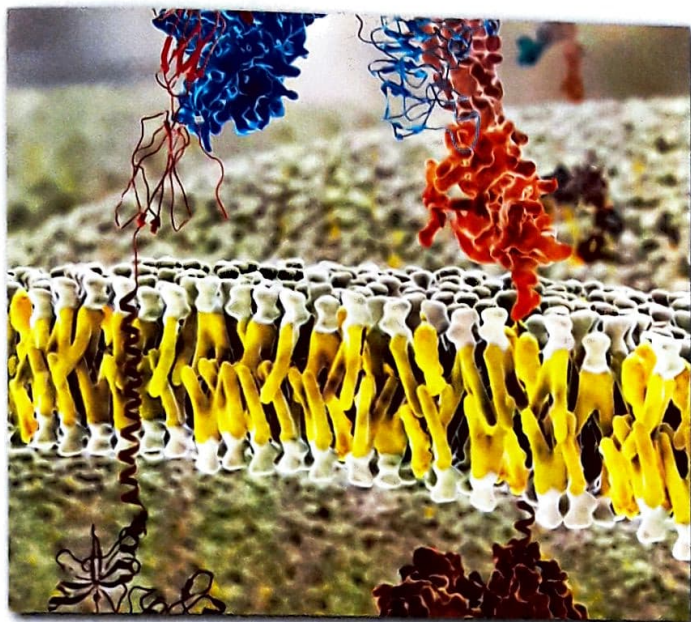


en una fracción distinta de la actividad de las enzimas lisosómicas y mitocondriales, de Duve concluyó que la uricasa era parte de un orgánulo separado. El experimento también demostró que las otras dos enzimas, catalasa y D-aminoácido oxidasa, se separaban en la misma fracción que la uricasa. Debido a que cada una de estas enzimas producía o utilizaba peróxido de hidrógeno, de Duve propuso que esta fracción representaba un orgánulo responsable del metabolismo del peróxido y lo apodó peroxisoma.

Análisis

El trabajo de Duve del fraccionamiento celular proporcionó señales acerca de la función de las estructuras de las células mientras trataba de asignar la localización de estas enzimas. Analizar el inventario de enzimas en una fracción celular dada le brindó *pistas* para sus funciones. Su trabajo cuidadoso dio como resultado el descubrimiento de dos orgánulos: el lisosoma y el **peroxisoma**. Su trabajo tam-

bién proporcionó pistas importantes para la función de los orgánulos. El lisosoma, donde de Duve encontró tantas enzimas potencialmente destructivas, se sabe en la actualidad que es el sitio para la degradación de biomoléculas. Se ha demostrado que el **peroxisoma** es el sitio de oxidación de los ácidos grasos y los aminoácidos, las reacciones que producen grandes cantidades de peróxido de hidrógeno. En 1974, de Duve recibió el premio Nobel de Fisiología o Medicina en reconocimiento a su trabajo pionero.



Modelo molecular de una bicapa lipídica con las proteínas de membrana embebidas. Las proteínas transmembrana tienen diferentes dominios, exoplasmático, citosólico transmembrana. Se muestran porciones del receptor de la insulina que regula el metabolismo celular. (Ramón Andrade 3Dciencia/ SciencePhoto Library.)

Estructura de las biomembranas

Las membranas participan en muchos aspectos de la estructura y la función celular. La **membrana plasmática** define la célula y separa el interior del exterior. En los eucariontes, las membranas definen además los orgánulos intracelulares, como el núcleo, las mitocondrias y los lisosomas. Todas estas membranas biológicas presentan la misma arquitectura básica —una bicapa de fosfolípidos en la cual están incrustadas las proteínas (Fig. 10-1)—. Al evitar el movimiento no asistido de la mayoría de las sustancias hidrosolubles de un lado de la membrana al otro, esta membrana de fosfolípidos actúa como una barrera de permeabilidad que ayuda a mantener las diferencias características entre el interior y el exterior de la célula o el orgánulo; a su vez, las proteínas embebidas dotan a la membrana de funciones específicas, como el transporte regulado de sustancias de un lado al otro. Cada membrana celular tiene su propio conjunto de proteínas que le permiten llevar a cabo una multitud de funciones distintas.

Los procariontes, las células más pequeñas y simples, tienen aproximadamente 1-2 μm de longitud y están rodeadas por una única membrana plasmática; en la mayoría de los casos, no contienen subcompartimentos limitados por membranas internas (véase la Fig. 1-11). Sin embargo, esta única membrana plasmática contiene cien-

tos de diferentes tipos de proteínas integrales para la función celular. Parte de éstas catalizan la síntesis de ATP y la iniciación de la replicación del DNA, por ejemplo. Otras incluyen los muchos tipos de **proteínas de transporte de la membrana**, que permiten que iones, azúcares, aminoácidos y vitaminas específicos atraviesen la bicapa de fosfolípidos, por lo demás impermeable, y que productos metabólicos específicos salgan de la célula. Los **receptores de la membrana plasmática** son proteínas que permiten que la célula reconozca señales químicas presentes en su ambiente y ajustan su metabolismo o su patrón de expresión génica como respuesta.

Los eucariontes tienen además membranas plasmáticas tachonadas con una gran cantidad de proteínas que desempeñan diversas funciones, que incluyen el transporte de membrana, la señalización celular y la conexión de las células en los tejidos. Además, las células eucariontes (que por lo general son de mucho mayor tamaño que las procariontes) tienen una diversidad de orgánulos internos limitados por membrana (véase la Fig. 9-32). Cada membrana de un orgánulo tiene un complemento único de proteínas que le permiten desempeñar sus funciones celulares características, como la generación de ATP (en las mitocondrias) y la síntesis de DNA (en el núcleo). Muchas proteínas de

CONTENIDO

10.1	La bicapa lipídica: composición y organización estructural	445
10.2	Las proteínas de membrana: estructura y funciones básicas	455

10.3	Fosfolípidos, esfingolípidos y colesterol: síntesis y movimiento intracelular	464
------	---	-----

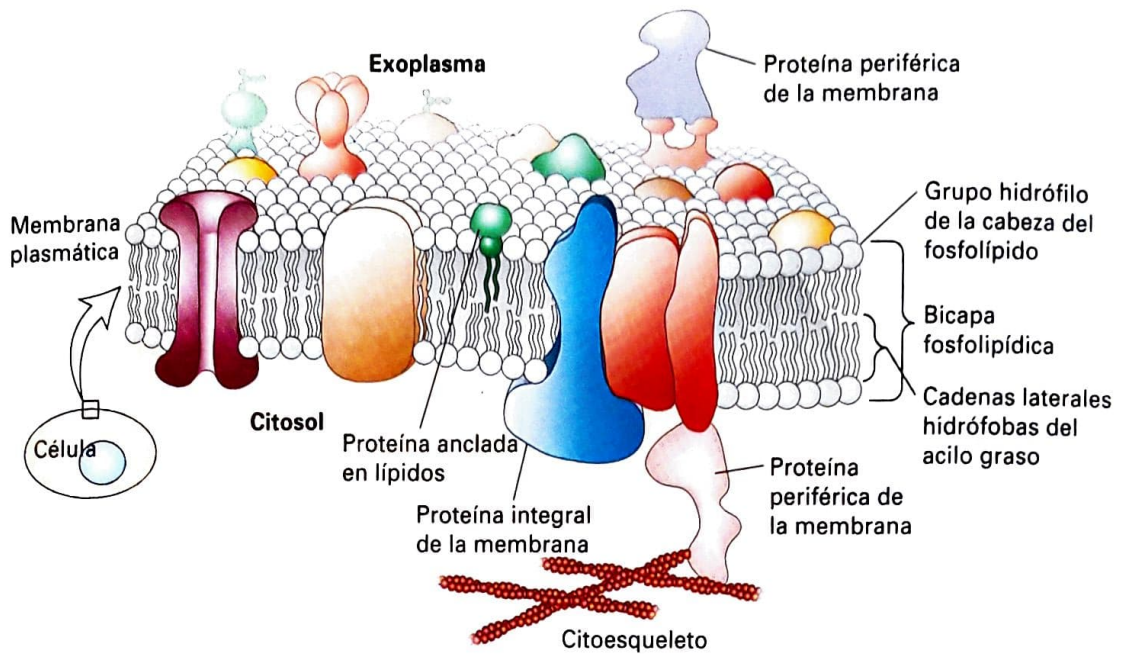


FIGURA 10-1 Modelo del mosaico fluido de las biomembranas. Una bicapa de fosfolípidos ~3 nm de espesor proporciona arquitectura básica de todas las membranas celulares; las proteínas de la membrana dan a cada membrana celular su conjunto único de funciones. Los fosfolípidos individuales pueden moverse en dirección lateral y girar dentro del plano de la membrana, lo proporciona a ésta una consistencia fluida, similar a la del aceite de oliva. Las interacciones no covalentes entre los fosfolípidos, y entre estos y las proteínas, le dan fuerza y resistencia a la membrana, mientras que el núcleo hidrofóbico de la bicapa evita el movimiento no asistido de las sustancias hidrosolubles de un

lado al otro. Las proteínas integrales (transmembrana) abarcan la bicapa y, con frecuencia, forman dímeros y oligómeros de alto orden. Las proteínas ancladas a los lípidos se encuentran unidas a una lamela por una cadena hidrocarbonada unida mediante enlaces covalentes. Las proteínas periféricas se asocian con proteínas integrales o lípidos de ésta. Las proteínas de la membrana plasmática también hacen extenso contacto con el citoesqueleto. (Tomado de D. Engelman, 2005 *Nature* 438:578-580)

la membrana plasmática unen, asimismo, componentes del **citoesqueleto**, una densa red de filamentos proteicos que atraviesa el citosol para proporcionar soporte mecánico a las membranas celulares, interacciones esenciales para que la célula adquiera su forma específica y para muchos tipos de movimientos celulares.

A pesar de que desempeñan una función estructural en las células, las membranas no son estructuras rígidas. Pueden curvarse y flexionarse en tres dimensiones, y mantener aún su integridad; esto se debe, en parte, a las abundantes interacciones no covalentes que mantienen juntos unidos los lípidos y las proteínas. Más aún, en el plano de la membrana hay considerable movilidad de lípidos y proteínas individuales. De acuerdo con el *modelo de mosaico fluido* de las biomembranas, propuesto inicialmente por los investigadores en la década de 1970, la bicapa lipídica se comporta, en ciertos aspectos, como un fluido bidimensional en el que las moléculas de lípidos individuales pueden desplazarse unas a través de las otras, así como rotar en su lugar.

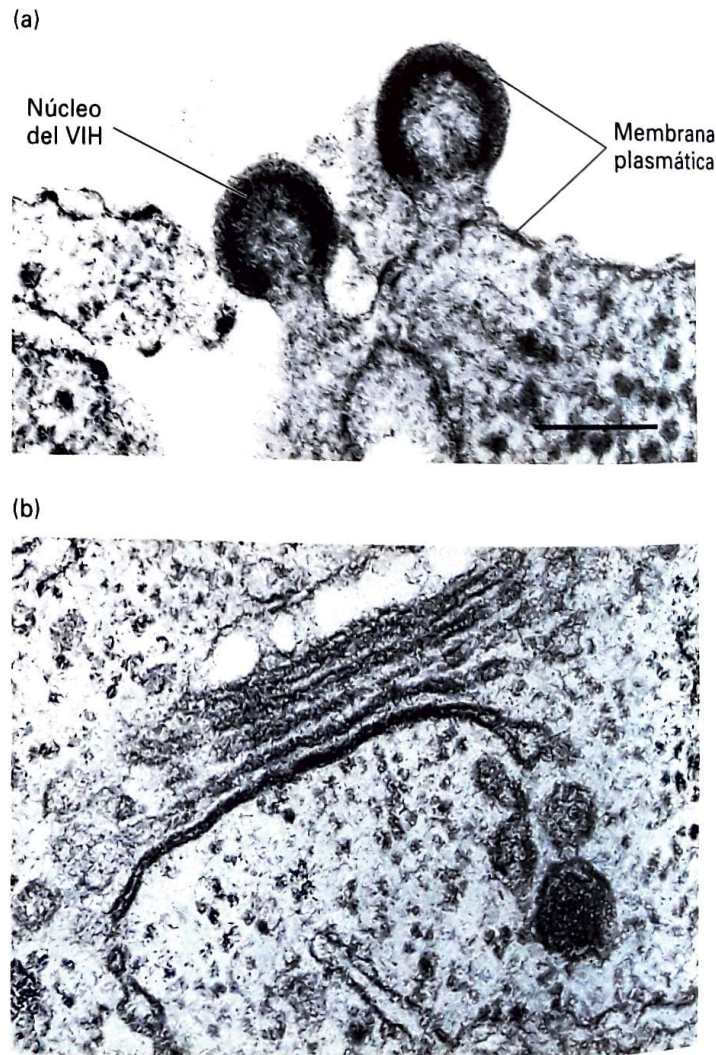


FIGURA 10-2 Las membranas de las células eucarióticas son estructuras dinámicas. (a) Fotomicrografía electrónica de la membrana plasmática de una célula infectada por HIV, que muestra las partículas del virus que brotan hacia el medio de cultivo. A medida que los núcleos virales brotan de la célula, se envuelven con la membrana derivada de la membrana plasmática de ésta, que contiene proteínas específicas del virus. (b) Membranas apiladas del complejo de Golgi con las vesículas en formación. Nótese la forma y curvatura irregular de estas membranas. (Parte [a] de W. Sundquist and U. von Schwedler, University of Utah, parte [b] de Biology Pics/Photo Researchers, Inc.)

Esta fluidez y flexibilidad no solo les permite a los orgánulos asumir sus formas típicas, sino que también dota a las membranas de la propiedad de evaginación y fusión, como ocurre cuando se liberan virus de una célula infectada (Fig. 10-2a) y cuando las membranas celulares internas del complejo de Golgi forman como vesículas en el citosol (Fig. 10-2b) y luego se fusionan con otras membranas para transportar su contenido desde un orgánulo a otro (Cap. 14).

Comenzamos nuestro análisis de las biomembranas considerando sus componentes lipídicos. Estos no solo afectan la forma y función de las membranas, sino que también ayudan a que las proteínas se anclen a la ésta, modifican las actividades de las proteínas de las membranas y transmiten las señales al citoplasma. Luego, consideraremos la estructura de las proteínas de la membrana. Muchas de éstas tienen segmentos grandes embebidos en el núcleo hidrocarbonado de la bicapa de fosfolípidos, y nos centraremos en las principales clases de estas proteínas de membrana. Finalmente, analizaremos el modo en que lípidos, como los fosfolípidos y el colesterol, se sintetizan en las células y se distribuyen a las muchas membranas y orgánulos. El colesterol es un componente esencial de la membrana plasmática de todas las células animales, pero resulta tóxico para el organismo si está presente en exceso.

10.1 La bicapa lipídica: composición y organización estructural

En el Capítulo 2, aprendimos que los fosfolípidos constituyen los bloques estructurales principales de las biomembranas. Los fosfolípidos más comunes de las biomembranas son los fosfoglicéridos (véase la Fig. 2-20), pero como veremos en este capítulo, existe una gran variedad de tipos de fosfolípidos. Todos los fosfolípidos son moléculas **anfipáticas** consisten en dos segmentos con propiedades químicas muy distintas: una “cola” hidrocarbonada con base ácida (ácido graso), que es **hidrofóbica** y se aleja del agua, y un “grupo cabeza polar”, que es fuertemente **hidrofílico** o amante del agua, y tiende a interactuar con las moléculas de agua. Las interacciones de los fosfolípidos entre sí y con el agua determinan, en gran medida, la estructura de las biomembranas.

Además de los fosfolípidos, las biomembranas contienen cantidades más pequeñas de otros lípidos anfipáticos, como los glucolípidos y el colesterol, que contribuyen a la función de las membranas de un modo importante. Consideraremos, en primer término, la estructura y las propiedades de las bicapas de los fosfolípidos puros; luego, analizaremos la composición y la conducta de las membranas celulares naturales. Veremos aquí el modo en que la precisa composición de lípidos de una membrana determinada influye en sus propiedades físicas.

Los fosfolípidos forman bicapas espontáneamente

La naturaleza anfipática de los fosfolípidos, que gobierna sus interacciones, es crítica para la estructura de las biomembranas. Cuando una suspensión de fosfolípidos se dispersa mecánicamente en solución acuosa, éstos se agregan en una de tres formas: **micelas** esféricas y **liposomas** o bicapas de **fosfolípidos laminares**, de dos moléculas de espesor (Fig. 10-3). El tipo de estructura formada por los fosfolípidos puros o una mezcla de fosfolípidos depende de varios factores, que incluyen la longitud de las cadenas de ácidos grasos en la cola

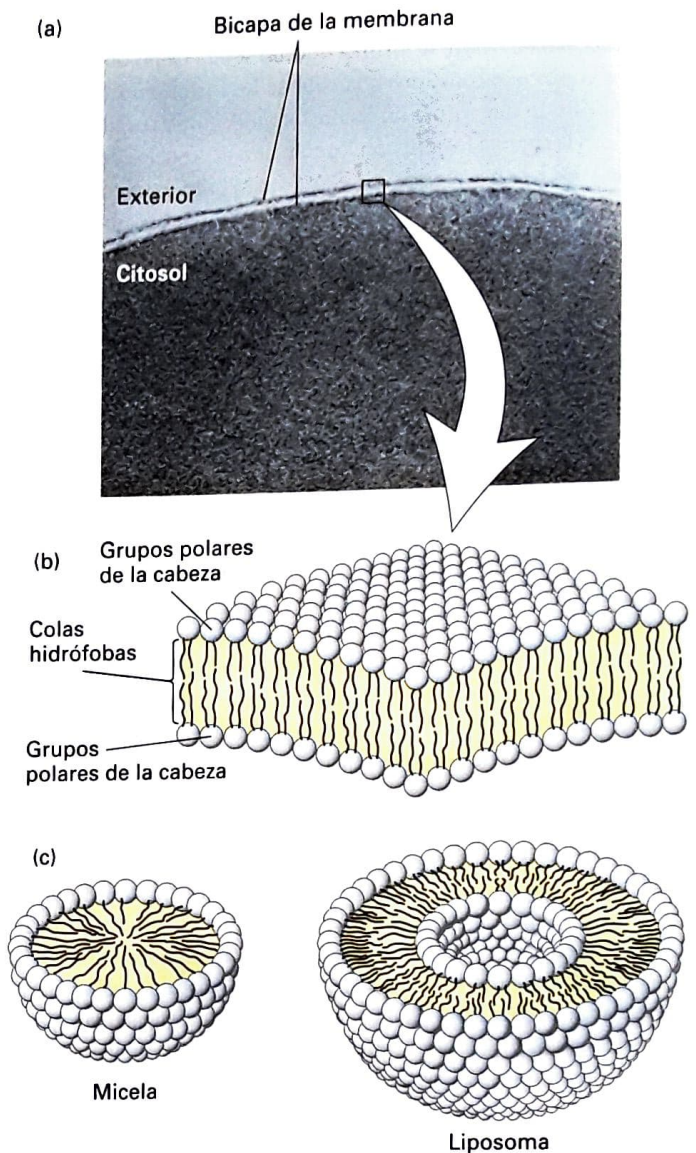


FIGURA 10-3 La estructura de bicapa de las biomembranas. (a) Fotomicrografía electrónica de un corte fino a través de la membrana de un eritrocito, teñida con tetróxido de osmio. La apariencia característica de “vía de ferrocarril” de la membrana indica la presencia de dos capas polares, compatible con la estructura de bicapa de las membranas fosfolipídicas. (b) Interpretación esquemática de la bicapa fosfolipídica en la cual los grupos polares enfrentan el exterior para proteger las colas de ácidos grasos hidrofóbicos del agua. El efecto hidrofóbico y las interacciones de van der Waals entre las colas de ácidos grasos impulsan el ensamblaje de la bicapa (Cap. 2). (c) Vistas transversales de otras dos estructuras formadas por la dispersión de los fosfolípidos en el agua. Una micela esférica tiene un interior hidrofóbico compuesto totalmente por cadenas de ácidos grasos; un liposoma esférico consiste en una bicapa fosfolipídica que rodea un centro acuoso. (Parte (a) cortesía de J. D. Robertson.)

hidrofóbica, su grado de saturación (el número de enlaces C—C y C=C) y la temperatura. En las tres estructuras, el efecto hidrofóbico hace que se agreguen las cadenas laterales ácidos grasos y excluyan las moléculas de agua del “núcleo”. En raras ocasiones, se forman micelas con fosfolípidos naturales, cuyas cadenas de ácidos grasos gene-

ralmente son demasiado grandes como para adecuarse al interior de una micela. Sin embargo, se forman micelas si una de las dos cadenas de acilos grasos que constituyen la cola de un fosfolípido se elimina por hidrólisis, lo que forma un lisofosfolípido, como sucede cuando se trata con la enzima fosfolipasa. En solución acuosa, los detergentes comunes y los jabones forman micelas que se comportan como bolas minúsculas de rodamiento; esto confiere a las soluciones jabonosas su carácter resbaladizo y sus propiedades lubricantes.

Los fosfolípidos presentes en las células espontáneamente forman bicapas fosfolipídicas simétricas. Cada capa de fosfolípidos, en esta estructura laminar, se denomina *lamela* o *laminilla*. Las cadenas de acilos grasos hidrofóbicas de cada lamela reducen al mínimo el contacto con el agua y se alinean estrechamente en el centro de la bicapa, lo que forma una zona central hidrofóbica de aproximadamente 3 a 4 nm de espesor (Fig. 10-3b). El estrecho empaquetamiento de estas colas no polares es estabilizado por interacciones de van der Waals entre las cadenas hidrocarbonadas. Los puentes de hidrógeno y las interacciones iónicas estabilizan las interacciones de los grupos de las cabezas polares de los fosfolípidos entre sí y con el agua. La microscopía electrónica de cortes delgados de las membranas de las células teñidas con tetróxido de osmio, que se une fuertemente a los grupos polares de las cabezas de los fosfolípidos, muestra la estructura de la bicapa (Fig. 10-3a). Un corte transversal de una membrana simple teñida con tetróxido de osmio tiene el aspecto de una vía de ferrocarril: dos líneas delgadas oscuras (los complejos de las cabezas agrupadas teñidas) con un espacio claro, uniforme, de alrededor de 2 nm entre éstas (las colas hidrofóbicas).

Una bicapa fosfolipídica puede tener un tamaño casi ilimitado (desde micrómetros [µm] a milímetros [mm] de longitud o ancho) y puede contener decenas de millones de moléculas de fosfolípidos. La bicapa de fosfolípidos es la unidad estructural básica de casi todas las membranas biológicas. Su centro hidrofóbico evita que la mayoría de las sustancias hidrosolubles atraviesen la membrana de un lado al otro. Aunque las biomembranas contienen otras moléculas (p. ej., colesterol, glucolípidos, proteínas), la bicapa fosfolipídica es la que separa las dos soluciones acuosas y actúa como barrera de permeabilidad. Así, la bicapa lipídica define los compartimentos celulares y permite una separación entre el interior de la célula y el mundo externo.

Las bicapas fosfolipídicas forman un compartimento sellado que rodea un espacio acuoso interno

Las bicapas fosfolipídicas pueden generarse en el laboratorio por medios simples, empleando fosfolípidos químicamente puros o mezclas de lípidos de la composición que se encuentra en las membranas celulares (Fig. 10-4). Estas bicapas sintéticas poseen tres propiedades importantes. En primer lugar, son virtualmente impermeables a los solutos solubles en agua (hidrofílicos) que no difunden rápidamente a través de la bicapa. Éstos incluyen sales, azúcares y la mayoría del resto de moléculas hidrofílicas pequeñas entre las que se encuentra la molécula de agua. La segunda propiedad de la bicapa es su estabilidad. Las interacciones hidrofóbicas y de van der Waals, entre las cadenas de acilos grasos, mantienen la integridad del interior de la estructura de la bicapa. Aun cuando el ambiente acuoso del exterior pueda variar ampliamente en cuanto a fuerza iónica y pH, la bicapa tiene la fuerza requerida para retener su arquitectura característica. En tercer lugar,

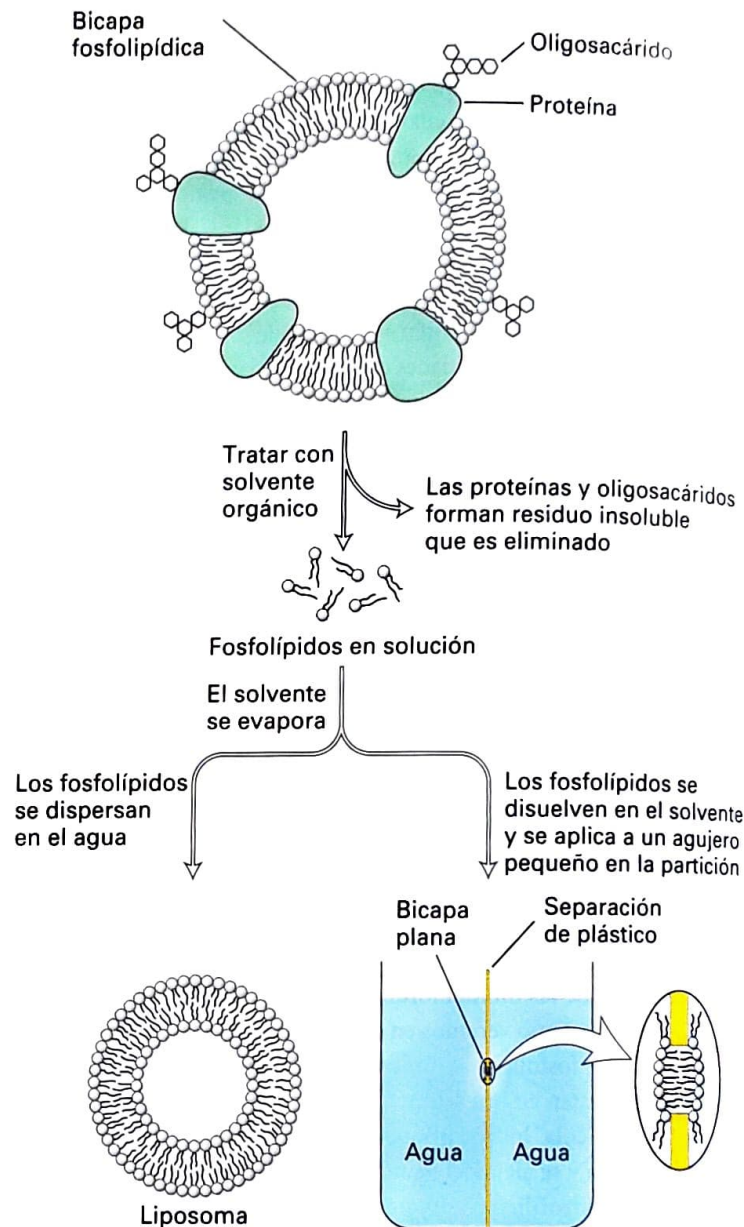


FIGURA EXPERIMENTAL 10-4 Formación y estudio de bicapas fosfolipídicas puras. (Arriba) Un preparado de membranas biológicas se trata con un solvente orgánico, como una mezcla de cloroformo y metanol (3:1), que solubiliza selectivamente los fosfolípidos y el colesterol. Las proteínas y los hidratos de carbono permanecen en un residuo insoluble. El solvente se elimina por evaporación. (Abajo, izquierda) Si los lípidos se dispersan mecánicamente en el agua, forman espontáneamente un liposoma, que se muestra en un corte transversal, con un compartimento interno acuoso. (Abajo, derecha) Una bicapa plana, que también se muestra en un corte transversal, puede formarse por encima de un pequeño agujero en una partición que separa dos fases acuosas; un sistema de este tipo puede emplearse para estudiar las propiedades físicas de las bicapas y su permeabilidad a los solutos.

todas las bicapas fosfolipídicas pueden formar de modo espontáneo compartimentos cerrados sellados, en los que el espacio acuoso del interior se encuentra separado del exterior. Un "borde" de una bicapa fosfolipídica, como el que se muestra en la Figura 10-3b, con el núcleo hidrocarbonado de la bicapa expuesto a una solución acuosa es inestable; las cadenas de laterales de acilos grasos expuestas estarían en un estado mucho más estable energéticamente si no se localizaran en sitios adyacentes a moléculas de agua, sino que se encontraran rodeadas por

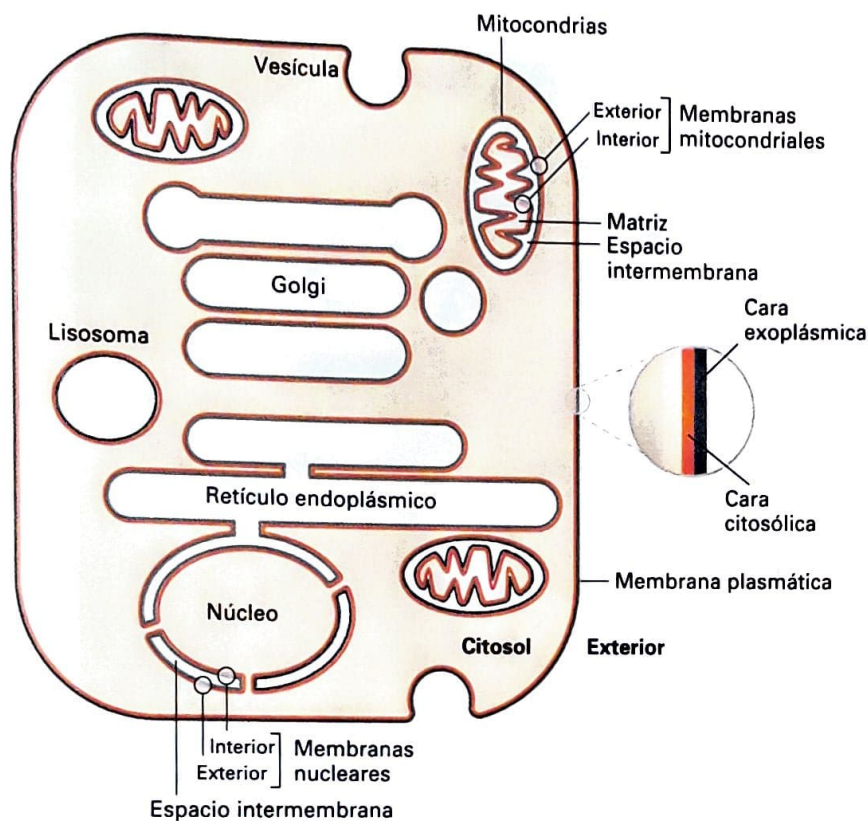


FIGURA 10-5 Las caras de las membranas celulares. La membrana plasmática, una membrana de bicapa simple, rodea a la célula. En esta representación altamente esquemática, el citosol interno (tostado) y el ambiente externo (blanco) definen las caras citosólica (rojo) y exoplásmica (gris) de la bicapa. Las vesículas y algunos orgánulos tienen membranas simples y su espacio acuoso interno (blanco) es topológicamente equivalente al exterior de la célula. Tres orgánulos –el núcleo, la mitocondria y el cloroplasto (que no se muestra)–, están rodeados por dos membranas separadas por un pequeño espacio entre ellas. Las caras exoplásmicas interna y externa de las membranas, que rodean estos orgánulos, bordean el espacio intermembranoso entre éstas. Para simplificar, el interior hidrofóbico de la membrana no se indica en este diagrama.

otras cadenas de ácidos grasos (efecto hidrofóbico; Cap. 2). Así, en solución acuosa, las láminas de bicapas fosfolipídicas espontáneamente sellan sus bordes, formando una bicapa esférica que encierra un compartimento central acuoso. El liposoma que se muestra en la Figura 10-3c es un ejemplo de una estructura, visto en un corte transversal.

Esta propiedad físico-química de una bicapa de fosfolípidos tiene derivaciones importantes para las membranas celulares: no hay membrana en una célula que pueda tener un “borde” con cadenas de ácidos grasos hidrocarbonadas expuestas. Todas las membranas forman compartimentos cerrados, similares en su arquitectura básica a los

liposomas. Como todas las membranas celulares encierran una célula completa o un compartimento interno, tienen una *cara interna* (la superficie orientada hacia el interior del compartimento) y una *cara externa* (la superficie presentada al medio ambiente). Más comúnmente, designamos las dos superficies de una membrana celular como la **cara citosólica** y la **cara exoplásmica**. Esta nomenclatura es útil para resaltar la equivalencia topológica de las caras de las diferentes membranas, como se diagrama en las Figuras 10-5 y 10-6. Por ejemplo, la cara exoplásmica de la membrana plasmática se dirige desde el citosol hacia el espacio extracelular o el ambiente externo y define el límite externo de la célula. La cara citosólica de la membrana plasmática enfrenta al citosol. De modo similar, para los orgánulos y las vesículas rodeados por una membrana única, la cara citosólica enfrenta al citosol. La cara exoplásmica siempre se dirige hacia afuera desde el citosol y, en este caso, está en el interior del orgánulo en contacto con el espacio

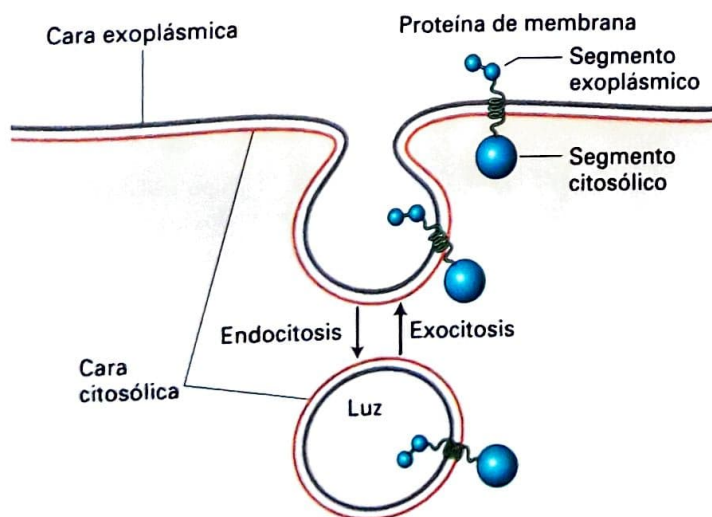


FIGURA 10-6 Las caras de la membrana celular se conservan durante la invaginación y fusión de las membranas. Las superficies rojas de la membrana son las caras citosólicas; las grises, las caras exoplásmicas. Durante la endocitosis, un segmento de la membrana plasmática brota hacia el interior y se dirige hacia el citosol; finalmente, se desprende una vesícula separada. Durante este proceso, la cara citosólica de la nueva vesícula de membrana enfrenta al citosol, y la cara exoplásmica de la nueva vesícula de membrana enfrenta la luz de la vesícula. Durante la exocitosis, una vesícula intracelular se fusiona con la membrana plasmática, y la luz de la vesícula (cara exoplásmica) se conecta con el medio extracelular. Las proteínas que se extienden en la membrana retienen su orientación asimétrica durante la brotación y fusión de las vesículas; en particular, el mismo segmento siempre enfrenta al citosol.

acuoso interno o con la luz. La luz de estas vesículas es topológicamente equivalente al espacio extracelular, un concepto que se comprende con mayor facilidad en relación con las vesículas que surgen por invaginación (endocitosis de la membrana plasmática). La cara externa de la membrana plasmática se transforma en la cara interna de la membrana de la vesícula, mientras que en la vesícula la cara citosólica de la membrana plasmática aún enfrenta al citosol (Fig. 10-6).

Tres orgánulos (el núcleo, las mitocondrias y los cloroplastos) están rodeados no por una sola membrana, sino por dos. La superficie exoplasmática de cada membrana enfrenta el espacio que se encuentra entre las dos membranas. Esto, tal vez, pueda comprenderse mejor en relación con la *hipótesis del endosimbionte*, analizada en el Capítulo 6, que plantea que las mitocondrias y los cloroplastos surgieron en etapas iniciales en la evolución de las células eucariontes por simbiosis con bacterias capaces de fosforilación oxidativa o fotosíntesis, respectivamente (véase la Fig. 6-20).

Las membranas naturales de diferentes tipos celulares muestran diversidad de formas que complementan la función de la célula. La superficie lisa y flexible de la membrana plasmática de los eritrocitos permite que la célula se comprima a través de los capilares sanguíneos estrechos (Fig. 10-7a). Algunas células tienen extensiones largas y delgadas de la membrana plasmática, llamadas **cilios** o **flagelos**, que se agitan a manera de látigo (Fig. 10-7b). Este movimiento hace que el líquido fluya a través de la superficie de una lámina de células o que un espermatozoide nade hacia un óvulo. Las distintas formas y propiedades de las biomembranas generan un interrogante clave en la biología celular, es decir, de qué manera la composición de las membranas biológicas se regula para establecer y mantener la identidad de las diversas estructuras de membrana y los compartimentos delimitados por ésta. Volveremos a esta pregunta en la Sección 10-3 y en el Capítulo 14.

Las biomembranas contienen tres clases principales de lípidos

El término *fosfolípido* es algo genérico y comprende distintos tipos de moléculas de múltiples clases. Se refiere a cualquier lípido anfipático con una cabeza polar fosfato y dos colas hidrofóbicas. Una biomembrana típica, de hecho, contiene tres clases de lípidos anfipáticos: los fosfoglicéridos, los esfingolípidos y los esteroides, que difieren en sus estructuras químicas, abundancia y funciones en la membrana (Fig. 10-8). Si bien todos los fosfoglicéridos son fosfolípidos, solo ciertos esfingolípidos lo son y ningún esteroide lo es.

Los **fosfoglicéridos** son la clase más abundante de fosfolípidos en la mayoría de las membranas, derivados del glicerol 3-fosfato (véase la Fig. 10-8a). Una molécula de fosfoglicérido típica consiste en una cola hidrofóbica compuesta por dos cadenas de ácidos grasos (acilo) esterificadas a los dos grupos hidroxilos en el glicerol fosfato y un grupo con una cabeza polar unida al grupo fosfato. Las dos cadenas de acilos grasos pueden diferir en el número de carbonos que contienen (normalmente, 16 o 18) y en su grado de saturación (0, 1 o 2 dobles enlaces). Un fosfoglicérido se clasifica de acuerdo con la naturaleza del grupo de su cabeza. En las fosfatidilcolinas, los fosfolípidos más abundantes en la membrana plasmática, el grupo de la cabeza consiste en colina, un alcohol cargado positivamente, esterificado al fosfato cargado negativamente. En otros fosfoglicéridos, una molécula que contiene OH como la etanolamina, serina o el inositol deriva-

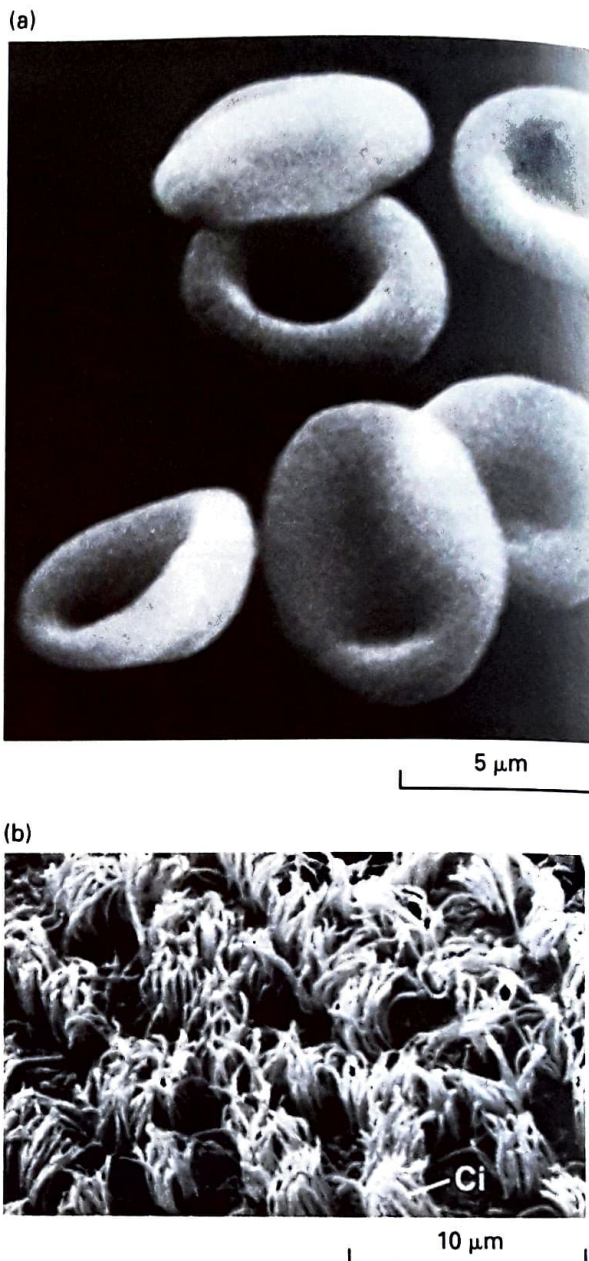


FIGURA 10-7 Variación de las biomembranas en diferentes tipos celulares. (a) Una membrana lisa, flexible cubre la superficie de la célula discoidal eritrocitaria, como se observa en esta fotomicrografía electrónica de barrido. (b) Mechones de cilios (Ci) se proyectan desde las células endimarias que tapizan los ventrículos cerebrales. (Parte [a] Copyright © Omi Kron/Photo Researchers, Inc. Parte [b] tomada de R.G. Kessel and R.H. Kardon, 1979, *Tissues and Organs: A Text-Atlas of Scanning Electron Microscopy*, W. H. Freeman and Company.)

do del azúcar está ligada al grupo fosfato. El grupo fosfato de carga negativa y los grupos cargados positivamente o los grupos hidroxilo de la cabeza interactúan fuertemente con el agua. A pH neutro, algunos fosfoglicéridos (p. ej., fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina) no llevan carga eléctrica neta, mientras que otros (p. ej., fosfatidilinositol y fosfatidilserina) llevan una carga negativa neta única. Sin embargo, los grupos polares de la cabeza, en todos estos fosfolípidos, pueden empaquetarse juntos en la estructura característica de la bicapa. Cuando las fosfolipasas actúan sobre los fosfoglicéridos, producen lisofosfolípidos, que carecen de una de las dos cadenas acilo. Los lisofosfolípidos no sólo son moléculas de señalización importantes,

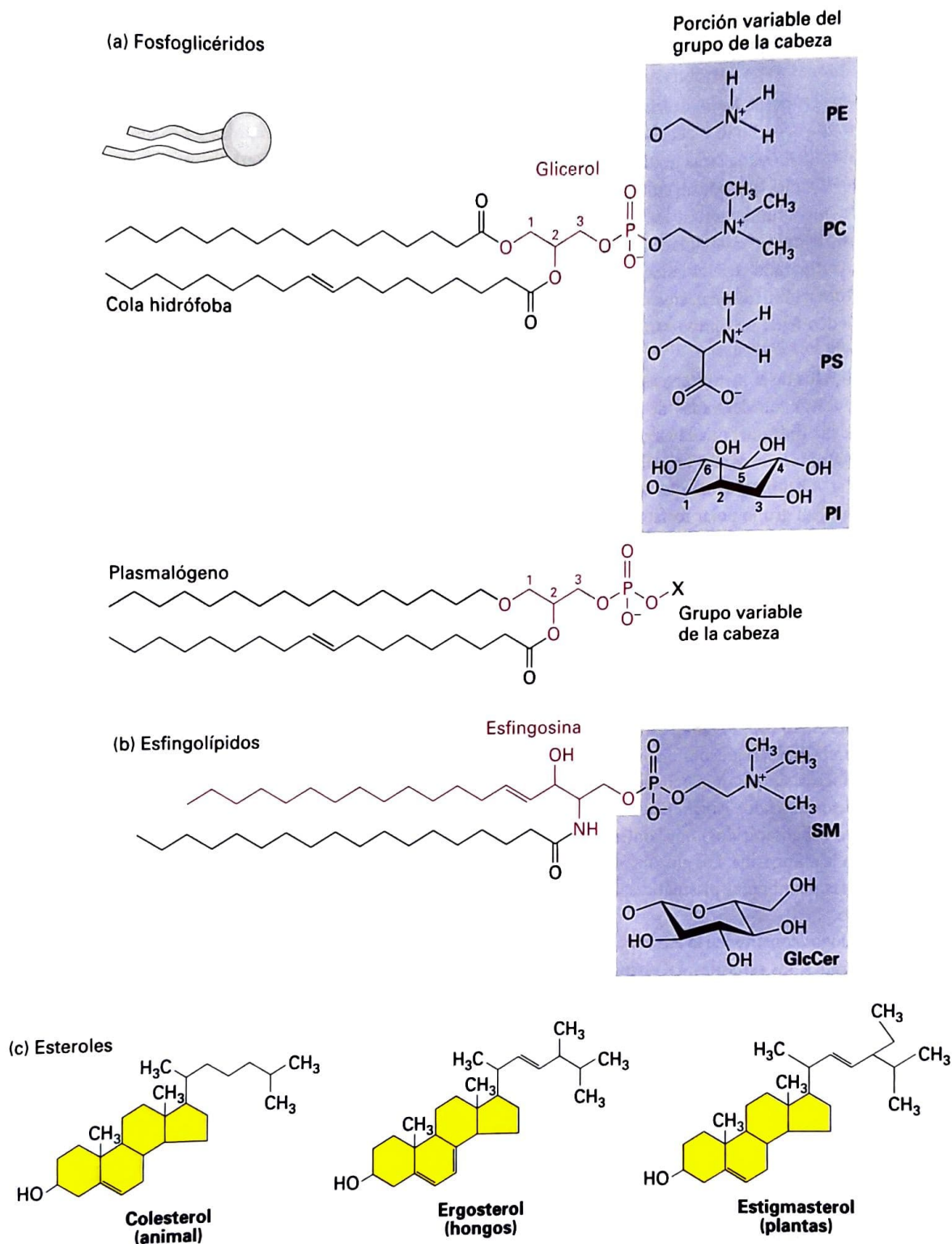


FIGURA 10-8 Tres clases de lípidos de la membrana. (a) La mayoría de los fosfoglicéridos son derivados del glicerol 3-fosfato (rojo), que contiene dos cadenas de ácidos grasos esterificados que constituyen la "cola" hidrofóbica y un "grupo de la cabeza" polar esterificado al fosfato. Los ácidos grasos pueden variar en longitud y ser saturados (sin dobles enlaces) o insaturados (uno, dos o tres dobles enlaces). En la fosfatidilcolina (PC), el grupo de la cabeza es dos o tres dobles enlaces). También se muestran las moléculas unidas al grupo fosfato en otros tres fosfoglicéridos comunes: la fosfatidiletanolamina (PE), la fosfatidilserina (PS) y el fosfatidilinositol (PI). Los plasmalógenos contienen una cadena de acilo graso unida al glicerol por un enlace éster y otra unida mediante un enlace éter; éstas contienen grupos similares, en la cabeza, a los de los otros fosfoglicéridos. (b) Los esfingolípidos son derivados de la esfingosina (rojo), un amino alcohol con una cadena hidrocarbonada larga. Varias cadenas de ácidos grasos

están conectadas a la esfingosina por un enlace amida. Las esfingomielinas (SM) que contienen en su cabeza un grupo fosfocolina son fosfolípidos. Otros esfingolípidos son glucolípidos en los cuales un único residuo de azúcar o un oligosacárido ramificado está unido al esqueleto de esfingosina. Por ejemplo, un glucocerebrósido simple (GlcCer) posee un grupo glucosa en la cabeza. (c) Los principales esteroides de los animales (colesterol), hongos (ergosterol) y vegetales (estigmasterol) difieren ligeramente en su estructura, pero todos sirven como componentes clave de las membranas celulares. La estructura básica de los esteroides es un hidrocarburo de cuatro anillos (amarillo). Al igual que otros lípidos de la membrana, los esteroides son anfipáticos. El grupo hidroxilo único es equivalente al grupo polar de la cabeza de otros lípidos; el anillo conjugado y la cola hidrocarbonada corta forman la cola hidrofóbica. (Véase H. Sprong y cols., 2001, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2:504.)

liberadas desde las células y reconocidas por receptores específicos; su presencia puede también afectar las propiedades físicas de las membranas en las que residen.

Los **plasmalógenos** son un grupo de fosfoglicéridos que contienen una cadena de acilo graso unida al carbono 2 del glicerol mediante un enlace éster y una cadena hidrocarbonada larga unida al carbono 1 del glicerol por un éter (C—O—C), más que por un enlace éster. Los plasmalógenos son particularmente abundantes en los tejidos cerebral y cardíaco de seres humanos. La mayor estabilidad química del enlace éter de los plasmalógenos, comparado con los enlaces éster o las diferencias sutiles en su estructura tridimensional, en comparación con las de otros fosfoglicéridos pueden tener una importancia fisiológica aún no descubierta.

Una segunda clase de lípidos de la membrana es la de los **esfingolípidos**. Todos estos compuestos son derivados de la esfingosina, un amino alcohol con una cadena hidrocarbonada larga que contiene un ácido graso de cadena larga unido mediante un enlace amida al grupo esfingosina (véase la Fig. 10-8b). Al igual que los fosfoglicéridos, algunos esfingolípidos tienen un grupo polar fosfato en su cabeza. En la esfingomielina, el esfingolípidos más abundante, la fosfocolina, está unida al grupo hidroxilo terminal de esfingosina (véase la Fig. 10-8b, SM). De modo que la esfingomielina es un fosfolípido, y su estructura general es bastante similar a la de la fosfatidilcolina. Las esfingomielinas son similares, en su forma, a los fosfoglicéridos y pueden formar bicapas mixtas con éstos. Otros esfingolípidos son **glucolípidos** anfipáticos cuyos grupos polares en sus cabezas son azúcares que no están ligados mediante un grupo fosfato (por lo tanto, técnicamente, no son fosfolípidos). El glucosil cerebrósido, el glucoesfingolípidos más simple, contiene una unidad de glucosa simple unida a la esfingosina. En los glucoesfingolípidos complejos llamados **gangliósidos**, una o dos cadenas de azúcares ramificadas (oligosacáridos) que contienen grupos de ácido siálico están unidas a la esfingosina. Los glucolípidos constituyen 2-10% del lípido total en las membranas plasmáticas; son más abundantes en el tejido nervioso.

El **colesterol** y sus análogos constituyen la tercera clase importante de lípidos de las membranas, los **esteroides**. La estructura básica de los esteroides es la de un hidrocarburo isoprenoide de cuatro anillos. La estructura del principal esteroide de las levaduras (el ergosterol) y los fitosteroides vegetales (p. ej., el estigmasterol) difiere ligeramente de la del colesterol, el principal esteroide de los animales (véase la Fig. 10-8c). Las pequeñas diferencias en las vías biosintéticas y en las estructuras de los esteroides de los hongos y los animales son la base de la mayoría de los fármacos antimicóticos que se emplean en la actualidad. El colesterol, al igual que los otros dos esteroides, tiene un sustituyente hidroxilo en un anillo. Si bien el colesterol tiene una composición casi completamente hidrocarbonada, es anfipático porque su grupo hidroxilo puede interactuar con el agua. Como carece de un grupo fosfato en su cabeza, no es un fosfolípido. El colesterol abunda especialmente en las membranas plasmáticas de las células de los mamíferos, pero está ausente en la mayoría de las células procariontes y vegetales. Hasta el 30-50% de los lípidos, en las membranas plasmáticas de los vegetales, consiste en ciertos esteroides únicos de los vegetales. Entre el 50 y el 90% del colesterol de la mayoría de las células de los mamíferos está presente en la membrana plasmática y en las vesículas asociadas. El colesterol y otros esteroides son demasiado hidrofóbicos como para formar una estructura de bicapa por sí mismos. En lugar de ello, a las concentraciones que se encuentran en las membranas naturales, estos esteroides deben intercalarse entre moléculas de fosfo-

lípidos para ser incorporados a las biomembranas. Cuando se intercalan de este modo, los esteroides proporcionan soporte estructural a las membranas, lo que evita un empaquetamiento demasiado cercano de las cadenas acilo de los fosfolípidos como para mantener una medida significativa de la fluidez de la membrana y, al mismo tiempo, conferir la rigidez necesaria requerida para dar soporte mecánico. Parte de estos efectos pueden ser altamente locales, como en el caso de las balsas de lípidos, analizadas más adelante.

Además de su papel estructural en las membranas, el colesterol es el precursor de varias moléculas importantes con actividad biológica. Éstas incluyen los **ácidos biliares**, que se sintetizan en el hígado y ayudan a emulsionar las grasas de la dieta para su digestión y absorción en los intestinos; las hormonas esteroideas producidas por las células endocrinas (p. ej., la glándula suprarrenal, los ovarios y los testículos); y la vitamina D, producida por la piel y los riñones. Otra función crítica del colesterol es su adición covalente a la proteína Hedgehog, una molécula de señalización clave en el desarrollo embrionario (Cap. 16).

La mayoría de los lípidos y muchas proteínas tienen movilidad lateral en las biomembranas

En el plano bidimensional de una bicapa, el movimiento térmico permite a las moléculas de lípidos rotar libremente alrededor de sus ejes longitudinales y difundir en dirección lateral dentro de cada lamela. Como estos movimientos son laterales o rotacionales, las cadenas de acilo graso permanecen en el interior hidrofóbico de la bicapa. Tanto en las membranas naturales como artificiales, una molécula de lípido

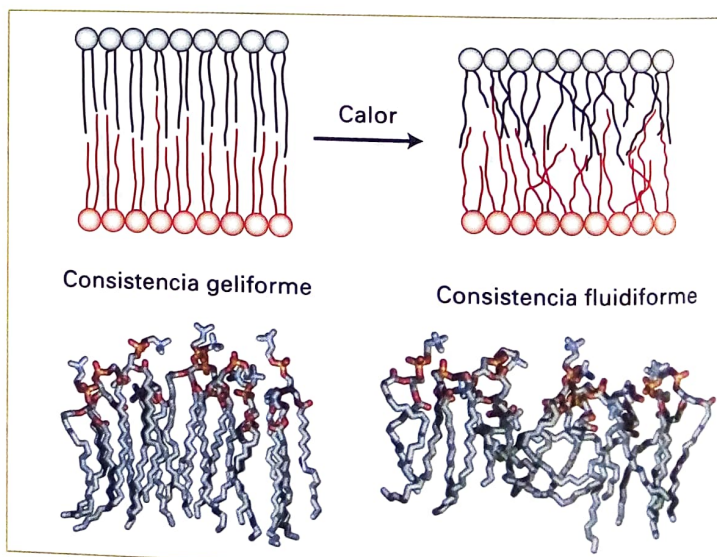


FIGURA 10-9 Bicapa lipídica geliforme y fluida. (Arriba) Dibujo de la transición de gel a fluido. Los fosfolípidos con cadenas acilo grasas saturadas largas tienden a ensamblarse en una bicapa geliforme altamente ordenada, en la cual hay poca superposición de las colas no polares en las dos lamelas. El calor desordena las colas no polares e induce una transición de gel a fluido dentro de un espectro de temperatura de solo unos pocos grados. A medida que la cadena se desordena, el espesor de la bicapa también disminuye. (Abajo) Modelos moleculares de monocapas fosfolipídicas en los estados de gel y fluido, determinados por cálculos de dinámica molecular. (La parte inferior basada en H. Heller y cols., 1993, *J. Phys. Chem.* **97**:8343.)

típica intercambia el lugar con sus vecinas, en una lamela, aproximadamente 10^7 veces por segundo y difunde varios micrómetros por segundo, a 37 °C. Estas velocidades de difusión indican que la bicapa es 100 veces más viscosa que el agua —tiene casi la misma viscosidad que el aceite de oliva—. Aunque los lípidos difundan más lentamente en la bicapa que en un solvente acuoso, un lípido de la membrana podría difundir la longitud de una bacteria típica (1 μm) en solo un segundo y la longitud de una célula animal, en aproximadamente 20 segundos. Cuando membranas fosfolípídicas artificiales puras se enfrían por debajo de 37 °C, los lípidos pueden sufrir una *transición de fase* desde un estado licuiforme (fluido) a un estado geliforme (semisólido), análogo al de la transición líquido-sólido que se produce cuando el agua líquida se congela (Fig. 10-9). Por debajo de la temperatura de transición de fase, la velocidad de difusión de los lípidos cae precipitadamente. A las temperaturas fisiológicas habituales, el interior hidrofóbico de las membranas naturales, por lo general, tiene una baja viscosidad y una consistencia fluidiforme, en contraste con la consistencia geliforme observada a bajas temperaturas.

En las bicapas de membranas puras (en ausencia de proteínas), los fosfolípidos y los esfingolípidos rotan y se mueven en dirección lateral, pero no migran en forma espontánea ni alternan (*flip-flop*) de una lamela a la otra. La barrera energética para mover el grupo de la cabeza polar desde su ambiente acuoso a través del núcleo hidrocarbonado de la bicapa hasta la solución acuosa del otro lado. Se requieren proteínas especiales de la membrana, tratadas en el **Capítulo 11**, para que los lípidos de la membrana y otras moléculas polares alternen de una lamela a la otra.

Los movimientos laterales de proteínas y lípidos pueden ser cuantificados mediante una técnica llamada *recuperación de la fluorescencia después de la fotodecoloración* (FRAP). Se utilizan fosfolípidos que contienen un sustituyente fluorescente para hacer un seguimiento del movimiento de los lípidos. Para las proteínas, se marca con un colorante fluorescente un fragmento de un anticuerpo monoclonal específico para el dominio exoplasmático de la proteína deseada que tiene solo un sitio de unión al antígeno. Con este método, que se describe en la **Figura 10-10**, puede

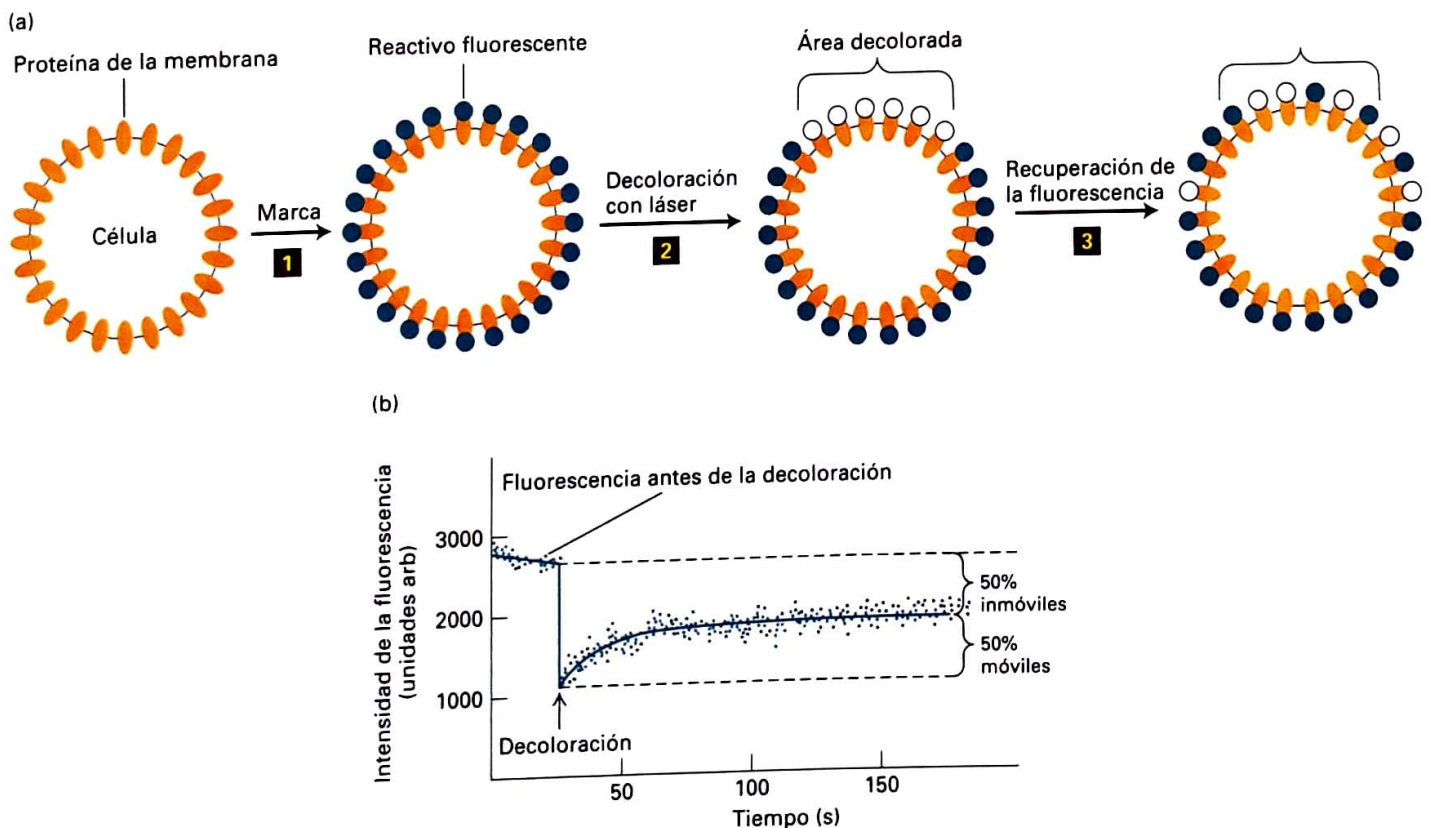


FIGURA EXPERIMENTAL 10-10 Recuperación de la fluorescencia después de experimentos de fotodecoloración (FRAP) que permiten cuantificar el movimiento lateral de las proteínas y lípidos dentro de la membrana plasmática. (a) Protocolo experimental. Paso 1 las células se marcan, en primer lugar, con un reactivo fluorescente que se une de un modo uniforme a un lípido o a una proteína específicos de la membrana. Paso 2 luego, se enfoca una luz láser sobre un área pequeña de la superficie, lo que decolora de manera irreversible el reactivo unido y reduce, de este modo, la fluorescencia en el área iluminada. Paso 3 con el tiempo, aumenta la fluorescencia de la zona a medida que las moléculas de superficie fluorescentes no decoloradas difunden hacia ésta y las decoloradas abandonan el lugar. El grado

de recuperación de la fluorescencia en la zona decolorada es proporcional a la fracción de moléculas marcadas, que son móviles en la membrana. (b) Los resultados de un experimento FRAP con células de hepatoma humanas tratadas con un anticuerpo fluorescente específico para la proteína receptora de la asialoglucoproteína. El hallazgo de que el 50% de la fluorescencia regresó al área decolorada indica que el 50% de las moléculas del receptor, en la zona de membrana iluminada, eran móviles, y el 50% estaban inmóviles. Como la velocidad de recuperación de la fluorescencia es proporcional a la velocidad a la cual las moléculas marcadas se mueven hacia la región decolorada, el coeficiente de difusión de una proteína o lípido en la membrana puede calcularse a partir de estos datos. (Véase Yl. Hennis y cols., 1990. *J Cell Biol* 111:1409)

ser determinada la velocidad a la cual se mueven las moléculas en la membrana (el coeficiente de difusión) así como la proporción de moléculas con movilidad lateral.

Los resultados de los estudios de FRAP, con fosfolípidos marcados con fluorescencia, han mostrado que en las membranas plasmáticas de los fibroblastos, todos los fosfolípidos tienen movilidad libre en distancias de aproximadamente 0,5 μm , pero no pueden difundir a distancias mucho mayores. Estos hallazgos sugieren que hay regiones ricas en proteínas en la membrana plasmática, de aproximadamente 1 μm de diámetro, que separan áreas ricas en lípidos que contienen la mayor parte de los fosfolípidos de membrana. Los fosfolípidos son libres de difundir dentro de estas regiones, pero no desde una región rica en lípidos hacia otra adyacente. Más aún, la velocidad de difusión lateral de los lípidos en la membrana plasmática es casi de un orden de magnitud más lenta que en las bicapas de fosfolípidos puros: las constantes de difusión $10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ y $10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$ son características de la membrana plasmática y de una bicapa lipídica, respectivamente. Esta diferencia sugiere que los lípidos pueden estar unidos estrechamente, si bien no de un modo irreversible, a ciertas proteínas integrales en algunas membranas, como de hecho se ha demostrado recientemente (véase el análisis sobre fosfolípidos anulares más adelante).

La composición de los lípidos influye en las propiedades físicas de las membranas

Una célula típica contiene muchos tipos distintos de membranas, cada una con propiedades únicas derivadas de su mezcla particular de lípidos y proteínas. Los datos del Cuadro 10-1 ilustran la variación en la composición de lípidos en las diferentes biomembranas. Varios fenómenos contribuyen a estas diferencias. Por ejemplo, en cuanto a la abundancia relativa de los fosfoglicéridos y los esfingolípidos, és-

tas difieren entre las membranas en el retículo endoplásmico (RE), donde se sintetizan los fosfolípidos, y el Golgi, donde se sintetizan los esfingolípidos. La proporción de esfingomielina como el porcentaje del fósforo de lípidos en la membrana total es aproximadamente 6 veces más elevado en las membranas del Golgi que en las membranas del RE. En otros casos, el movimiento de las membranas desde un compartimento celular al otro puede enriquecer selectivamente ciertas membranas en lípidos tales como el colesterol. En respuesta a los diferentes ambientes de un organismo, diversos tipos de células generan membranas con distintas composiciones lipídicas. En las células que tapizan el intestino, por ejemplo, las membranas que enfrentan el ambiente al que se digieren los nutrientes de la dieta tienen un cociente esfingolípido-fosfoglicérido-colesterol de 1:1:1, en lugar de 0,5:1,5:1 presente en las células sometidas a menos estrés. La concentración relativamente elevada de esfingolípidos, en esta membrana intestinal, puede aumentar su estabilidad debido a los extensos puentes de hidrógeno generados por el grupo -OH libre en el medio esfingosina (véase la Fig. 10-8).

El grado de fluidez de la bicapa depende de la composición de lípidos, la estructura de las colas hidrofóbicas de los fosfolípidos y la temperatura. Como ya se ha notado, las interacciones de van der Waals y el efecto hidrofóbico hacen que las colas no polares de los fosfolípidos se agreguen. Las cadenas largas de acilos grasos saturados tienen la mayor tendencia a agregarse; se empaquetan estrechamente en un estado geliforme. Los fosfolípidos con cadenas cortas de acilos grasos, que tienen menos área superficial y, por lo tanto menor cantidad de interacciones de van der Waals, forman bicapas más fluidas. De modo similar, los pliegues en las cadenas de acilos grasos cis-insaturadas (Cap. 2) producen la formación de interacciones de van der Waals menos estables con otros lípidos y, así, en bicapas más fluidas que las cadenas saturadas lineales que pueden empaquetarse más estrechamente entre sí.

Cuadro 10-1 Principales componentes lipídicos de biomembranas seleccionadas				
Fuente/Localización	Composición (mol %)			
	PC	PE + PS	SM	Colesterol
Membrana plasmática (eritrocitos humanos)	21	29	21	26
Membrana de mielina (neuronas humanas)	16	37	13	34
Membrana plasmática (<i>E. coli</i>)	0	85	0	0
Membrana de retículo endoplásmico (rata)	54	26	5	7
Membrana de Golgi (rata)	45	20	13	13
Membrana interna de la mitocondria (rata)	45	45	2	7
Membrana externa de la mitocondria (rata)	34	46	2	11
Localización de la lamela primaria	Exoplásmica	Citosólica	Exoplásmica	Ambas

PC = fosfatidilcolina; PE = fosfatidiletanolamina; PS = fosfatidilserina; SM = esfingomielina.
FUENTE: W. Dowhan y M. Bogdanov, 2002, en D. E. Vance y J. E. Vance, eds., *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins, and Membranes*, Elsevier.

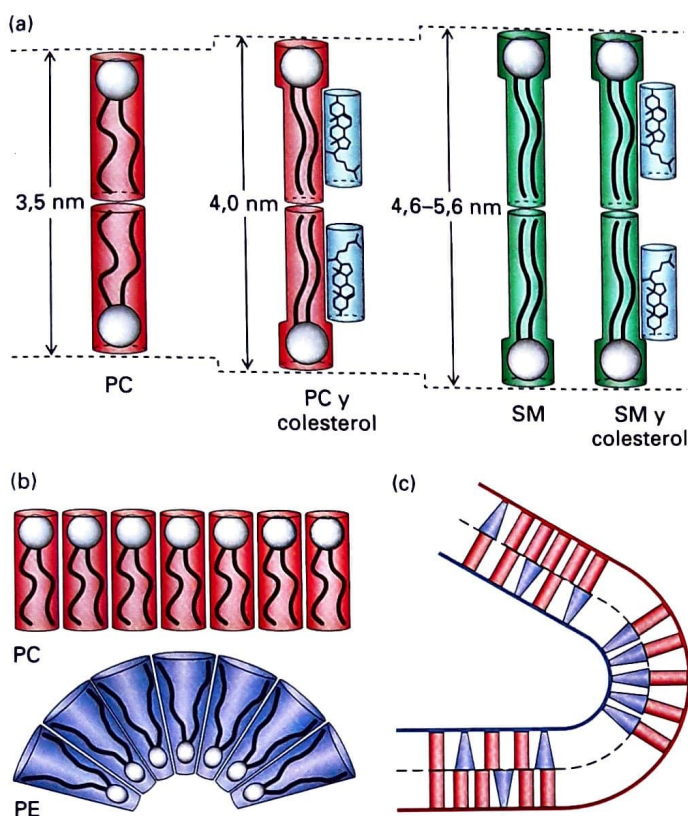


FIGURA 10-11 Efecto de la composición lipídica en el grosor y curvatura de la bicapa. (a) La bicapa de esfingomielina (SM) pura es más gruesa que una formada por un fosfoglicérido, como la fosfatidilcolina (PC). El colesterol ejerce un efecto ordenador de lípidos en las bicapas de fosfoglicéridos que incrementa su grosor, pero no afecta el grosor de la bicapa más ordenada de SM. (b) Los fosfolípidos, como la PC, tienen una forma cilíndrica y forman especialmente monocapas planas, mientras que los que tienen grupos más pequeños en sus cabezas, como la fosfatidiletanolamina (PE), tienen una forma cónica. (c) Una bicapa enriquecida con PC en la lamela exoplásmica y con PE en la cara citosólica, como sucede en muchas membranas plasmáticas, tendrá una curvatura natural. (de H. Sprong y cols., 2001, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2:504.)

El colesterol es importante para mantener la fluidez adecuada de las membranas naturales, una propiedad que parece ser esencial para el crecimiento normal y la reproducción de las células. El colesterol restringe el movimiento al azar de los grupos de las cabezas de los fosfolípidos en las superficies externas de las lamelas, pero sus efectos en el movimiento de las colas largas de los fosfolípidos dependen de la concentración. A las concentraciones de colesterol presentes en la membrana plasmática, la interacción del anillo de esteroide con las colas hidrofóbicas largas de los fosfolípidos tiende a inmovilizar estos lípidos y, de este modo, disminuye de fluidez de la biomembrana. Es esta propiedad la que puede ayudar a organizar la membrana plasmática en subdominios discretos de composición proteica y lipídica única. A concentraciones de colesterol más bajas, sin embargo, el anillo de esteroide separa y dispersa las colas de los fosfolípidos; esto hace que las regiones internas de la membrana se tornen ligeramente más fluidas.

La composición de lípidos de una bicapa influye también en su espesor, que puede, a su vez, influir en la distribución de los otros componentes de la membrana, como las proteínas, en una membra-

na particular. Se ha argumentado que segmentos relativamente cortos transmembrana de ciertas enzimas situadas en el complejo de Golgi (las glucosiltransferasas) son una adaptación a la composición lipídica de la membrana del aparato de Golgi, que contribuye a la retención de estas enzimas en el interior de dicho complejo. Los resultados de los estudios biofísicos efectuados en membranas artificiales demuestran que la esfingomielina se asocia en una bicapa más geliforme y gruesa que los fosfoglicéridos (Fig. 10-11a). El colesterol y otras moléculas que disminuyen la fluidez de la membrana también incrementan su grosor. Como las colas de esfingomielina ya están estabilizadas de modo óptimo, la adición de colesterol carece de efecto en el grosor de una bicapa de esfingomielina.

Otra propiedad dependiente de la composición de lípidos de una bicapa es la curvatura, que depende de los tamaños relativos de los grupos de las cabezas polares y de las colas no polares de sus fosfolípidos constituyentes. Los lípidos con colas largas y los grupos grandes de las cabezas son de forma cilíndrica; los grupos de las cabezas pequeñas son de forma cónica (Fig. 10-11b). Como resultado, las bicapas compuestas por lípidos cilíndricos son relativamente planas, mientras que las que contienen grandes cantidades de lípidos coniformes forman bicapas curvas (Fig. 10-11c). Este efecto de la composición de lípidos en la curvatura de la bicapa puede cumplir un papel en la formación de membranas muy curvadas, como los sitios de evaginación viral (véase la Fig. 10-2) y de formación de vesículas internas desde la membrana plasmática (véase la Fig. 10-6), así como en estructuras de membrana estable especializadas, como las microvellosidades. Varias proteínas se unen a la superficie de las bicapas fosfolipídicas y provocan la curvatura de la membrana; estas proteínas son importantes para la formación de vesículas de transporte que brotan desde una membrana donante (Cap. 14).

La composición de lípidos es diferente en las lamelas exoplásmica y citosólica

Una característica de todas las biomembranas es la asimetría en la composición de lípidos a través de la bicapa. Aunque la mayoría de los fosfolípidos está presente en ambas lamelas de la membrana, algunos son comúnmente más abundantes en una lamela que en la otra. Por ejemplo, en las membranas plasmáticas de los eritrocitos humanos y de las células de riñón caninas Madin Darby (MDCK) cultivadas, casi la mayoría de la esfingomielina y la fosfatidilcolina, ambas contribuyentes a la formación de bicapas menos fluidas, se encuentran en la lamela exoplásmica. Por el contrario la fosfatidiletanolamina, la fosfatidilserina y el fosfatidilinositol que forman bicapas más fluidas, preferentemente se localizan en la lamela citosólica. Como la fosfatidilserina y el fosfatidilinositol llevan carga negativa neta, el tramo de aminoácidos en la cara citoplasmática de la proteína de paso único en la proximidad del segmento transmembrana, con frecuencia, está enriquecida con residuos con carga positiva (Lys, Arg), la regla "interior positivo". Esta segregación de lípidos a través de la bicapa puede ejercer influencia en la curvatura de la membrana (véase la Fig. 10-11c). A diferencia de los fosfolípidos particulares, el colesterol está distribuido en forma relativamente pareja en ambas lamelas de las membranas celulares. La abundancia relativa de un fosfolípido particular en ambas lamelas de la membrana plasmática puede determinarse en forma experimental, sobre la base de la susceptibilidad de los fosfolípidos a la hidrólisis por **fosfolipasas**, enzimas que escinden

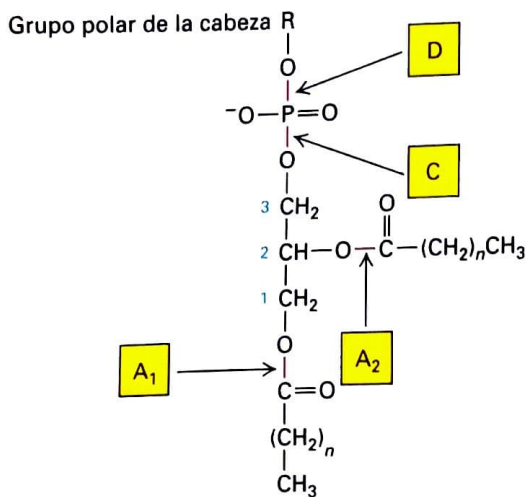


FIGURA 10-12 Especificidad de las fosfolipasas. Cada tipo de fosfolipasa escinde uno de los enlaces susceptibles, que se muestran en rojo. Los átomos de carbono del glicerol están indicados con números pequeños. En las células intactas, solo los fosfolípidos de la lamela exoplásmica de la membrana plasmática son escindidos por las fosfolipasas del medio que las rodea. La fosfolipasa C, una enzima citosólica, segmenta ciertos fosfolípidos en la lamela citosólica de la membrana plasmática.

los enlaces éster por medio de los cuales se encuentran conectadas las cadenas acilo y los grupos de las cabezas que contienen las moléculas de los lípidos (Fig. 10-12). Cuando se añaden al medio externo, las fosfolipasas no pueden atravesar la membrana y así escinden los grupos de las cabezas solo de aquellos lípidos presentes en la cara exoplásmica; los fosfolípidos, en la lamela citosólica, son resistentes a la hidrólisis porque las enzimas no pueden penetrar la cara citosólica de la membrana plasmática.

Aún no está claro el modo en el que surge la distribución asimétrica de los fosfolípidos en las lamelas de la membrana. Como se ha notado, en las bicapas puras de fosfolípidos no hay una migración espontánea de éstos o una alternancia (*flip-flop*) de una lamela a la otra. En parte, la asimetría en la distribución de los fosfolípidos puede reflejar el lugar en el que estos lípidos se sintetizan en el retículo endoplásmico y el complejo de Golgi. La esfingomielina se sintetiza en la cara luminal (exoplásmica) del complejo de Golgi, que se transforma en la cara exoplásmica de la membrana plasmática. Por el contrario, los fosfoglicéridos se sintetizan en la cara citosólica de la membrana del RE, que es topológicamente equivalente a la cara citosólica de la membrana plasmática (véase la Fig. 10-5). Sin embargo, claramente esta explicación no da cuenta de la localización preferencial de la fosfatidilcolina (un fosfoglicérido) en la lamela exoplásmica. El movimiento de este fosfoglicérido, y quizás de otros, desde una lamela a la otra en algunas membranas naturales probablemente sea catalizado por proteínas de transporte impulsadas por ATP, denominadas **flipasas**, que se analizan en el Capítulo 11.

La localización preferencial de los lípidos en una cara de la bicapa es necesaria para una diversidad de funciones dependientes de la membrana. Por ejemplo, los grupos de la cabeza de todas las formas fosforiladas del fosfatidilinositol (véase la Fig. 10-8; PI), una fuente importante de segundos mensajeros, enfrentan el citosol. La estimulación de muchos receptores de la superficie celular por el ligando correspondiente da como resultado la activación de la enzima ci-

tosólica fosfolipasa C, que puede, entonces, hidrolizar el enlace que conecta los fosfoinosítoles con el diacilglicerol. Como veremos en el Capítulo 15, tanto los fosfoinosítoles hidrosolubles y el diacilglicerol embebido en la membrana participan en las vías de señalización intracelular que afectan muchos aspectos del metabolismo celular. La fosfatidilserina también es normalmente más abundante en la lamela citosólica de la membrana plasmática. En las etapas iniciales de la estimulación plaquetaria por el suero, la fosfatidilserina es brevemente translocada a la cara exoplásmica, supuestamente por una enzima flipasa, donde activa las enzimas que participan en la coagulación sanguínea. Cuando las células mueren, la asimetría lipídica ya no se mantiene, y la fosfatidilserina, normalmente abundante en la lamela citosólica, se encuentra ahora aumentada en la exoplásmica. Esta exposición incrementada se detecta mediante el uso de la versión marcada de la Anexina V, una proteína que se une en forma específica a la fosfatidilserina, para medir el inicio de la muerte celular programada (apoptosis).

El colesterol y los esfingolípidos se agrupan con proteínas específicas en microdominios de la membrana

Los lípidos de la membrana no se encuentran distribuidos al azar (mezclados uniformemente) en cada lamela de la bicapa. Una pista de que los lípidos pueden estar organizados dentro de las lamelas fue el descubrimiento de que éstos permanecen después de la extracción (solubilización) de las membranas plasmáticas con detergentes no iónicos, como el Tritón-X100, y contienen predominantemente dos especies: el colesterol y la esfingomielina. Como estos dos lípidos se encuentran en las bicapas más ordenadas, menos fluidas, los investigadores formularon la hipótesis de que forman microdominios, llamados **balsas lipídicas**, rodeados por otros fosfolípidos más fluidos que se extraen más fácilmente con detergentes no iónicos. (Analizaremos más extensamente el rol de los detergentes iónicos y no iónicos en la extracción de las proteínas de membranas en la Sección 10.2).

Cierta evidencia bioquímica y microscópica sustenta la existencia de balsas lipídicas, que en las membranas naturales, típicamente tienen 50 nm de diámetro. Las balsas pueden ser desarmadas con metil-β-ciclodextrina, que extrae específicamente el colesterol de las membranas, o con antibióticos, como la filipina, que secuestra el colesterol en agregados dentro de la membrana. Estos hallazgos indican la importancia del colesterol en el mantenimiento de la integridad de estas balsas. Esas regiones balsa, definidas por su insolubilidad en detergentes no iónicos, contienen un subconjunto de proteínas de membrana plasmática, muchas de las cuales están implicadas en medir las señales extracelulares y transmitir las al citosol. Como estas regiones balsa se encuentran enriquecidas con glucolípidos, una herramienta importante para la visualización al microscopio de las estructuras de tipo balsa en las células intactas consiste en emplear la toxina del cólera marcada con fluorescencia, ya que ésta es una proteína que se une específicamente a ciertos gangliósidos. Al acercar muchas proteínas clave y estabilizar sus interacciones, las balsas lipídicas pueden facilitar la señalización mediante receptores de la superficie celular y la activación posterior de eventos en el citosol. Sin embargo, aún debe aprenderse mucho acerca de la estructura y de la función biológica de las balsas lipídicas.

Las células almacenan los excesos de lípidos en gotas lipídicas

Las **gotas lipídicas** son estructuras vesiculares compuestas por ésteres de colesterol y triglicéridos, que se originan en el RE y cumplen la función de almacenar lípidos. Cuando el suministro de lípidos de una célula excede la necesidad inmediata para la construcción de la membrana, el exceso de lípidos se relega a estas gotas lipídicas, visualizadas rápidamente en las células vivas al ser teñidas con un colorante lipofílico como el rojo Congo. La alimentación de las células con ácido oleico, un tipo de ácido graso, aumenta la formación de gotas lipídicas. Las gotas lipídicas no son solo compartimentos de almacenamiento para los triglicéridos y los ésteres de colesterol, sino que también sirven como plataformas de almacenamiento de proteínas direccionadas para la degradación. La biogénesis de las gotas lipídicas se inicia con la deslaminación de la bicapa lipídica del RE, a través de la inserción de triglicéridos y ésteres de colesterol (Fig. 10-13). La "lente" de lípidos continúa creciendo por la inserción de más lípidos hasta que, finalmente, una gota lipídica se parte por la escisión del RE. Luego, la gota citoplasmática resultante se envuelve con una monocapa de fosfolípidos. Los detalles de la biogénesis de la gota, así como sus funciones, aún no se definen con mayor claridad.

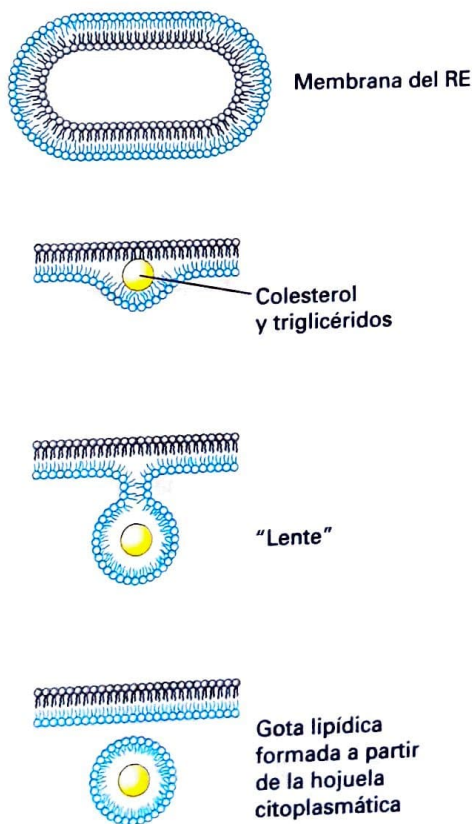


FIGURA 10-13 Las gotas lipídicas se forman por brotación y corte de la membrana del RE. La formación de la gota lipídica comienza con la acumulación de ésteres de colesterol y triglicéridos (amarillo) dentro del núcleo hidrofóbico de la bicapa lipídica. La deslaminación resultante de las dos monocapas de lípidos causa la formación de una "lente" cuyo crecimiento adicional crea una gota esférica que luego se libera por escisión en el cuello. La nueva gota formada es rodeada por una monocapa lipídica derivada de la lamela citosólica de la membrana del RE.

CONCEPTOS CLAVE de la sección 10.1

La bicapa lipídica: composición y organización estructural

- Las membranas son cruciales para la estructura y función de las células. La célula eucariótica está separada del medio externo por la membrana plasmática y organizada en compartimentos internos limitados por membranas (orgánulos y vesículas).
- La bicapa fosfolipídica, la unidad estructural básica de todas las biomembranas, es una lámina bidimensional de lípidos, con caras hidrófilas y un núcleo hidrofóbico que es impermeable a moléculas solubles en agua e iones; las proteínas embebidas en la bicapa dotan a la membrana de funciones específicas (véase la Fig. 10-1).
- Los componentes lipídicos primarios de las biomembranas son los fosfoglicéridos, los esfingolípidos y los esteroides, como el colesterol (véase la Fig. 10-8). El término "fosfolípido" se aplica a cualquier molécula anfipática de lípido que presenta una cola hidrocarbonada de acilo graso y un grupo polar en la cabeza basada en fosfatos.
- Los fosfolípidos espontáneamente forman bicapas y compartimentos sellados que rodean un espacio acuoso (véase la Fig. 10-3).
- Como bicapas, todas las membranas tienen una cara interna (citoplasmática) y una cara externa (exoplasmática) (véase la Fig. 10-5). Algunos orgánulos están rodeados por dos, en lugar de una, bicapas de membrana.
- La mayoría de los lípidos y muchas proteínas tienen movilidad lateral en las biomembranas (véase la Fig. 10-10). Las membranas pueden sufrir transiciones de fase, desde estados fluidos a geliformes; esto depende de la temperatura y de la composición de la membrana (véase la Fig. 10-9).
- Diferentes membranas celulares varían en la composición de los lípidos (véase el Cuadro 10-1). Los fosfolípidos y esfingolípidos están distribuidos en forma asimétrica en ambas lamelas de la bicapa, mientras que el colesterol está distribuido de modo relativamente uniforme en ambas lamelas.
- Las biomembranas naturales, en general, tienen consistencia viscosa con propiedades fluidas. Habitualmente, la fluidez de la membrana disminuye por la presencia de esfingolípidos y colesterol, y aumenta por la presencia de fosfoglicéridos. La composición de lípidos de una membrana influye en su grosor y curvatura (véase la Fig. 10-11).
- Las balsas de lípidos son microdominios que contienen colesterol, esfingolípidos y ciertas proteínas de la membrana que se forman en el plano de la bicapa. Estos agregados de lípidos-proteínas pueden facilitar la señalización mediante ciertos receptores de la membrana plasmática.
- Las gotas lipídicas son vesículas de almacenamiento para los lípidos, que se originan en el RE (véase la Fig. 10-13).

10.2 Las proteínas de membrana: estructura y funciones básicas

Las proteínas de membrana son definidas por su localización en la superficie de una bicapa fosfolipídica o dentro de ésta. Aunque cada

membrana biológica tiene la misma estructura básica de bicapa, las proteínas asociadas con una membrana en particular son causantes de sus actividades distintivas. Las clases y cantidades de proteínas asociadas con las biomembranas varían; esto depende del tipo celular y de la localización subcelular. Por ejemplo, la membrana interna de la mitocondria tiene el 76% de proteínas; la membrana de mielina que rodea los axones nerviosos, solo 18%. El alto contenido de fosfolípidos de la mielina le permite aislar eléctricamente el nervio de su medioambiente, como analizaremos en el Capítulo 22. La importancia de las proteínas de la membrana resulta evidente a partir del hallazgo de que aproximadamente un tercio de todos los genes de las levaduras codifican una proteína de membrana. La abundancia relativa de genes para las proteínas de membrana es mayor en los organismos multicelulares, en los cuales las proteínas de membrana tienen funciones adicionales en la adhesión celular.

La bicapa lipídica presenta un ambiente hidrofóbico bidimensional para las proteínas de membrana. Algunas proteínas contienen segmentos embebidos dentro del núcleo hidrofóbico de la bicapa fosfolipídica; otras están asociadas con la lamela exoplásmica o citosólica de la bicapa. Los dominios proteicos de la superficie extracelular de la membrana plasmática, en general, se unen a las moléculas extracelulares, incluso las proteínas externas de señalización, los iones y pequeños metabolitos (p. ej., glucosa, ácidos grasos), así como las proteínas de otras células o del ambiente externo. Los segmentos de proteínas que se encuentran dentro de la membrana plasmática desempeñan múltiples funciones, como formar los canales y poros a través de los cuales se mueven las moléculas y los iones hacia el interior y el exterior de la célula. Los segmentos que se encuentran dentro de la membrana también sirven para organizar múltiples proteínas de la membrana, en ensamblajes de mayor tamaño, dentro del plano de la membrana. Los dominios que se encuentran a lo largo de la cara citosólica de la membrana plasmática tienen un amplio espectro de funciones, desde el anclaje de proteínas del citoesqueleto a la membrana hasta el desencadenamiento de vías de señalización intracelular.

En muchos casos, la función de una proteína de membrana y la topología de su cadena polipeptídica en dicha membrana pueden predecirse sobre la base de su similitud con otras proteínas bien caracterizadas. En esta sección, examinamos los rasgos estructurales característicos de las proteínas de la membrana y algunas de sus funciones básicas. Describimos las estructuras de varias proteínas para ayudarlo a familiarizarse con el modo en el que las proteínas de las membranas interactúan con éstas. En capítulos posteriores, se presentará una caracterización más completa de las propiedades de varios tipos de proteínas de la membrana, que se centran en sus estructuras y actividades en el contexto de sus funciones celulares.

Las proteínas interactúan con las membranas de tres maneras distintas

Las proteínas de la membrana pueden clasificarse en tres categorías (integrales, ancladas a los lípidos y periféricas), de acuerdo con su posición con respecto a la membrana (véase la Fig. 10-1). Las **proteínas integrales de la membrana**, también llamadas *proteínas transmembrana*, se expanden en una bicapa fosfolipídica y comprenden tres segmentos. Los dominios citosólico y exoplásmico tienen superficies exteriores hidrofílicas que interactúan con el ambiente acuoso en las caras citosólica y exoplásmica de la membrana. Estos dominios se asemejan a segmentos de otras proteínas hidrosolubles, en su composición de aminoáci-

dos y en su estructura. Por el contrario, los segmentos insertos en la membrana habitualmente contienen muchos aminoácidos hidrofóbicos cuyas cadenas laterales sobresalen hacia el exterior e interactúan con el núcleo hidrocarbonado hidrofóbico de la bicapa fosfolipídica. En todas las proteínas transmembrana que se examinaron hasta la fecha, los dominios insertos en la membrana consisten en una o más hélices α o múltiples hebras β . Analizamos la síntesis ribosómica y el procesamiento postraduccion de las proteínas solubles del citosol en los Capítulos 4 y 8; el proceso por el cual las proteínas integrales de la membrana se insertan en éstas como parte de su síntesis se analizará en el Capítulo 13.

Las **proteínas de membrana ancladas a los lípidos** están unidas mediante enlaces covalentes a una o más moléculas de lípido. El segmento hidrofóbico del lípido unido está embebido en una lamela de la membrana y ancla la proteína a ésta. La cadena polipeptídica, en sí, no entra a la bicapa fosfolipídica.

Las **proteínas periféricas de la membrana** no entran en contacto directo con el núcleo hidrofóbico de la bicapa fosfolipídica. En lugar de ello, están unidas a la membrana en forma indirecta mediante interacciones con las proteínas de la membrana ancladas a los lípidos, o integrales, o directamente por interacciones con los grupos de las cabezas de los lípidos. Las proteínas periféricas pueden unirse a la cara citosólica o exoplásmica de la membrana plasmática. Además de estas proteínas, que están íntimamente asociadas a la bicapa, los filamentos del citoesqueleto pueden estar más laxamente relacionados con la cara citosólica, por lo general, a través de una o más proteínas periféricas (adaptadoras). Estas asociaciones con el citoesqueleto proporcionan sostén para varias membranas celulares, lo que ayuda a determinar la forma celular y las propiedades mecánicas, y desempeñan una función en la comunicación de ambas vías entre el interior de las células y el exterior, como veremos en el Capítulo 17. Finalmente, las proteínas periféricas de la superficie exterior de la membrana plasmática y los dominios exoplásmicos de las proteínas integrales de la membrana, con frecuencia, se encuentran unidos a los componentes de la matriz extracelular o de la pared celular que rodea a las bacterias y a las células vegetales, y que provee una interfase crucial entre la célula y su ambiente.

La mayoría de las proteínas transmembrana tienen hélices α que abarcan la membrana

Las proteínas solubles exhiben cientos de estructuras plegadas localizadas con forma distintiva, también llamadas motivos (véase la Fig. 3-9). En comparación, el repertorio de estructuras plegadas en los dominios transmembrana de las proteínas integrales de la membrana es bastante limitado, con predominio de la hélice α hidrofóbica. Las proteínas que contienen dominios helicoidales α que se expanden en la membrana están embebidas de manera estable en las membranas por interacciones favorables energéticamente, tanto hidrofóbicas como de van der Waals, de las cadenas hidrofóbicas laterales del dominio con lípidos específicos y también, probablemente, por interacciones iónicas con los grupos de las cabezas polares de los fosfolípidos.

Un dominio helicoidal α único es suficiente para incorporar una proteína integral de la membrana a ésta. Sin embargo, muchas proteínas tienen más de una hélice α transmembrana. Típicamente, una hélice α embebida en una membrana está compuesta por un segmento continuo de 20-25 aminoácidos hidrofóbicos (no cargados) (véase la Fig. 2-14). La longitud predicha de una hélice α de este tipo (3,75 nm) es exactamente suficiente como para abarcar el núcleo hidrocarbonado

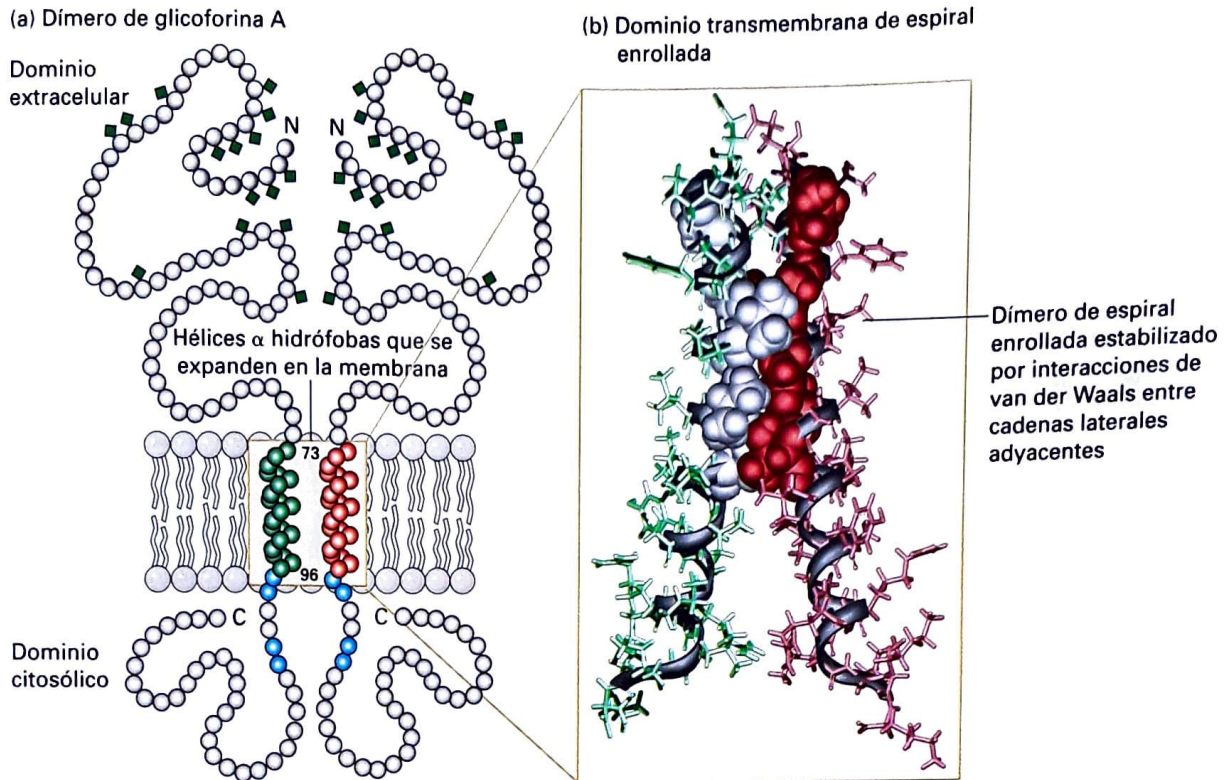


FIGURA 10-14 Estructura de la glicoforina A, una proteína transmembrana de paso único. (a) Diagrama de la glicoforina dimerica que muestra las principales características de secuencia y su relación con la membrana. La hélice α única de 23 residuos, que se expande en la membrana en cada monómero, está compuesta de aminoácidos con cadenas laterales hidrófobas (no cargadas) (esferas rojas y verdes). Al unirse a grupos de la cabeza del fosfolípido con carga negativa, los residuos de arginina y lisina con carga positiva (esferas azules), cerca del lado citosólico de la hélice, ayudan a anclar la glicoforina a la membrana. Tanto los dominios extracelular como citosólico son ricos en residuos cargados y residuos polares no cargados; el dominio extracelular está

intensamente glucosilado, con las cadenas laterales de hidratos de carbono (diamantes verdes) unidas a residuos específicos de serina, treonina y asparagina. (b) Modelo molecular del dominio transmembrana de la glicoforina dimerica, correspondiente a los residuos 73-96. Las cadenas laterales hidrófobas de la hélice α de un monómero se muestran en color rosa; las del otro monómero, en verde. Los residuos que se muestran como estructuras espaciales participan en interacciones de van der Waals que estabilizan el dímero de espiral enrollada. Nótese de qué modo las cadenas laterales hidrófobas se proyectan hacia el exterior de la hélice, hacia lo que deberían ser las cadenas de acilo graso que la rodean. (Parte [b] adaptada de K.R. MacKenzie et al., 1997, *Science* 276:131.)

de una bicapa fosfolipídica. En muchas proteínas de la membrana, estas hélices son perpendiculares al plano de la membrana, mientras que en otras las hélices atraviesan la membrana en un ángulo oblicuo. Las cadenas laterales hidrófobas sobresalen hacia el exterior desde la hélice y forman interacciones de van der Waals con las cadenas de acilos grasos de la bicapa. Por el contrario, los enlaces péptido amida hidrofílicos se encuentran en el interior de la hélice α (véase la Fig. 3-4); cada grupo carbonilo ($C=O$) forma puentes de hidrógeno con el átomo de hidrógeno de la amida de los cuatro residuos de aminoácido que se encuentran hacia el extremo C-terminal de la hélice. Estos grupos polares están protegidos del interior hidrófobo de la membrana.

Para ayudarlo a comprender mejor el sentido de las estructuras de las proteínas con dominios helicoidales α , analizaremos brevemente cuatro clases de proteínas de este tipo: la glucoforina A, los receptores acoplados a la proteína G, las acuaporinas (canales de agua/glicerol) y el receptor de las células T para el antígeno.

La glucoforina A, la principal proteína de la membrana plasmática de los eritrocitos, es una proteína transmembrana representativa de *paso único*, que contiene solo una hélice α que se expande en la mem-

brana (Fig. 10-14). La hélice α de 23 residuos que se expanden en la membrana está compuesta por aminoácidos con cadenas laterales hidrófobas (sin carga), que interactúan con las cadenas de acilos grasos en la bicapa que las rodea. En las células la glucoforina A típicamente forma dímeros: la hélice transmembrana de un polipéptido de glucoforina A se asocia con la hélice transmembrana correspondiente de una segunda glucoforina A para formar una estructura de espiral enrollada (Fig. 10-14b). Estas interacciones de hélices α que se expanden en la membrana constituyen un mecanismo común para crear proteínas de membrana dimericas, y muchas proteínas de membrana forman oligómeros (dos o más polipéptidos unidos de modo no covalente) por interacciones entre sus hélices, que se expanden en la membrana.

Un grupo grande e importante de proteínas integrales está definido por la presencia de siete hélices α que se expanden en la membrana; esto incluye la gran familia de los receptores de la superficie celular acoplados a la proteína G, analizados en el Capítulo 15, varios de los cuales han sido cristalizados. Una proteína transmembrana *multipaso* de este tipo de estructura conocida es la bacteriorrodopsina, una proteína presente en la membrana de ciertas bacterias foto-

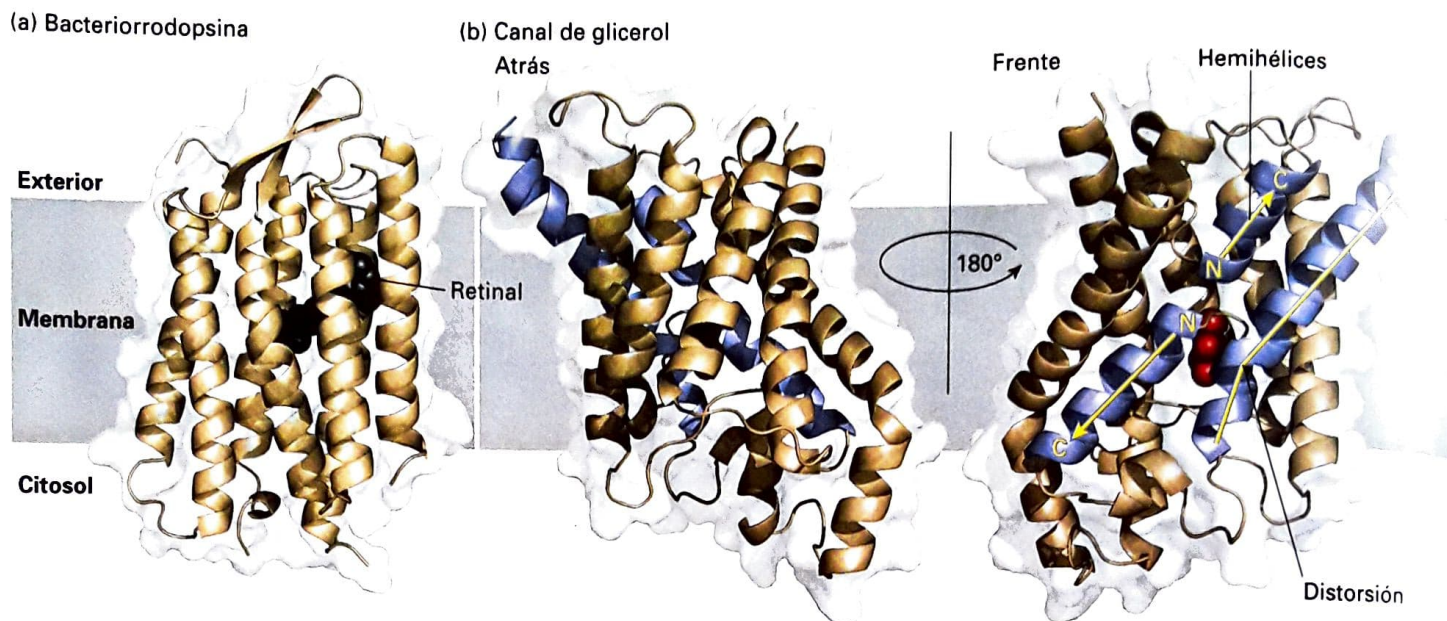


FIGURA 10-15 Modelos estructurales de dos proteínas de membrana multipaso. (a) Bacteriorrodopsina, un fotorreceptor de ciertas bacterias. Las siete hélices α hidrofóbicas de la bacteriorrodopsina atraviesan la bicapa lipídica de modo casi perpendicular al plano de la membrana. Una molécula de retinal (negro), unida mediante enlaces covalentes a una hélice, absorbe la luz. La clase completa de receptores acoplados a la proteína G de las células eucarióticas también tiene siete hélices α que se expanden en la membrana; se cree que su estructura tridimensional es similar a la de la bacteriorrodopsina. (b) Dos vistas del canal de glicerol Glpf, rotado 180° , uno con respecto al otro, a lo largo de un eje perpendicular al plano de la membrana. Nótese varias

hélices α que se expanden en la membrana en ángulos oblicuos, las dos hélices que penetran solo media distancia a través de la membrana (púrpura, con flechas amarillas) y una hélice larga que se expande en la membrana con un "corte" o distorsión en el medio (púrpura, con una línea amarilla). La molécula de glicerol, en el "núcleo" hidrófilo, está coloreada en rojo. La estructura se ubicó aproximadamente en el núcleo hidrocarbonado de la membrana, y se situó el bloque más hidrofóbico de $3 \mu\text{m}$ de la proteína en forma perpendicular al plano de la membrana. (Parte [a] tomada de H. Luecke et al., 1999, *J. Mol. Biol.* **291**:899. Parte [b] tomada de J. 2005, *Nature* **438**:581-589, y D. Fu et al., 2000, *Science* **290**:481-486.)

sintéticas; ilustra la estructura general de todas estas proteínas (Fig. 10-15a). La absorción de la luz por el grupo retinal, unido mediante enlaces covalentes a esta proteína, provoca un cambio de conformación en la proteína que da como resultado el bombeo de protones desde el citosol, a través de la membrana bacteriana, hacia el espacio extracelular. El gradiente de concentración protónica generado de este modo a través de la membrana se emplea para la síntesis de ATP durante la fotosíntesis (Cap. 12). En la estructura de alta resolución de la bacteriorrodopsina, las posiciones de todos los aminoácidos individuales, el retinal y los lípidos que lo rodean están claramente definidas. Como podría esperarse, virtualmente, todos los aminoácidos en el exterior de los segmentos que se extienden en la membrana de la bacteriorrodopsina son hidrofóbicos, lo que permite interacciones energéticamente favorables, con el núcleo hidrocarbonado de la bicapa lipídica que la rodea.

Las **acuaporinas** constituyen una gran familia de proteínas altamente conservadas que transportan agua, glicerol y otras moléculas hidrofílicas a través de las biomembranas. Ilustran varios aspectos de la estructura de proteínas transmembrana multipaso. Las acuaporinas son tetrámeros de cuatro subunidades idénticas. Cada una de las cuatro subunidades tiene seis hélices α que abarcan la membrana, algunas de las cuales la atraviesan en ángulos oblicuos y no en dirección perpendicular. Como las acuaporinas tienen estructuras similares, nos centraremos en una de ellas, el canal de glicerol Glpf, que tiene una estructura especialmente bien definida, determinada por estudios de difracción de rayos X (Fig. 10-15b). Esta acuaporina tiene una

larga hélice transmembrana con una curva en el medio y, lo que resulta más sorprendente, hay dos hélices α que penetran solo la mitad del recorrido a través de la membrana. Los extremos N-terminales de estas hélices se enfrentan (los N- en amarillo, en la figura) y juntos se expanden en la membrana en un ángulo oblicuo. Así, algunas hélices embebidas en la membrana —y otras estructuras no helicoidales que encontraremos luego— no atraviesan toda la bicapa. Como veremos en el Capítulo 11, estas hélices cortas de las acuaporinas forman parte del poro selectivo glicerol/agua, en el medio de cada subunidad. Esto destaca la considerable diversidad de las formas en que las hélices α insertas en la membrana interactúan con la bicapa lipídica y con otros segmentos de la proteína.

La especificidad de las interacciones fosfolípido-proteína es evidente a partir de la estructura de una acuaporina diferente, la acuaporina 0 (Fig. 10-16). La acuaporina 0 es la proteína más abundante de la membrana plasmática de las células fibrosas que constituyen la mayor parte del cristalino del ojo del mamífero. Al igual que las otras acuaporinas, es un tetrámero de subunidades idénticas. La superficie de la proteína no está cubierta por un conjunto de sitios de unión uniforme para las moléculas de fosfolípidos. En lugar de ello, las cadenas laterales de los acilos grasos se empaquetan estrechamente contra la superficie externa hidrofóbica irregular de la proteína; estos lípidos se conocen como fosfolípidos anulares, porque forman un anillo estrecho (*annulus*) de lípidos que intercambian menos fácilmente con la mayor parte de los fosfolípidos de la bicapa. Algunos de las cadenas de los acilos grasos son rectas, en conformación *toda-*

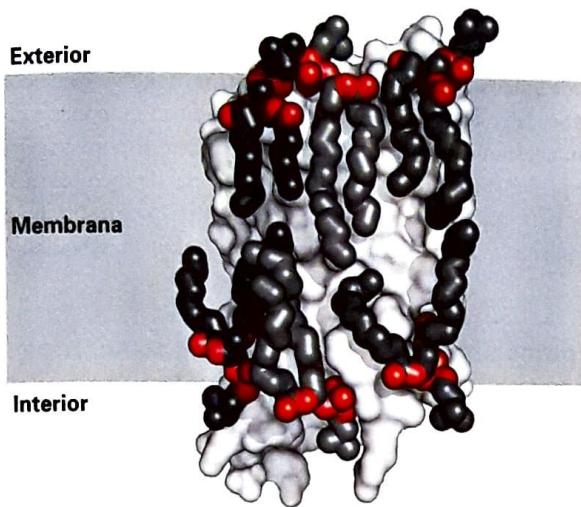


FIGURA 10-16 Fosfolípidos anulares. Vista lateral de la estructura tridimensional de una subunidad del homotetrámero específico del cristalino acuaporina 0, cristalizada en presencia del fosfolípido dimiristoilfosfatidilcolina, un fosfolípido con cadenas de acilo graso saturadas de 14 carbonos. Nótese que las moléculas de lípidos forman una cubierta de bicapa alrededor de la proteína. La proteína se muestra como un dibujo de superficie (la molécula más clara en el fondo). Las moléculas de lípidos se muestran en formato de modelo espacial; los grupos de la cabeza polar de los lípidos (gris y rojo) y las cadenas de acilo graso de los lípidos (negro y gris) forman una bicapa de un grosor casi uniforme alrededor de la proteína. Supuestamente, en la membrana, las cadenas lipídicas de acilo graso cubren la totalidad de la superficie hidrofóbica de la proteína; solo las moléculas de lípidos más ordenadas podrán ser resueltas en la estructura cristalográfica. (Tomado de A. Lee, 2005, *Nature* **438**:569-570, y T. Ganen et al., 2005, *Nature* **438**:633-688.)

trans (Cap. 2), mientras que otras están dobladas para interactuar con las cadenas laterales hidrofílicas de la superficie de la proteína. Parte de los grupos de la cabeza de los lípidos están ubicados en forma paralela a la superficie de la membrana, como en el caso de las bicapas purificadas de fosfolípidos. Otras, sin embargo, se encuentran orientados casi en ángulo recto con respecto al plano de la membrana. De este modo, puede haber interacciones específicas entre los fosfolípidos y las proteínas que se expanden en la membrana, y la función de

muchas proteínas de la membrana puede verse afectada por los tipos específicos de fosfolípidos presentes en la bicapa.

Además de los residuos predominantemente hidrofóbicos (no cargados) que sirven para embeber las proteínas integrales de la membrana en la bicapa, muchos segmentos transmembrana helicoidales α contienen residuos polares y/o cargados. Sus cadenas de aminoácidos laterales pueden ser empleadas para guiar el ensamblaje y la estabilización de proteínas multiméricas de la membrana. El receptor de las células T para antígenos constituye un caso en este punto: está compuesto por cuatro dímeros separados, que se vinculan mediante interacciones entre las cargas, entre las hélices α , en la "profundidad" adecuada en el núcleo hidrocarbonado de la bicapa lipídica (Fig. 10-17). La atracción electrostática de las cargas positivas y negativas en cada dímero ayuda a que estos "se encuentren". Así, los residuos cargados en segmentos transmembrana –por lo demás, hidrofóbicos– pueden ayudar a guiar el ensamblaje de proteínas multiméricas de la membrana.

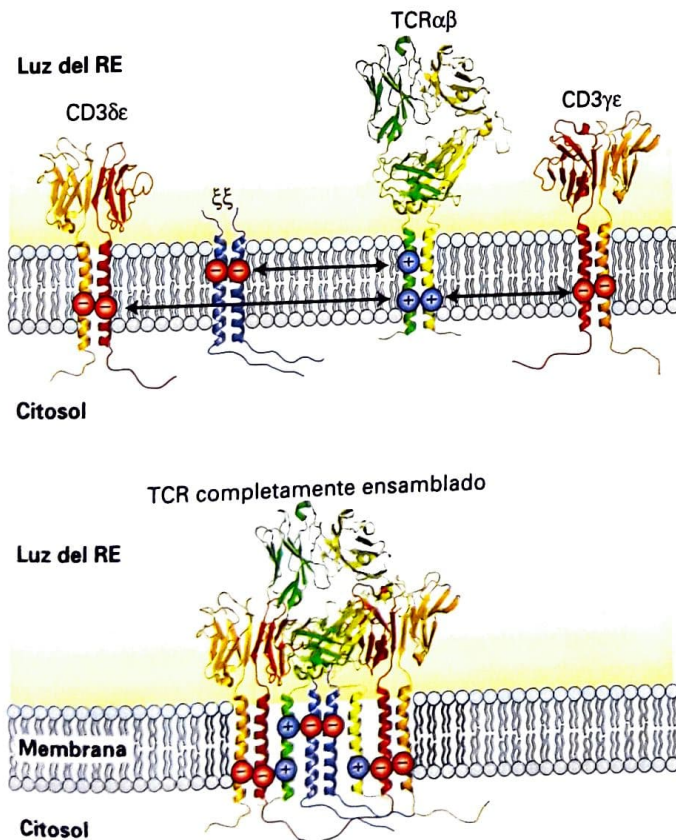


FIGURA 10-17 Los residuos cargados pueden orquestar el ensamblaje de las proteínas de membrana multiméricas. El receptor de las células T (TCR) para los antígenos está compuesto por cuatro dímeros separados: un par $\alpha\beta$ directamente causante del reconocimiento antigénico y subunidades accesorias conocidas colectivamente como el complejo CD3. Estos accesorios incluyen las subunidades γ , δ , ϵ y ζ . Las subunidades ζ forman un homodímero ligado por disulfuros. Las subunidades γ y δ se presentan en un complejo con la subunidad ϵ , para generar pares $\gamma\epsilon$ y $\delta\epsilon$. Los segmentos transmembrana de las cadenas α y β del TCR contienen, cada uno, residuos cargados positivamente (azul). Estos permiten el reclutamiento de los heterodímeros $\delta\epsilon$ y $\gamma\epsilon$ correspondientes que pueden llevar cargas negativas (rojo) a la profundidad apropiada en el núcleo hidrofóbico de la membrana. El homodímero ζ se ancla sobre las cargas de la cadena α del TCR (verde oscuro), mientras que los pares de las subunidades $\gamma\epsilon$ y $\delta\epsilon$ encuentran sus compañeros correspondientes más profundamente en el núcleo hidrofóbico, tanto en la cadena TCR α como TCR β (verde claro). Los residuos cargados en los segmentos transmembrana, por lo demás, no polares pueden así guiar el ensamblaje de estructuras de orden superior. (Tomado de K.W. Wucherpfennig, y cols., 2010, *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2**.)

Láminas β múltiples en las porinas forman "barriles" que se expanden en la membrana

Las **porinas** son una clase de proteínas transmembrana cuya estructura difiere radicalmente de la de otras proteínas integrales de la membrana, sobre la base de los dominios transmembrana helicoidales α . Existen varios tipos de porinas en la membrana externa de bacterias gramnegativas, como la *E. coli*, en las membranas externas de las mitocondrias y los cloroplastos. La membrana externa protege a las bacterias intestinales de los agentes dañinos (p. ej., antibióticos, sales biliares y proteasas), pero permite la captación y desecho de moléculas hidrofílicas pequeñas, que incluyen los nutrientes y los productos de desecho. Diferentes tipos de porinas en la membrana externa de las *E. coli* proporcionan canales para el paso de tipos específicos de disacáridos y otras moléculas pequeñas, así como de iones como el fosfato. Las secuencias de aminoácidos de las porinas no contienen ninguno de los segmentos largos, hidrofóbicos continuos, típicos de las proteínas integrales con dominios helicoidales α que se expanden en la membrana, característicos de las proteínas integrales. En lugar de ello, es la superficie externa completa de la porina totalmente plegada la que exhibe su carácter hidrofóbico al núcleo hidrocarbonado de la bicapa lipídica. La cristalografía de rayos X muestra que las porinas son trímeros de subunidades idénticas. En cada subunidad, 16 láminas β forman una hoja que se retuerce en una estructura que tiene forma de barril, con un poro central (Fig. 10-18). A diferencia de una proteína globular hidrosoluble típica, una porina

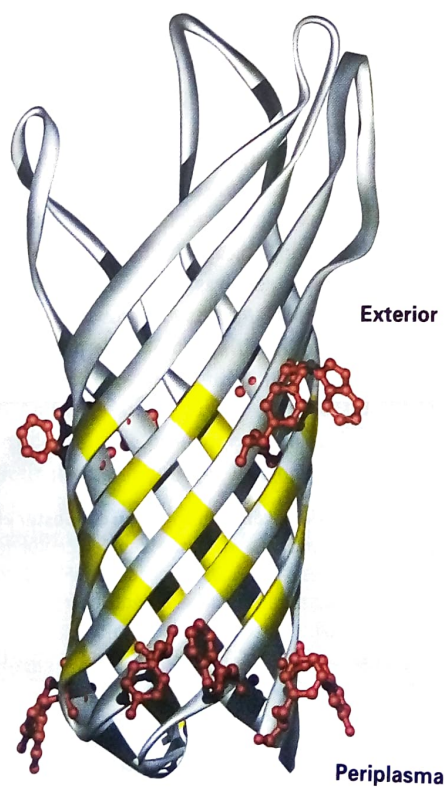


FIGURA 10-18 Modelo estructural de una subunidad de OmpX, una porina presente en la membrana externa de la *E. coli*. Todas las porinas son proteínas transmembrana triméricas. Cada subunidad tiene forma de barril, en la que las hebras β forman la pared y un poro transmembrana en el centro. Una banda de cadenas laterales alifáticas (hidrofóbicas y no cíclicas) (amarillas) y un borde de cadenas laterales aromáticas (que contienen al anillo) (rojos) ubican la proteína en la bicapa. (Tomado de G.E. Schulz, 2000, *Curr. Opin. Struc. Biol.* **10**:443)

tiene un interior hidrofílico y un exterior hidrofóbico; en este sentido, las porinas están invertidas. En un monómero de porina, los grupos que enfrentan el exterior en cada una de las hebras β son hidrofóbicos y forman una banda con forma de cinta no polar que rodea el exterior del barril. Esta banda hidrofóbica interactúa con los grupos acilo grasos de los lípidos de la membrana o con otros monómeros de porina. Los grupos laterales que enfrentan el interior de un monómero de porina son predominantemente hidrofílicos; tapizan el poro a través del cual pequeñas moléculas hidrosolubles atraviesan la membrana. (Nótese que las acuaporinas analizadas previamente, a pesar de su nombre, no son porinas y contienen múltiples hélices α transmembrana).

Los lípidos unidos mediante enlaces covalentes anclan algunas proteínas a las membranas

En las células eucarióticas, los lípidos unidos mediante enlaces covalentes pueden anclar algunas proteínas, por lo demás, típicamente hidrosolubles a una u otra lamela de la membrana. En estas proteínas ancladas a los lípidos, las cadenas hidrocarbonadas lipídicas se encuentran embebidas en la bicapa, pero la proteína en sí no ingresa en esta bicapa. Las anclas lipídicas usadas para anclar las proteínas a la cara citosólica no se emplean para la cara exoplásmica y viceversa.

Un grupo de proteínas citosólicas están ancladas a la cara citosólica de una membrana por un grupo acilo graso (p. ej., miristato o palmitato) unido mediante enlaces covalentes a un residuo de glicina N-terminal, un proceso denominado *acilación* (Fig. 10-19a). La retención de proteínas de este tipo en la membrana, por un ancla acilo N-terminal, puede cumplir un papel importante en una función asociada a la membrana. Por ejemplo, la v-Src, una forma mutante de una tirosina cinasa celular, induce el crecimiento celular anómalo que puede conducir al cáncer, pero solo cuando tiene un N-terminal miristilado.

Un segundo grupo de proteínas citosólicas son ancladas a las membranas por una cadena hidrocarbonada unida a un residuo de cisteína presente o cercano al extremo C-terminal, proceso denominado *prenilación* (Fig. 10-19b). Las anclas de prenilo se construyen a partir de unidades 5-carbono isopreno que, como se detallará en la siguiente sección, también se utilizan en la síntesis del colesterol. En la prenilación, un grupo de 15 carbonos farnesilo o un grupo de 20 carbonos geranilgeranilo se une a través de un enlace tioéter al grupo -SH de un residuo C-terminal de cisteína de una proteína. En algunos casos, un segundo grupo geranilgeranilo o un grupo palmitato de un acilo graso están unidos a un residuo de cisteína cercano. Se considera que el ancla hidrocarbonada adicional refuerza la unión de la proteína a la membrana. Por ejemplo, la Ras, una proteína de la superfamilia GTPasa que funciona en la señalización intracelular (Cap. 15), es reclutada en la cara citosólica de la membrana plasmática por un ancla doble de este tipo. Las proteínas Rab, que también pertenecen a la superfamilia de las GTPasa, están unidas de manera similar a las superficie citosólica de vesículas intracelulares por anclas prenilo; estas proteínas son necesarias para la fusión de las vesículas con sus membranas diana (Cap. 14).

Algunas proteínas de la superficie celular y proteínas especializadas, con polisacáridos distintivos unidos mediante enlaces covalentes llamados proteoglicanos (Cap. 20) se unen a la cara exoplásmica de la membrana plasmática por medio de un tercer tipo de grupo ancla, el glucosilfosfatidilinositol (GPI). Las estructuras exactas de las *anclas GPI* varían, en gran medida, en los diferentes tipos celulares; pero siempre contienen fosfatidilinositol (PI), cuyas dos cadenas de ácido graso

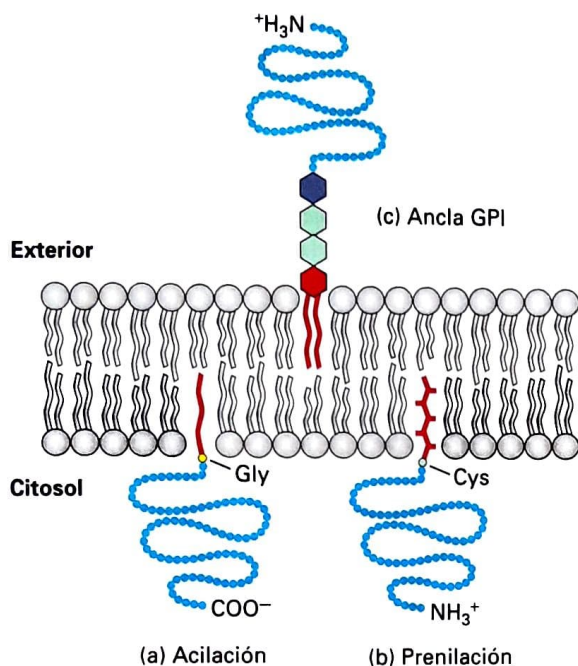


FIGURA 10-19 Anclaje de las proteínas de la membrana plasmática a la bicapa por grupos hidrocarbonados unidos mediante enlaces covalentes. (a) Las proteínas citosólicas, como la v-Src, están asociadas a la membrana plasmática a través de una cadena de acilo graso simple unida al residuo de glicina (Gly) N-terminal del polipéptido. El miristato (C14) y el palmitato (C16) son anclas comunes de acilo. (b) Otras proteínas citosólicas (p. ej., Ras y Rab) están ancladas a la membrana por prenilación de uno o dos residuos de cisteína (Cys) en el extremo C-terminal o cerca de éste. Las anclas son grupos farnesilo (C15) y geranilgeranilo (C20), ambos insaturados. (c) El ancla lipídica, en la superficie exoplásmica de la membrana plasmática, es el glucosilfosfatidilinositol (GPI). La parte de fosfatidilinositol (rojo) de esta ancla contiene dos cadenas de acilo graso que se extienden en la bicapa. La unidad de fosfoetanol amina (púrpura) del ancla la une a la proteína. Los dos hexágonos verdes representan unidades de azúcar, que varían en número, naturaleza y conformación en diferentes anclas GPI. La estructura completa de un ancla GPI de levadura se muestra en la Figura 13-15. (Adaptado de H.Sprong y cols., 2001, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2:504)

se extienden en la bicapa lipídica del mismo modo que los fosfolípidos típicos de la membrana; fosfatidiletanolamina, que une mediante enlaces covalentes al ancla al extremo C-terminal de una proteína; y varios residuos de azúcares (Fig. 10-19c). Por lo tanto, las anclas GPI son glucolípidos. El ancla GPI es necesaria y suficiente para unir las proteínas a la membrana. Por ejemplo, el tratamiento de las células con las fosfolipasa C, que escinde el enlace fosfato-glicerol en los fosfolípidos y en las anclas GPI (véase la Fig. 10-12), libera las proteínas ancladas con GPI, como la Thy-1 y la fosfatasa alcalina placentaria (PLAP) de la superficie celular.

Todas las proteínas transmembrana y los glucolípidos están orientados de modo asimétrico en la bicapa

Cada tipo de proteína transmembrana tiene una orientación específica, conocida como *topología*, con respecto a las caras de la membrana. Sus segmentos citosólicos siempre enfrentan el citoplasma, y los segmentos

exoplásmicos siempre enfrentan el lado opuesto de la membrana. Esta asimetría en la orientación de las proteínas les confiere diferentes propiedades a las dos caras de la membrana. La orientación de los distintos tipos de proteínas transmembrana está establecida durante sus síntesis, como describimos en el Capítulo 13. Nunca se ha observado que las proteínas transmembrana alternen a través de la membrana; sin embargo, un movimiento de este tipo, que requiere desplazamiento transitorio de residuos de aminoácidos hidrofílicos a través del interior hidrofóbico de la membrana, sería energéticamente desfavorable. De acuerdo con ello, la topología asimétrica de una proteína transmembrana, que se establece durante su inserción biosintética en una membrana, se mantiene durante toda la vida de la proteína. Como muestra la Figura 10-6, las proteínas de la membrana retienen su orientación asimétrica en ésta durante los eventos de invaginación y fusión de las membranas; el mismo segmento siempre mira al citosol, y éste siempre queda expuesto a la cara exoplásmica. En las proteínas que presentan múltiples segmentos transmembrana (proteínas multipaso o politópicas), la orientación de los segmentos individuales que atraviesan la membrana puede verse afectada por cambios en la composición de los fosfolípidos.

Muchas proteínas transmembrana contienen cadenas de hidratos de carbono unidas mediante enlaces covalentes a las cadenas laterales de los residuos de serina, treonina o asparagina del polipéptido. Estas **glucoproteínas** transmembrana siempre están orientadas de modo tal que las cadenas de hidratos de carbono se encuentran en el dominio exoplásmico (véase la Fig. 10-14, para el ejemplo de la glicoforina A). De modo similar, los glucolípidos, en los que una cadena de hidratos de carbono se encuentra unida al esqueleto de glicerol o esfingosina de un lípido de membrana, siempre están localizados en la lamela exoplásmica, con la cadena de hidrato de carbono que sobresale desde la superficie de la membrana. Las bases biosintéticas para la glucosilación asimétrica de las proteínas se describen en el Capítulo 14. Tanto las glucoproteínas como los glucolípidos son especialmente abundantes en las membranas plasmáticas de las células eucarióticas y en las membranas de los compartimentos intracelulares que establecen las vías secretoras y endocíticas; están ausentes en la membrana interna de la mitocondria, las lamelas de los cloroplastos y varias otras membranas intracelulares. Como las cadenas de hidratos de carbono de las glucoproteínas y los glucolípidos de la membrana plasmática se extienden hasta el espacio extracelular, están disponibles para interactuar con los componentes de la matriz extracelular, como las **lectinas** (proteínas que unen azúcares específicos), factores de crecimiento y anticuerpos.



Una consecuencia importante de estas interacciones se ilustra con los antígenos A, B y O de los grupos sanguíneos. Estos tres componentes oligosacáridos, relacionados estructuralmente, de ciertas glucoproteínas y glucolípidos se expresan en la superficie de los eritrocitos humanos y de muchos otros tipos celulares (Fig. 10-20). Todos los seres humanos tienen enzimas para la síntesis del antígeno O. Las personas con el grupo sanguíneo A también tienen una enzima glucosiltransferasa que añade un monosacárido adicional modificado, denominado N-acetilgalactosamina, al antígeno O para formar el antígeno A. Los que tienen el tipo sanguíneo B presentan una transferasa diferente que añade una galactosa adicional al antígeno O para formar el antígeno B. Las personas que tienen ambas transferasas producen tanto el antígeno A como el B (tipo AB); los que carecen de estas transferasas producen solo el antígeno O (tipo sanguíneo O).

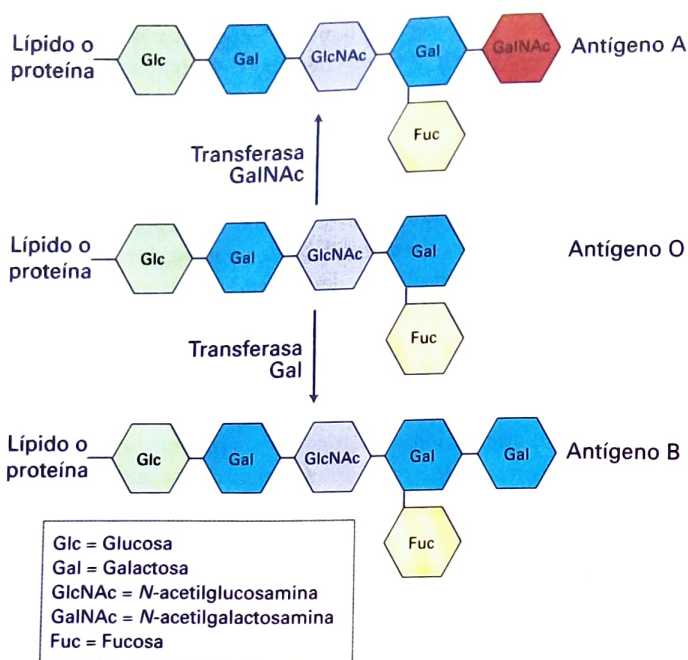


FIGURA 10-20 Antígenos de los grupos sanguíneos humanos ABO. Estos antígenos son cadenas de oligosacáridos unidas mediante enlaces covalentes a los glucolípidos o glucoproteínas de la membrana plasmática. Los azúcares oligosacáridos terminales distinguen los tres antígenos. La presencia o ausencia de glucosiltransferasas que añaden galactosa (Gal) o N-acetilgalactosamina (GalNAc) al antígeno O determina el tipo sanguíneo de la persona.

Las personas cuyos eritrocitos carecen del antígeno A, antígeno B o ambos en la superficie normalmente tienen anticuerpos contra los antígenos faltantes en su suero. De este modo, si una persona de tipo A u O recibe una transfusión de sangre tipo B, los anticuerpos contra el antígeno B se unirán a los glóbulos rojos introducidos y desencadenarán su destrucción. Para evitar estas reacciones perjudiciales, se requieren—en todas las transfusiones—la tipificación del grupo sanguíneo y la adecuación de los donantes y los receptores (Cuadro 10-2). ■

Los motivos de unión a lípidos ayudan a dirigir las proteínas periféricas hacia la membrana

Muchas enzimas hidrosolubles emplean fosfolípidos como sus sustratos y, así, deben unirse a las superficies de la membrana. Las fosfolipa-

sas, por ejemplo, hidrolizan varios enlaces en los grupos de las cabezas de los fosfolípidos (véase la Fig. 10-12); por lo tanto, desempeñan una variedad de funciones en las células —generando precursores para las moléculas de señalización e incluso sirviendo como componentes activos en muchos venenos de serpientes, ayudan a degradar las membranas celulares dañadas o envejecidas. Muchas enzimas de este tipo, que incluyen las fosfolipasas, inicialmente se unen a los grupos polares de las cabezas de los fosfolípidos de las membranas para llevar a cabo sus funciones catalíticas. El mecanismo de acción de la fosfolipasa A2 ilustra el modo en que las enzimas hidrosolubles pueden interactuar de un modo reversible con las membranas, además de catalizar las reacciones en la interfase de una solución acuosa y en la superficie de los lípidos. Cuando esta enzima está en la solución acuosa, su sitio activo que contiene Ca^{2+} está contenido en un canal tapizado con aminoácidos hidrofóbicos. La enzima se une con mayor afinidad a las bicapas compuestas por fosfolípidos cargados negativamente (p. ej., fosfatidilserina). Este hallazgo sugiere que el borde de residuos de lisina y arginina cargados positivamente, alrededor de la entrada al canal catalítico, es de particular importancia en la unión (Fig. 10-21a). La unión induce un cambio de conformación en la fosfolipasa A₂ que refuerza su unión a las cabezas de los fosfolípidos y abre el canal hidrofóbico. A medida que la molécula de fosfolípido se mueve desde la bicapa hacia el canal, el Ca^{2+} unido a la enzima se une al fosfato en el grupo de la cabeza y posiciona, de este modo, el enlace éster que debe ser escindido en el sitio catalítico (Fig. 10-21b), lo que libera la cadena acilo.

Las proteínas pueden ser eliminadas de las membranas con detergentes o soluciones salinas concentradas

Las proteínas de la membrana, con frecuencia, son difíciles de purificar y estudiar; en gran medida, por su estrecha asociación con los lípidos de la membrana y con otras proteínas presentes en ésta. Los **detergentes** son moléculas anfipáticas que rompen las membranas intercalándose entre las bicapas fosfolipídicas y pueden, de este modo, emplearse para solubilizar los lípidos y muchas proteínas de la membrana. La parte hidrofóbica de una molécula de detergente es atraída por los hidrocarburos fosfolipídicos y se mezcla con éstos rápidamente; la parte hidrofílica es fuertemente atraída por el agua. Algunos detergentes, como las sales biliares, son productos naturales, pero la mayoría son moléculas sintéticas desarrolladas para limpiar y dispersar las mezclas de aceite y agua en la industria alimentaria (p. ej., la manteca de maní cremosa) (Fig. 10-22). Los detergentes iónicos, como el desoxicolato de sodio y el dodecilsulfato de sodio (SDS), contienen un grupo cargado; los detergentes no ióni-

Cuadro 10-2 Grupos sanguíneos ABO

Grupos sanguíneos	Antígenos en los eritrocitos*	Anticuerpos séricos	Pueden recibir los tipos sanguíneos
A	A	Anti-B	A y O
B	B	Anti-A	B y O
AB	A y B	Ninguno	Todos
O	O	Anti-A y anti-B	O

*Véase la Figura 10-20 para estructuras de los antígenos.

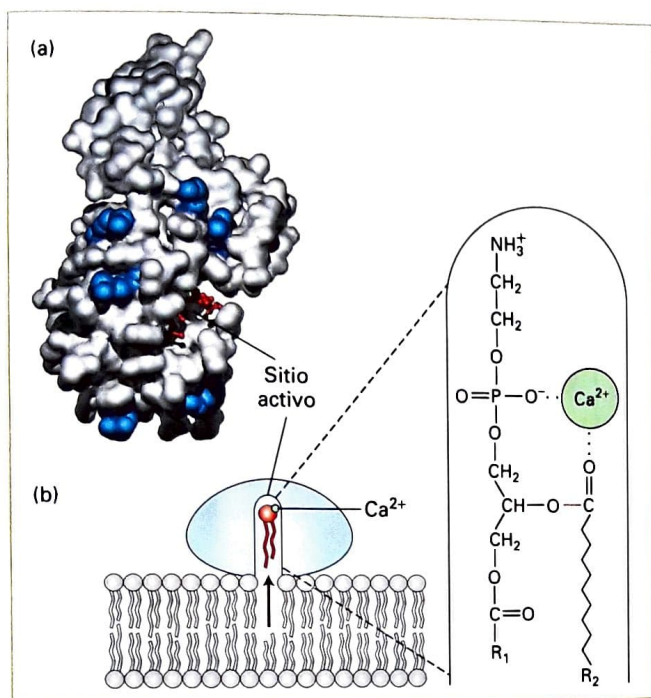


FIGURA 10-21 Superficie de unión a los lípidos y mecanismo de acción de la fosfolipasa A₂. (a) Modelo estructural de la enzima que muestra la superficie que interactúa con una membrana. Esta superficie de unión a los lípidos contiene un borde de residuos de arginina y lisina cargados positivamente, que se muestran en azul, y rodean la cavidad del sitio activo catalítico, al cual un lípido sustrato (estructura de palillo rojo) se encuentra unido. (b) Diagrama de la catálisis por la fosfolipasa A₂. Cuando se encuentran fijos en una membrana lipídica modelo, los residuos del sitio de unión cargados positivamente se unen a grupos polares cargados negativamente, en la superficie de la membrana. Esta unión desencadena un pequeño cambio de conformación que abre un canal tapizado con aminoácidos hidrofóbicos, desde la bicapa al sitio catalítico. A medida que el fosfolípido se mueve dentro del canal, un ion Ca²⁺ unido a la enzima (verde) se une al grupo de la cabeza; de este modo, se ubica el enlace éster que debe ser cortado (rojo), próximo al sitio catalítico. (Parte [a] adaptada de M. H. Gelb y cols., 1999, *Curr. Opin. Struc. Biol.* 9:428. Parte [b], véase D. Blow, 1991, *Nature* 351:444.)

cos, como el Tritón X-100 y el octilglucósido, carecen de grupo cargado. A concentraciones muy bajas, los detergentes se disuelven en agua pura como moléculas aisladas. A medida que la concentración aumenta, las moléculas comienzan a formar micelas —pequeños agregados esféricos en las cuales las partes hidrofílicas de las moléculas enfrentan el exterior y las zonas hidrofóbicas se agrupan en el centro (véase la Fig. 10-3c). La *concentración micelar crítica (CMC)* a la cual se forman las micelas es característica de cada detergente y es una función de las estructuras de sus partes hidrofóbica e hidrofílica.

Los detergentes iónicos y no iónicos interactúan de diferente forma con las proteínas y tienen usos distintos en el laboratorio. Los detergentes iónicos se unen a las regiones hidrofóbicas expuestas de las proteínas de membrana, así como a los núcleos hidrofóbicos de las proteínas hidrosolubles. Debido a su carga, estos detergentes también pueden desarmar los enlaces iónicos y los puentes de hidrógeno. A elevadas concentraciones, por ejemplo, el dodecilsulfato de sodio desnaturaliza por completo las proteínas mediante su unión a cada cadena lateral, una propiedad explotada en la electroforesis en gel con el dodecilsulfato de sodio (véase la Fig. 3-36). Los detergentes no iónicos, en general, no desnaturalizan las proteínas y, así, son útiles para extraerlas en su forma plegada y activa de las membranas antes de purificarlas. Las interacciones entre proteínas, en especial las más débiles, pueden ser sensibles a los detergentes tanto iónicos como no iónicos.

A elevadas concentraciones (por encima de la CMC), los detergentes no iónicos solubilizan las membranas biológicas formando micelas mixtas de detergente, fosfolípidos y proteínas integrales de la membrana, estructuras masivas hidrofóbicas que no se disuelven en solución acuosa (Fig. 10-23, parte superior). A bajas concentraciones (por debajo de la CMC), estos detergentes se unen a las regiones hidrofóbicas de la mayoría de las proteínas integrales de la membrana sin formar micelas, lo que permite que permanezcan solubles en solución acuosa (Fig. 10-23, parte inferior). La creación de una solución acuosa de proteínas integrales de membrana de este tipo es un primer paso, necesario en la purificación de las proteínas.

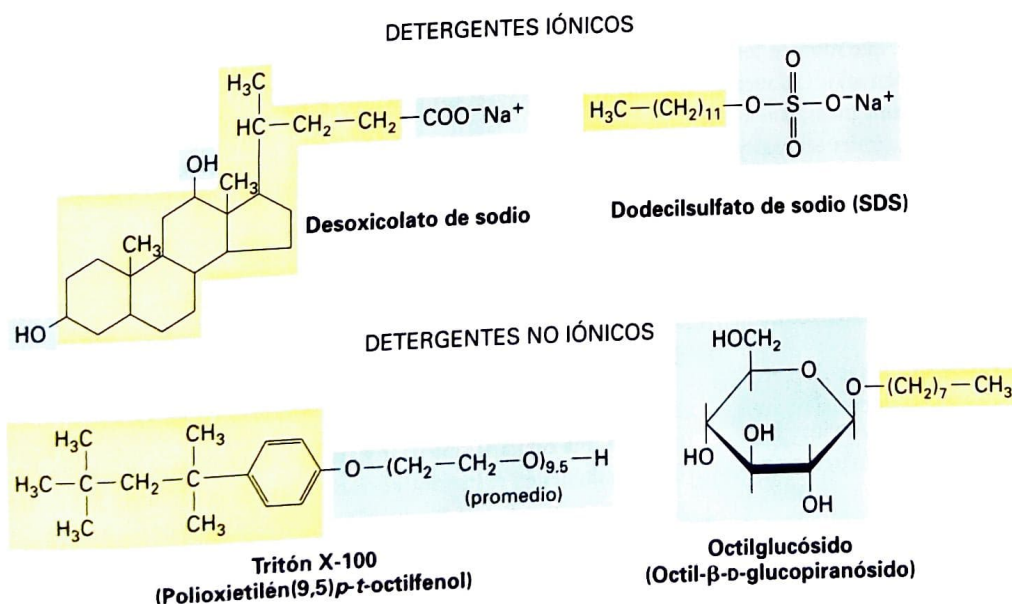
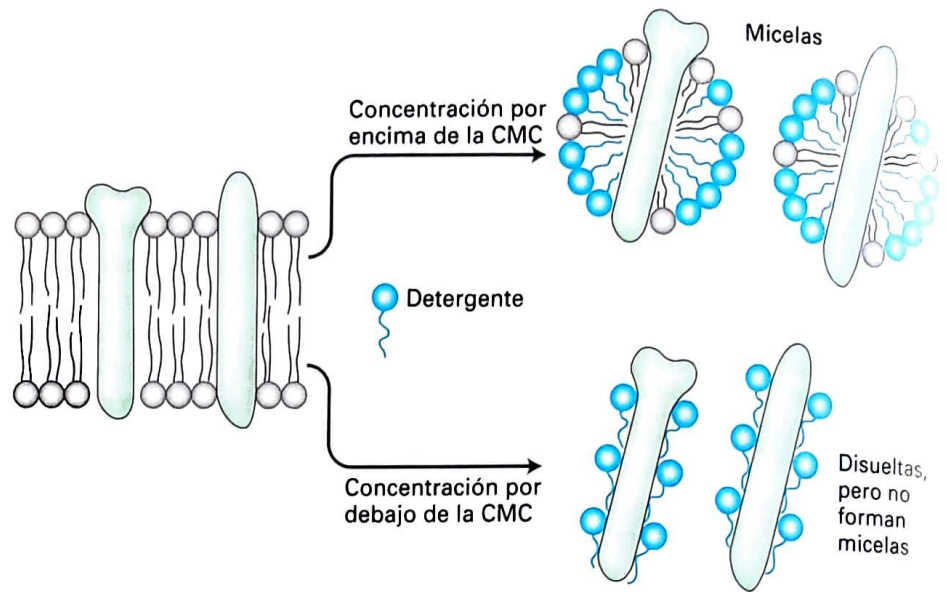


FIGURA 10-22 Estructuras de cuatro detergentes comunes. La parte hidrofóbica de cada molécula se muestra en amarillo; la parte hidrófila, en azul. La sal biliar desoxicolato sódico es un producto natural; los otros son sintéticos. Aunque los detergentes iónicos comúnmente provocan la desnaturalización de las proteínas, los no iónicos no lo hacen y, así, resultan útiles para solubilizar las proteínas integrales de la membrana.

FIGURA 10-23 Solubilización de las proteínas integrales de la membrana por detergentes no iónicos.

A una concentración superior que su concentración micelar crítica (CMC), un detergente solubiliza lípidos y proteínas integrales de la membrana y forma micelas mixtas que contienen moléculas de detergente, proteínas y lípidos. A concentraciones inferiores a la de la CMC, los detergentes no iónicos (p. ej., el octilglucósido, el Triton X-100) pueden disolver las proteínas de la membrana sin formar micelas, al cubrir las regiones que se expanden en la membrana.



El tratamiento de células cultivadas con una solución salina amortiguada que contenga un detergente no iónico, como el Tritón X-100, extrae las proteínas hidrosolubles, así como las proteínas integrales de la membrana. Según se mencionó anteriormente, los dominios exoplásmico y citosólico de las proteínas integrales de la membrana, por lo general, son hidrófilos e hidrosolubles. Los dominios que se expanden en la membrana, sin embargo, son ricos en residuos hidrofóbicos y no cargados (véase la Fig. 10-14). Cuando se separan de la membrana, estos segmentos hidrofóbicos expuestos tienden a interactuar entre sí; esto hace que las moléculas proteicas se agreguen y precipiten en las soluciones acuosas. Las partes hidrofóbicas de las moléculas de detergente no iónico se unen preferentemente a los segmentos hidrofóbicos de las proteínas transmembrana, lo que evita la agregación proteica y permite que las proteínas permanezcan en la solución acuosa. Luego, las proteínas transmembrana solubilizadas en el detergente pueden ser purificadas por cromatografía de afinidad y otras técnicas empleadas en la purificación de proteínas hidrosolubles (véase el Cap. 3).

Como se analizó previamente, la mayoría de las proteínas periféricas de la membrana están unidas a proteínas transmembrana específicas, a los fosfolípidos de la membrana, mediante interacciones iónicas u otras interacciones no covalentes débiles. Por lo general, las proteínas periféricas pueden ser removidas de las membranas con soluciones de gran fuerza iónica (soluciones salinas concentradas), que rompen los enlaces iónicos, o con productos químicos que se unen a los cationes divalentes, como Mg^{2+} . A diferencia de las proteínas integrales, la mayoría de las proteínas periféricas son solubles en soluciones acuosas y no requieren disolución con detergentes no iónicos.

rodeadas de dominios hidrófilos que se extienden hacia el ambiente acuoso y que rodean las caras citosólica y exoplásmica de la membrana (véanse las Figs. 10-14, 10-15 y 10-17).

- Las cadenas laterales de los ácidos grasos, como así también los grupos polares de las cabezas de los lípidos de la membrana, se empaquetan de forma estrecha e irregular alrededor de los segmentos hidrofóbicos de las proteínas integrales de la membrana (véase la Fig. 10-16).
- Las porinas, a diferencia de otras proteínas integrales, contienen láminas β que se expanden en la membrana y conforman un canal con forma de barril a través de la bicapa (véase la Fig. 10-18).
- Largas cadenas de lípidos unidas a ciertos aminoácidos anclan ciertas proteínas a una u otra lamela de la membrana (véase la Fig. 10-19).
- Todas las proteínas transmembrana y los glucolípidos están orientados de manera asimétrica en la bicapa. Invariablemente, las cadenas de hidratos de carbono están presentes solo en la superficie exoplásmica de una glucoproteína o un glucolípido.
- Muchas enzimas hidrosolubles (p. ej., fosfolipasas) emplean los fosfolípidos como sus sustratos y deben unirse a la superficie de la membrana para llevar a cabo su función. Esta unión con frecuencia se debe a la atracción entre las cargas positivas de los residuos básicos de la proteína y las cargas negativas de los grupos de las cabezas de los fosfolípidos de la bicapa.
- Las proteínas transmembrana se extraen de modo selectivo (se solubilizan) y purifican con el uso de detergentes no iónicos.

CONCEPTOS CLAVE de la sección 10.2

Proteínas de la membrana: estructura y funciones básicas

- Las membranas biológicas habitualmente contienen proteínas integrales (transmembrana) y proteínas periféricas, que no ingresan en el núcleo hidrofóbico de la bicapa (véase la Fig. 10-1).
- La mayoría de las proteínas integrales de la membrana contienen una o más hélices α hidrofóbicas que se insertan en la membrana y están

10.3 Fosfolípidos, esfingolípidos y colesterol: síntesis y movimiento intracelular

En esta sección, consideraremos algunos de los desafíos especiales que enfrenta una célula al sintetizar y transportar lípidos, que son escasamente solubles en el interior acuoso de las células. El foco de nuestro análisis se centrará en la biosíntesis y el movimiento de los principales lípidos que se encuentran en las membranas celulares (los fosfolípidos, los esfingolípidos y el colesterol) y sus precursores. En la biosíntesis de lípidos, los precursores hidrosolubles se ensamblan en los intermedia-

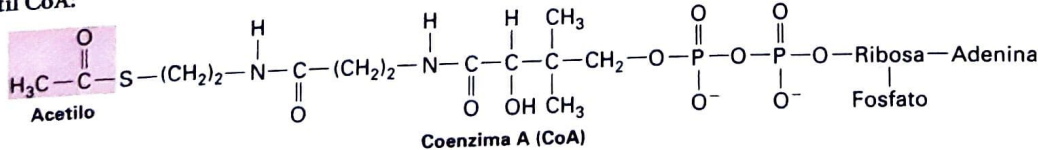
rios asociados en la membrana que luego se convierten en los productos lipídicos de la membrana. El movimiento de los lípidos (especialmente los componentes de la membrana, entre diferentes orgánulos) es crítico para mantener la composición adecuada y las propiedades de las membranas, así como la estructura general de la célula.

Un principio fundamental de la biosíntesis de las membranas es aquel según el cual la célula sintetiza membranas nuevas solo por expansión de las ya existentes. (La única excepción puede ser la autofagia, en la que se forma una membrana nueva, inicialmente, a través de la formación de una “medialuna autofágica”, cuya construcción implica la modificación de la fosfatidiletanolamina con el modificador ubiquitinoide Atg8 [véase la Fig. 14-35]). Si bien algunas etapas iniciales en la síntesis de los lípidos de la membrana se llevan a cabo en el citoplasma, los pasos finales son catalizados por enzimas unidas a membranas celulares preexistentes, y los productos se incorporan a las membranas a medida que se generan. Cuando las células se exponen brevemente a precursores radiactivos (p. ej., fosfato o ácidos grasos), se obtiene evidencia de este fenómeno: todos los fosfolípidos y esfingolípidos que incorporan estas sustancias precursoras están asociados con las membranas intracelulares; como se esperaría por la hidrofobicidad de las cadenas de ácidos grasos, ninguno se encuentra libre en el citosol. Después de formarse, los lípidos de la membrana deben distribuirse adecuadamente tanto en las lamelas de una membrana determinada como entre las membranas independientes de diferentes orgánulos en las células eucarióticas, así como en la membrana plasmática. Aquí, consideraremos de qué manera se lleva a cabo esta precisa distribución de los lípidos; en los Capítulos 13 y 14 analizaremos de qué modo se insertan las proteínas de membrana en las membranas celulares y cómo se desplazan hacia su localización adecuada dentro de la célula.

Los ácidos grasos se ensamblan a partir de bloques estructurales de dos carbonos mediante varias enzimas importantes

Los ácidos grasos (Cap. 2) desempeñan varias funciones importantes en las células. Además de ser una fuente de combustible celular (véase el tratamiento acerca de la oxidación aeróbica, en el Cap. 12), los ácidos grasos son componentes fundamentales tanto de los fosfolípidos como de los esfingolípidos que constituyen las membranas celulares (véase la Fig. 10-19). Así, la regulación de la síntesis de los ácidos grasos cumple un rol central en la regulación de la síntesis de las membranas como totalidad. Los principales ácidos grasos en los fosfolípidos contienen 14, 16, 18 o 20 átomos de carbono e incluyen tanto cadenas saturadas como no saturadas. Las cadenas de acilos grasos que se encuentran en los esfingolípidos pueden ser más largas que las que están en los fosfoglicéridos, que contienen hasta 26 átomos de carbono, y pueden experimentar también otras modificaciones químicas (p. ej. hidroxilación).

Los ácidos grasos se sintetizan a partir del bloque estructural de dos carbonos acetato, CH_3COO^- . En las células, tanto el acetato como los intermediarios de la biosíntesis de los ácidos grasos se esterifican a la gran molécula hidrosoluble coenzima A (CoA), como lo ejemplifica la estructura de la **acetil CoA**:



La acetil CoA constituye un intermediario importante en el metabolismo de la glucosa, los ácidos grasos y numerosos aminoácidos, según se detallará en el Capítulo 12. Contribuye también con grupos acetilo en muchas vías biosintéticas. Los ácidos grasos **saturados** (no hay dobles enlaces carbono-carbono) que contienen 14 o 16 átomos de carbono se sintetizan a partir de la acetil CoA por acción de dos enzimas, la *acetil-CoA carboxilasa* y la *sintasa de ácidos grasos*. En las células animales, estas enzimas se encuentran en el citosol; en las vegetales, se encuentran en los cloroplastos. La palmitoil CoA (un grupo acilo graso de 16 carbonos unido a la CoA) puede elongarse a 18-24 carbonos por la adición secuencial de unidades de dos carbonos en el RE o, en ciertas ocasiones, en la mitocondria. Las enzimas desaturadas, localizadas también en el RE, introducen dobles enlaces en posiciones específicas en algunos ácidos grasos, lo que genera ácidos grasos **insaturados**. La oleil CoA (un oleato unido a la CoA, véase el Cuadro 2-4), por ejemplo, se forma mediante la eliminación de dos átomos de H de la estearil CoA. A diferencia de lo que ocurre con los ácidos grasos libres, los derivados acilo grasos de la CoA son solubles en soluciones acuosas, por la hidrofiliidad del segmento CoA.

Las proteínas citosólicas pequeñas facilitan el movimiento de los ácidos grasos

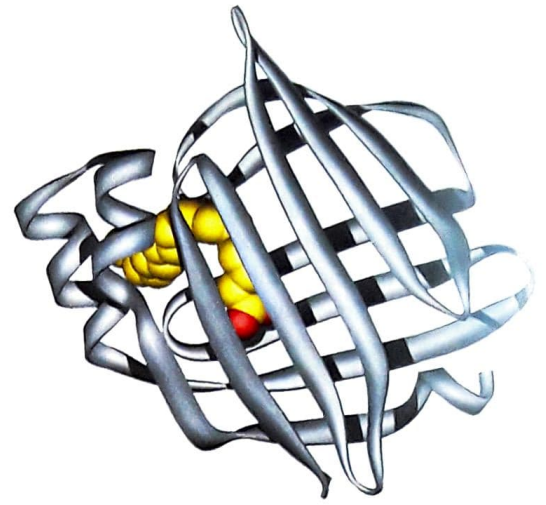
Para ser transportados a través del citoplasma celular, los ácidos grasos libres o no esterificados (los no unidos a una CoA), normalmente se unen a *proteínas que unen ácidos grasos* (FABP), que pertenecen a un grupo de pequeñas proteínas citosólicas que facilitan el movimiento intracelular de muchos lípidos. Estas proteínas contienen un bolsillo hidrofóbico tapizado con láminas β (Fig. 10-24). Una cadena larga de ácido graso puede encajar en este bolsillo e interactuar en forma no covalente con la proteína que la rodea.

La expresión de las proteínas que unen ácidos grasos celulares se regula de modo coordinado con los requisitos celulares para la captación y liberación de los ácidos grasos. De este modo, los niveles de estas proteínas son elevados en los músculos activos que están empleando ácidos grasos para la generación de ATP y en los adipocitos (células que almacenan grasa), cuando están captando ácidos grasos que deben ser almacenados como triglicéridos o liberando ácidos grasos para ser empleados por otras células. La importancia de las proteínas que unen ácidos grasos, en el metabolismo de dichos ácidos, es destacada, ya que pueden componer hasta el 5% de todas las proteínas citosólicas en el hígado, y la inactivación genética de dichas proteínas del músculo cardíaco convierte al corazón de un músculo que primariamente quema ácidos grasos para obtener la energía en uno que principalmente quema glucosa.

Los ácidos grasos son incorporados a los fosfolípidos principalmente en la membrana del RE

Los ácidos grasos no se incorporan directamente a los fosfolípidos; sino que en las células eucarióticas se convierten, en primer lugar, en ésteres de CoA. La síntesis posterior de fosfolípidos, como la de los fosfoli-

FIGURA 10-24 Unión de un ácido graso al bolsillo hidrofóbico de una proteína de unión al ácido graso (FABP). La estructura cristalina del FABP de un adipocito (diagrama de cinta) revela que el bolsillo de unión hidrofóbico se genera a partir de dos láminas β que están casi perpendiculares entre sí, que forman una estructura semejante a una valva de una almeja. Un ácido graso (carbonos en amarillo; oxígenos en rojo) interactúa en forma no covalente con los residuos de aminoácidos hidrofóbicos, dentro de este bolsillo. (Véase A. Reese-Wagoner y cols., 1999, *Biochim. Biophys. Acta* 23:1441 (2-3):1 06-116.)



céridos, puede ser llevada a cabo por enzimas asociadas con la cara citosólica de la membrana del RE, habitualmente el liso, en las células animales; a través de una serie de pasos, las CoA de los acilos grasos, glicerol 3-fosfato y los precursores de los grupos polares de las cabezas son unidos y luego insertados a la membrana del RE (Fig. 10-25). El hecho de que estas enzimas estén localizadas en la cara citosólica de la membrana significa que hay una asimetría inherente en la biogénesis de la membrana: las nuevas membranas, inicialmente, se sintetizan solo sobre una lamela —un hecho del que derivan consecuencias importantes para la distribución asimétrica de los lípidos en las lamelas de la membrana—. Una vez que se han sintetizado sobre el RE, los fosfolípidos son transportados a otros orgánulos y a la membrana plasmática. Las mitocondrias sintetizan partes de sus propios lípidos de membrana e importan otros.

Los esfingolípidos también son sintetizados indirectamente a partir de múltiples precursores. La esfingosina, el bloque estructural de estos lípidos, se sintetiza en el RE; dicha síntesis comienza con el acoplamiento de un grupo palmitoil a partir de la palmitoil-CoA a serina; la adición posterior de un segundo grupo acilo graso para formar una

N-acil esfingosina (ceramida) también se produce en el RE. Posteriormente, en el aparato de Golgi, un grupo polar de la cabeza se añade a la ceramida, lo que da como resultado la *esfingomielina*, cuya cabeza contiene el grupo de fosforilcolina, y varios *glucoesfingolípidos*, en los cuales el grupo de la cabeza puede ser un monosacárido o un oligosacárido más complejo (véase la Fig. 10-8b). La síntesis de algunos esfingolípidos también puede producirse en las mitocondrias. Además de servir como esqueleto para los esfingolípidos, la ceramida y sus productos metabólicos son moléculas de señalización importantes que pueden influenciar el crecimiento celular, la proliferación, la endocitosis, la resistencia al estrés y la muerte celular programada (apoptosis).

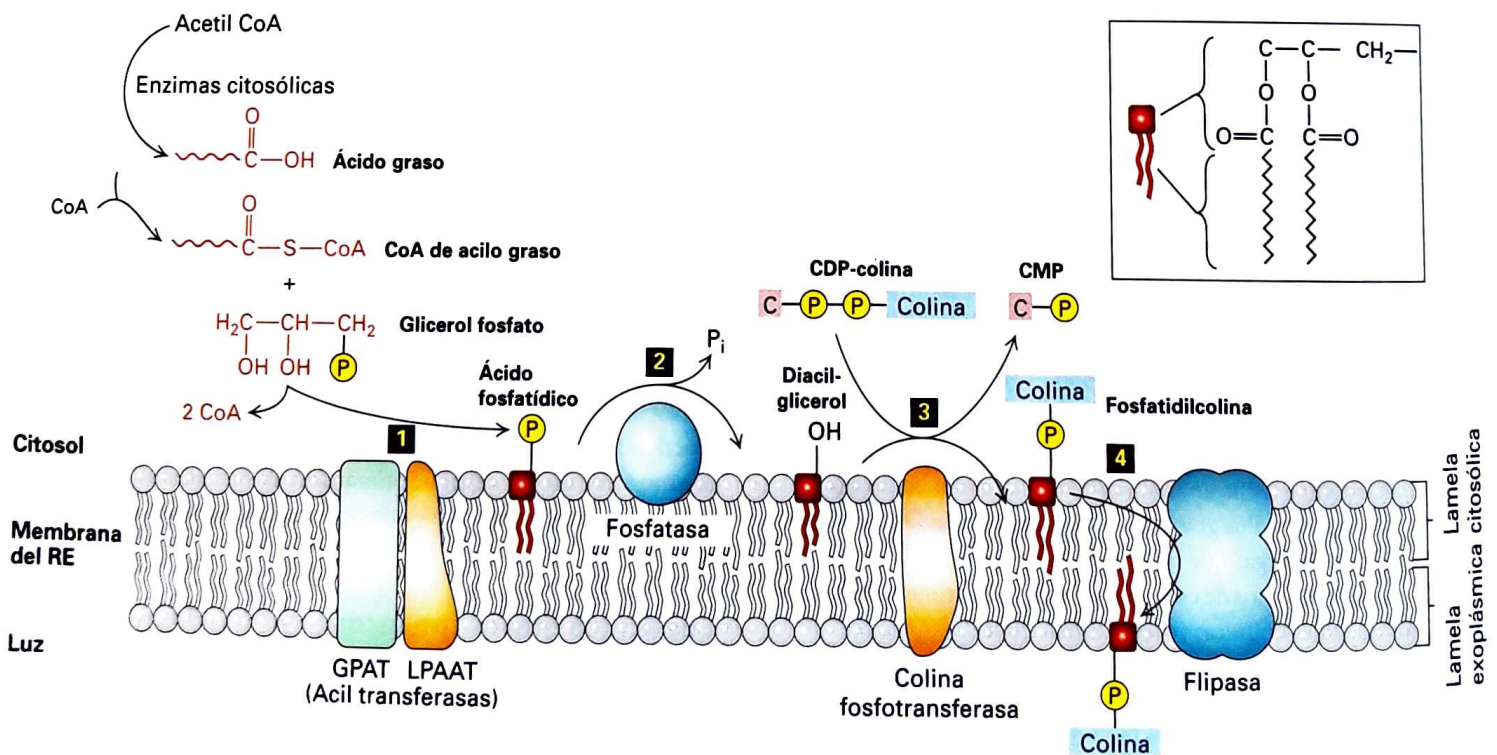


FIGURA 10-25 Síntesis de fosfolípidos en la membrana del RE. Como los fosfolípidos son moléculas anfipáticas, los estadios finales de su síntesis en múltiples etapas pueden producirse en la interfase, entre una membrana y el citosol, y son catalizados por enzimas asociadas a la membrana. Paso 1: dos ácidos grasos de la acil-CoA graso son esterificados al esqueleto de glicerol fosforilado, lo que forma ácido fosfatídico cuyas cadenas hidrocarbonadas

largas anclan la molécula a la membrana. Paso 2: una fosfatasa convierte el ácido fosfatídico en diacilglicerol. Paso 3: un grupo de la cabeza polar (p. ej., fosforilcolina) se transfiere desde la citosina difosfocolina (CDP-colina) al grupo hidroxilo expuesto. Paso 4: las proteínas flipasa catalizan el movimiento de los fosfolípidos desde la lamela citosólica en la cual se han formado inicialmente, hasta la lamela exoplásmica.

Después de que su síntesis se ha completado en el aparato de Golgi, los esfingolípidos son transportados a otros compartimentos celulares a través de mecanismos mediados por vesículas semejantes a los que existen para el transporte de proteínas, analizados en el Capítulo 14. Cualquier tipo de transporte vesicular produce el movimiento no solo de la proteína, sino también de los lípidos que componen la membrana vesicular. Además, los fosfolípidos, como los fosfoglicéridos y el colesterol, pueden moverse entre los orgánulos por medio de diferentes mecanismos, como los que se describen más adelante.

Las flipasas mueven los fosfolípidos de una lamela de la membrana a la opuesta

Aun cuando los fosfolípidos inicialmente son incorporados a la lamela citosólica de la membrana del RE, varios fosfolípidos se distribuyen de modo asimétrico en las dos lamelas de la membrana del RE y las otras membranas celulares. Como se mencionó anteriormente, los fosfolípidos no se intercambian rápidamente de una lamela a la otra. Para que la membrana del RE se expanda por el crecimiento de ambas lamelas y tenga una distribución asimétrica de fosfolípidos, sus componentes fosfolipídicos deben ser capaces de moverse de una lamela de la membrana a la otra. Aunque los mecanismos empleados para generar

y mantener la asimetría fosfolipídica de la membrana no se comprendan bien, queda claro que las flipasas desempeñan una función central. Como se describe en el Capítulo 11, estas proteínas integrales de la membrana emplean la energía de la hidrólisis del ATP para facilitar el movimiento de las moléculas del fosfolípido de una lamela a la otra (véase la Fig. 11-15).

El colesterol se sintetiza mediante enzimas en el citosol y la membrana del RE

Nos centramos luego en el colesterol, el principal esteroide en las células animales. El colesterol se sintetiza principalmente en el hígado. Los primeros pasos de la síntesis del colesterol (Fig. 10-26) —la conversión de los tres grupos acetilo ligados a la CoA (acetil CoA) que forman la molécula de seis carbonos β -hidroxi- β -metilglutaril ligada a la CoA (HMG-CoA)— ocurren en el citosol. La conversión de la HMG-CoA en mevalonato, el paso clave que controla la velocidad en la biosíntesis del colesterol, es catalizado por la *HMG-CoA reductasa*, una proteína integral de la membrana del RE, aun cuando ambos, su sustrato y su producto, sean hidrosolubles. El dominio hidrosoluble catalítico de la HMG-CoA reductasa se extiende al citosol, pero sus ocho hélices α transmembrana están firmemente embebidas en la membrana del RE.

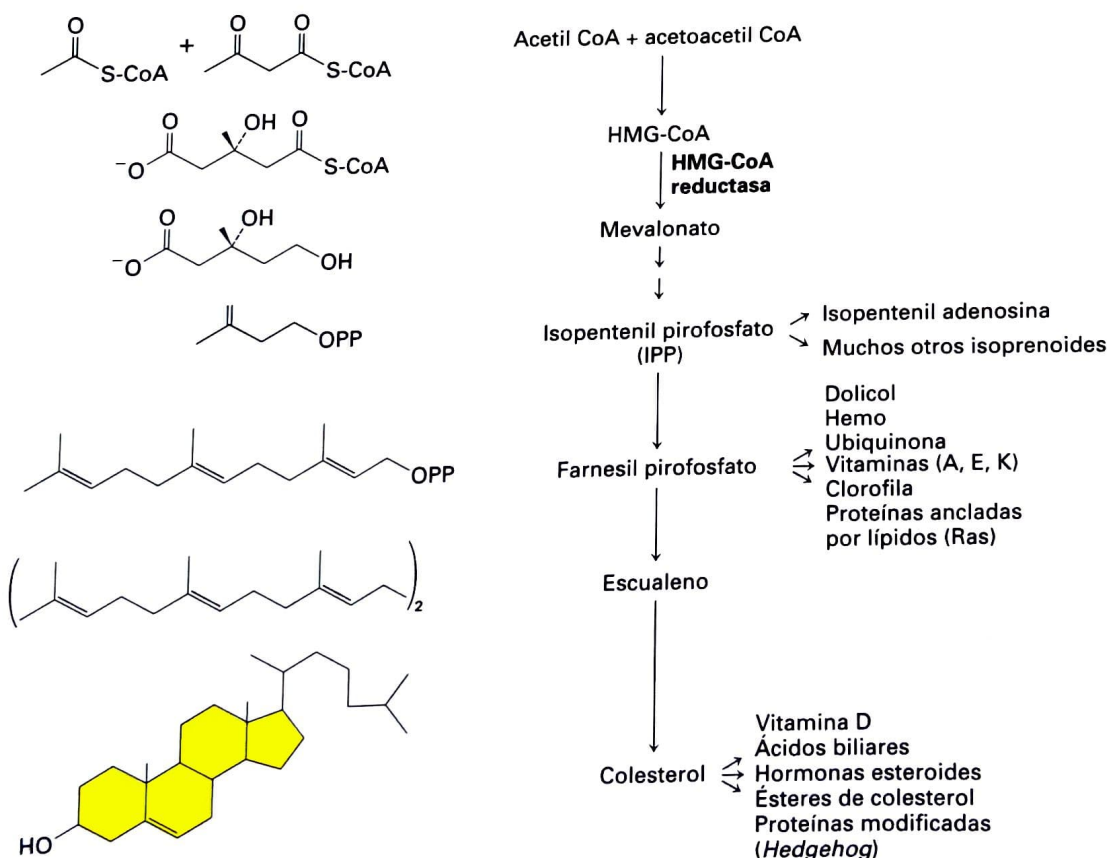


FIGURA 10-26 Vía biosintética del colesterol. El paso de control de la velocidad regulada en la biosíntesis del colesterol es la conversión de β -hidroxi- β -metilglutaril CoA (HMG-CoA) en ácido mevalónico, por la HMG-CoA reductasa, una proteína de la membrana del RE. Luego, el mevalonato se convierte a isopentenil pirofosfato (IPP), que tiene la estructura isoprenoide básica de cinco

carbonos. El IPP puede convertirse en colesterol y en muchos otros lípidos, con frecuencia, a través de intermediarios poliisoprenoides que se muestran aquí. Se indican algunos de los numerosos compuestos derivados de los intermediarios isoprenoides y del colesterol.

Cinco de las hélices α componen el denominado *dominio que detecta esterol* y regulan la estabilidad de la enzima. Cuando los niveles de colesterol en la membrana del RE son altos, la unión de este dominio hace que la proteína se una a otras dos proteínas integrales de la membrana del RE, la Insig-1 y la Insig-2. Esto, a su vez, induce la ubiquitinación (véase la Fig. 3-29) de la HMG-CoA reductasa y su degradación por la vía proteasómica, lo que reduce la producción de mevalonato, el intermediario clave en la biosíntesis del colesterol.

La **aterosclerosis**, llamada con frecuencia taponamiento de las arterias dependientes de colesterol, se caracteriza por el depósito progresivo de colesterol y de otros lípidos, células y material de la matriz extracelular en la capa interna de la pared de una arteria. La distorsión resultante de la pared arterial puede conducir, sola o combinada con un coágulo sanguíneo, a un bloqueo mayor del flujo sanguíneo. La aterosclerosis da cuenta del 75% de las muertes relacionadas con la enfermedad cardiovascular, en los Estados Unidos.

Quizás los medicamentos más exitosos para la aterosclerosis sean las *estatinas*. Estos fármacos se unen a la HMG-CoA reductasa e inhiben en forma directa su actividad, lo que disminuye la biosíntesis del colesterol. En consecuencia, la cantidad de lipoproteínas de baja densidad (véase la Fig. 14-27) —las partículas pequeñas recubiertas de membrana, que contienen colesterol esterificado a ácidos grasos, que con frecuencia y adecuadamente se denominan “colesterol malo”— disminuye en la sangre, lo que reduce la formación de placas ateroscleróticas.

El mevalonato, el producto de seis carbonos formado por la HMG-CoA reductasa, se convierte a través de varios pasos en el compuesto isoprenoide de cinco carbonos isopentenil pirofosfato (IPP) y su esteroisómero, el dimetilalil pirofosfato (DMPP) (véase la Fig. 10-26). Estas reacciones son catalizadas por enzimas citosólicas, al igual que las reacciones posteriores en la vía de síntesis del colesterol, en las cuales seis unidades IPP se condensan para producir escualeno, un intermediario de cadena ramificada de 30 carbonos. Las enzimas unidas a la membrana del RE catalizan las múltiples reacciones que convierten el escualeno en colesterol en los mamíferos o en esteroides relacionados, en otras especies. Uno de los intermediarios de esta vía, el farnesil piro-

fosfato, es el precursor del lípido prenilo que ancla la Ras y sus proteínas relacionadas a la superficie citosólica de la membrana plasmática (véase la Fig. 10-19), así como otras biomoléculas importantes (véase la Fig. 10-26).

El colesterol y los fosfolípidos son transportados entre los orgánulos por varios mecanismos

Como ya se mencionó, los pasos finales en la síntesis del colesterol y los fosfolípidos se llevan a cabo, principalmente, en el RE. Así, la membrana plasmática y las membranas que limitan otros orgánulos deben obtener estos lípidos por medio de uno o más procesos de transporte. Los lípidos de las membranas pueden acompañar las proteínas solubles y las proteínas de membrana durante la vía secretora descrita en el Capítulo 14; las vesículas de membrana brotan desde el RE y se fusionan con las membranas del complejo de Golgi, y otras vesículas de membrana brotan desde el complejo de Golgi y se fusionan con la membrana plasmática (Fig. 10-27a). Sin embargo, varias líneas de evidencia sugieren que existe un notable movimiento interorgánulo de colesterol y fosfolípidos a través de otros mecanismos. Por ejemplo, los inhibidores químicos de la vía secretora clásica y las mutaciones que impiden el tránsito vesicular, en esta vía, no evitan el transporte de colesterol o de fosfolípidos entre las membranas.

Un segundo mecanismo comprende el contacto directo mediado por proteínas entre el RE, o las membranas derivadas del RE, con las membranas de otros orgánulos (Fig. 10-27b). En el tercer mecanismo, pequeñas proteínas que transfieren lípidos facilitan el intercambio de fosfolípidos o de colesterol entre diferentes membranas (Fig. 10-27c). Aunque estas proteínas de transferencia han sido identificadas en ensayos *in vitro*, su función en los movimientos intracelulares de la mayoría de los fosfolípidos no está bien definida. Por ejemplo, los ratones con una mutación *knock out* en el gen que codifica la proteína que transfiere fosfatidilcolina parecen ser normales en la mayoría de los aspectos, lo que indica que esta proteína no es esencial para el metabolismo de los fosfolípidos celulares.

Como se señaló previamente, la composición lipídica de las membranas de los diferentes orgánulos varía considerablemente (véase el

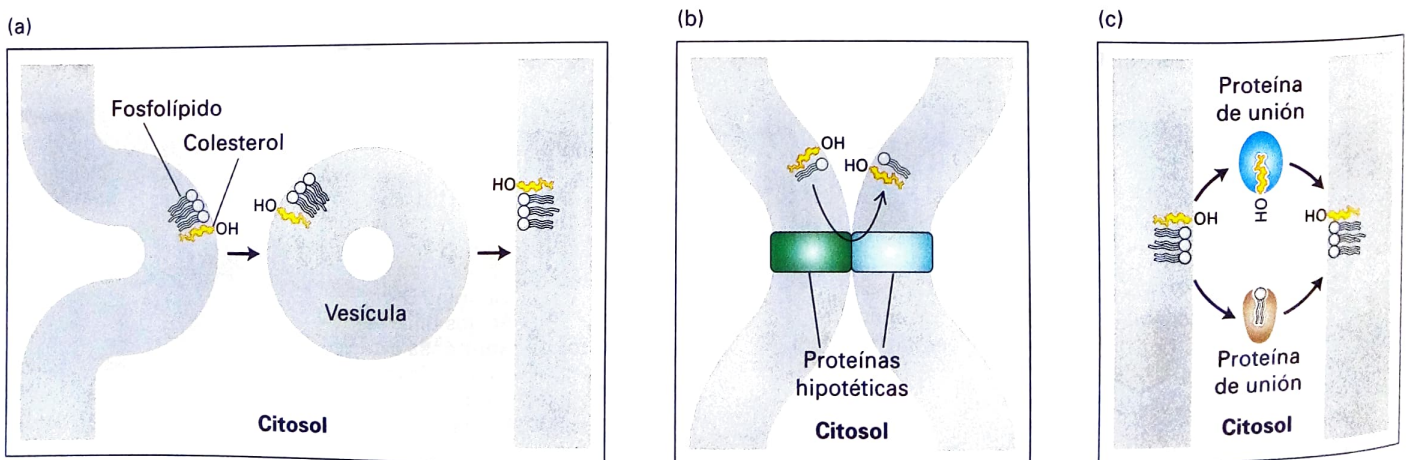


FIGURA 10-27 Mecanismos propuestos del transporte de colesterol y de los fosfolípidos entre las membranas. En el mecanismo (a), las vesículas transfieren lípidos entre las membranas. En el mecanismo (b), la transferencia de lípidos es una consecuencia del contacto directo entre las membranas,

mediado por proteínas embebidas en éstas. En el mecanismo (c), la transferencia es mediada por pequeñas proteínas solubles de transferencia de lípidos. (Adaptado de F.R. Maxfield y D. Wustner, 2002, *J. Clin. Invest.* 110:891.)

Cuadro 10-1). Algunas de estas diferencias se deben a los distintos sitios de síntesis. Por ejemplo, un fosfolípido denominado cardiolipina, que se localiza en la membrana de las mitocondrias, se sintetiza solo en las mitocondrias, y muy poco se transfiere a otros orgánulos. El transporte diferencial de lípidos también desempeña un papel en la determinación de las composiciones lipídicas de diferentes membranas celulares. Por ejemplo, aun cuando el colesterol se sintetiza en el RE, la concentración de colesterol (cociente molar colesterol a fosfolípido) es ~ 1,5-13 veces más elevada en la membrana plasmática que en otros orgánulos (RE, Golgi, mitocondrias, lisosomas). Aunque los mecanismos responsables de establecer y mantener estas diferencias no se comprenden bien, hemos visto que la composición distintiva de lípidos de cada membrana tiene una influencia central en sus propiedades físicas y biológicas.

CONCEPTOS CLAVE de la sección 10.3

Fosfolípidos, esfingolípidos y colesterol: síntesis y movimiento intracelular

- Los ácidos grasos saturados e insaturados de varias longitudes de cadena son componentes de los fosfolípidos y esfingolípidos.
- Los ácidos grasos se sintetizan a partir de la acetil CoA por enzimas hidrosolubles y son modificados por la elongación y desaturación en el retículo endoplásmico (RE).
- Los ácidos grasos libres son transportados, en el interior de las células, por las proteínas que unen ácidos grasos (FABP).
- Los ácidos grasos son incorporados a los fosfolípidos a través de un proceso de múltiples pasos. Los pasos finales en la síntesis de los fosfoglicéridos y los esfingolípidos son catalizados por enzimas asociadas a las membranas, inicialmente, en la cara citosólica del RE (véase la Fig. 10-25).
- Cada tipo de lípido recién sintetizado se incorpora a las membranas preexistentes, sobre las cuales se sintetiza; así, las membranas son —en sí mismas— la plataforma para la síntesis de nuevo material de membrana.
- La mayoría de los fosfolípidos de la membrana se distribuyen preferentemente en la lamela exoplásmica o citosólica. Esta asimetría resulta, en parte, de la acción de las flipasas de fosfolípidos, que intercambian lípidos de una lamela a la otra.
- Los pasos iniciales de la biosíntesis del colesterol se producen en el citosol, mientras que los pasos finales son catalizados por enzimas asociadas con la membrana del RE.
- El paso de control de la velocidad, en la biosíntesis del colesterol, es catalizado por la HMG-CoA reductasa, cuyos segmentos transmembrana están embebidos en la membrana del RE y contienen un dominio que detecta la presencia de esterol.
- Evidencias considerables indican que el transporte de vesículas, independiente del complejo de Golgi, dirige los contactos mediados por proteínas entre diferentes membranas, transportadores proteicos solubles; todos éstos pueden dar cuenta de cierto transporte interorgánulos de colesterol y fosfolípidos (véase la Fig. 10-27)

Perspectivas para el futuro

Una pregunta fundamental en la biología de los lípidos concierne a la generación, mantenimiento y función de la distribución asimétrica de éstos en las lamelas de una membrana, además de la variación en la composición lipídica entre las membranas de diferentes orgánulos. ¿Cuáles son los mecanismos que subyacen a esta complejidad y por qué se necesita dicha complejidad? Ya sabemos que ciertos lípidos pueden interactuar específicamente con determinadas proteínas e influenciar su actividad. Por ejemplo, las proteínas multiméricas grandes que participan en la fosforilación oxidativa en la membrana interna de la mitocondria parecen ensamblarse en supercomplejos cuya estabilidad puede depender de las propiedades físicas y la unión de fosfolípidos especializados, como la cardiolipina (véase el Cap. 12).

La existencia de balsas de lípidos en las membranas biológicas y su función en la señalización celular sigue siendo un tópico de debate. Muchos estudios bioquímicos que usan membranas modelos muestran que los ensambles laterales estables de esfingolípidos y colesterol —balsas de lípidos— pueden facilitar las interacciones selectivas entre proteínas, al excluir o incluir determinadas proteínas. Pero si las balsas lipídicas existen o no en las membranas biológicas naturales, así como sus dimensiones y dinámica, se encuentran en investigación intensa. Las nuevas herramientas biofísicas y microscópicas están comenzando a proporcionar bases sólidas para su existencia, tamaño y conducta.

A pesar del considerable avance en nuestra comprensión del metabolismo celular y el movimiento de los lípidos, aún hay una escasa caracterización de los mecanismos de transporte de colesterol y fosfolípidos entre las membranas de los orgánulos. En particular, carecemos de una comprensión detallada del modo en el que varias proteínas de transporte mueven los lípidos desde la lamela de una membrana a la otra (actividad flipasa) y hacia adentro y afuera de las células. Esta comprensión requerirá una determinación de estructuras de alta resolución de estas moléculas, su captura en varias etapas del proceso de transporte y un análisis cinético y biofísico de otro tipo sobre su función, semejante a los enfoques analizados en el Capítulo 11 para dilucidar la actividad de los canales iónicos y las bombas impulsadas por ATP.

Los avances recientes en la solubilización y cristalización de las proteínas integrales de la membrana han conducido a delinear las estructuras moleculares de muchos tipos importantes de proteínas, como los canales iónicos, los receptores acoplados a la proteína G, las bombas iónicas impulsadas por ATP y las acuaporinas, como veremos en el Capítulo 11. Sin embargo, muchas clases importantes de proteínas de membrana han resultado poco accesibles, aun a estos nuevos enfoques. Por ejemplo, carecemos de la estructura de cualquier proteína que transporte glucosa a una célula eucariótica. Como aprenderemos en los Capítulos 15 y 16, muchas clases de receptores abarcan la membrana plasmática con una o más hélices α . Quizás, sorprendentemente carezcamos de la estructura molecular del segmento transmembrana de cualquier receptor de la superficie celular eucariótica de paso simple y, por este motivo, muchos aspectos de la función de estas proteínas aún siguen siendo un misterio. La transmisión de información a través de la membrana, tal como sucede cuando un receptor de paso simple une un ligando adecuado, aún debe ser descrita a resolución molecular adecuada. La dilucidación de las estructuras moleculares de estas y muchos otros tipos de

proteínas de membrana esclarecerá numerosos aspectos de la biología celular molecular.

Palabras clave

anfipático 445	balsa lipídica 454
acuaporina 458	liposoma 445
aterosclerosis 468	luz 448
colesterol 450	proteína de transporte de la membrana 443
cilio 448	micela 445
citoesqueleto 443	proteína periférica de la membrana 456
cara citosólica 447	fosfoglicérido 448
cara exoplásmica 447	fosfolipasa 454
flagelo 448	bicapa fosfolipídica 445
flipasa 454	membrana plasmática 443
glucolípido 450	porina 458
glucoproteína 461	proteína receptora 443
hidrófilo 445	saturada 465
hidrófobo 445	esfingolípido 450
proteína integral de la membrana 456	estatina 468
lectina 461	esterol 450
proteína de membrana anclada por lípido 456	insaturado 465
gota lipídica 455	

Revisión de los conceptos

1. Cuando se observa al microscopio electrónico, la bicapa lipídica con frecuencia se describe como una vía de ferrocarril. Explique de qué manera la estructura de la bicapa crea esta imagen.
2. Explique la siguiente afirmación: la estructura de todas las biomembranas depende de las propiedades químicas de los fosfolípidos, mientras que la función de cada biomembrana específica depende de las proteínas específicas asociadas con esta membrana.
3. Las biomembranas contienen muchos tipos diferentes de moléculas de lípido. ¿Cuáles son los tres tipos principales de moléculas lipídicas que se encuentran en las biomembranas? ¿De qué manera estos tres tipos son similares y en qué difieren?
4. Las bicapas lipídicas se consideran fluidos bidimensionales. ¿Qué significa esto? ¿Qué impulsa el movimiento de las moléculas de lípidos y proteínas dentro de la bicapa? ¿Cómo puede medirse este movimiento? ¿Qué factores afectan el grado de fluidez de la membrana?
5. ¿Por qué las sustancias hidrosolubles son incapaces de atravesar libremente la bicapa lipídica de la membrana celular? ¿De qué manera la célula supera esta barrera de permeabilidad?
6. Nombre los tres grupos en los cuales pueden clasificarse las proteínas asociadas a la membrana. Explique el mecanismo por el cual cada grupo se asocia con una biomembrana.
7. Identifique las siguientes proteínas asociadas a la membrana, sobre la base de su estructura: (a) tetrámeros de subunidades idénticas,

cas, cada uno con seis hélices α que se expanden en la membrana; (b) trímeros de subunidades idénticas, cada uno con 16 hojas β que forman una estructura del tipo de un barril.

8. Las proteínas pueden estar unidas a la cara exoplásmica o citosólica de la membrana plasmática por medio de lípidos unidos mediante enlaces covalentes. ¿Cuáles son los tres tipos de anclas lipídicas capaces de unir las proteínas a la bicapa de la membrana plasmática y qué tipo se utiliza para las proteínas de la superficie celular que enfrentan el medio externo y para los proteoglicanos glucosilados?

9. Aunque ambas caras de una biomembrana están compuestas por los mismos tipos generales de macromoléculas, principalmente lípidos y proteínas, las dos caras de la bicapa no son idénticas. ¿Qué da cuenta de la asimetría entre ambas caras?

10. ¿Qué son los detergentes? ¿En qué difieren los detergentes iónicos y no iónicos, en cuanto a su capacidad de desintegrar la estructura de la membrana celular?

11. ¿Cuál es la identidad probable de estas proteínas asociadas a la membrana: (a) liberadas de la membrana con una solución de alta salinidad que provoca el desarreglo de los enlaces iónicos; (b) no liberadas de la membrana, al ser expuestas a una solución de alta salinidad solamente, pero liberadas cuando se las incuban con una enzima que escinde los enlaces fosfato-glicerol y los enlaces covalentes; (c) no liberadas de la membrana por exposición a una solución de elevada salinidad, pero liberadas después de añadir el detergente dodecil sulfato de sodio (SDS)? ¿La actividad de la proteína liberada en la parte (c) se preservará después de ser liberada?

12. Después de la producción de extractos de membrana, con el uso del detergente no iónico tritón X-100, analizará los lisados de la membrana por medio de espectrometría de masas y notará un alto contenido de colesterol y esfingolípidos. Más aún, el análisis bioquímico de los lisados revelará potencial actividad de cinasa. ¿Qué habrá aislado probablemente?

13. La biosíntesis de fosfolípidos en la interfase entre el retículo endoplasmático (RE) y el citosol presenta un número de desafíos que deben ser resueltos por las células. Explique cómo será manejado cada uno de los siguientes.

a. Los sustratos para la biosíntesis de fosfolípidos son todos hidrosolubles, pero los productos finales no lo son.

b. El sitio inmediato de incorporación de los fosfolípidos recién sintetizados es la lamela citosólica de la membrana del RE, pero los fosfolípidos deberán incorporarse a ambas lamelas.

c. Muchos sistemas de membrana celular, por ejemplo la membrana plasmática, son incapaces de sintetizar sus propios fosfolípidos; deberán expandirse si la célula debe crecer y dividirse.

14. ¿Cuáles son las cadenas de ácidos grasos comunes en los fosfoglicéridos, y por qué las cadenas de ácidos grasos difieren en el número de átomos de carbono en múltiplos de dos?

15. Los ácidos grasos deben asociarse con proteínas chaperonas de lípidos para poder moverse dentro de la célula. ¿Por qué se requieren estas proteínas chaperonas, y cuál es el nombre que se le da al grupo de proteínas causantes de este tránsito intracelular de ácidos grasos? ¿Cuál es la característica clave que distingue a estas proteínas que permiten a los ácidos grasos moverse dentro de la célula?

16. La biosíntesis de colesterol es un proceso altamente regulado. ¿Cuál es la enzima clave regulada en la biosíntesis de colesterol? Esta enzima está sujeta a inhibición por retroalimentación. ¿Qué es la inhibición por retroalimentación? ¿De qué manera esta enzima detecta los niveles de colesterol en una célula?

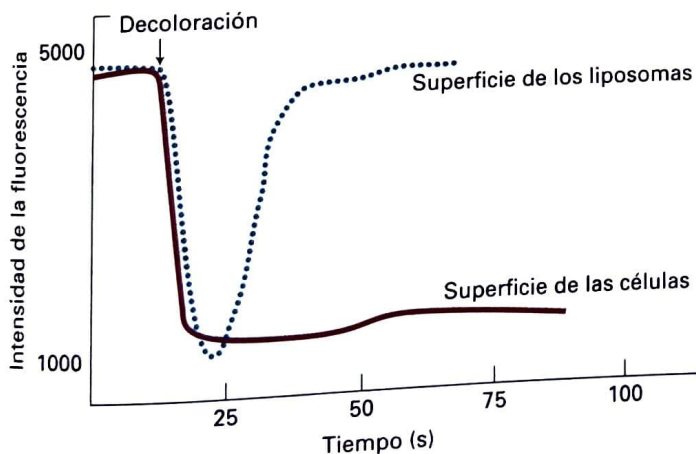
17. Los fosfolípidos y el colesterol deben ser transportados desde su sitio de síntesis hacia varios sistemas de membrana dentro de las células. Una manera de hacer esto es a través del transporte vesicular, como en el caso de muchas proteínas en la vía de secreción (Cap. 14). Sin embargo, la mayoría de los fosfolípidos y el transporte membrana a membrana de colesterol en las células no se realiza mediante el transporte vesicular. ¿Cuál es la evidencia para esta afirmación? ¿Cuáles parecen ser los mecanismos principales para el transporte de fosfolípidos y colesterol?

18. Explique el mecanismo por el cual las estatinas hacen descender el colesterol "malo".

Análisis de los datos

1. La conducta del receptor X (XR), una proteína transmembrana presente en la membrana plasmática de las células de mamífero, está siendo investigada. La proteína ha sido diseñada por ingeniería genética como una proteína de fusión que contiene la proteína fluorescente verde (PFV) en su extremo N-terminal. La PFV-XR es una proteína funcional y puede reemplazar a XR en las células.

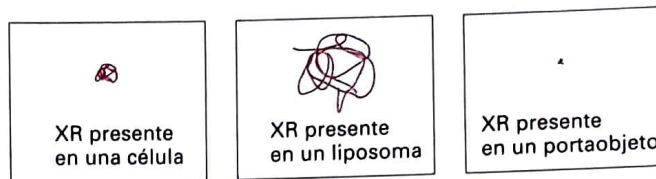
a. Las células que expresan PFV-XR o las vesículas de lípidos artificiales (liposomas) que contienen PFV-XR se someten a recuperación de la fluorescencia después del fotoaclaramiento (FRAP). La intensidad de la fluorescencia de una pequeña mancha en la superficie de las células (línea continua) o sobre la superficie de los liposomas (línea punteada) se mide antes del siguiente aclaramiento del láser (flecha). Los datos se muestran más abajo.



¿Qué explicación podría dar cuenta de la conducta distinta de la PFV-XR en los liposomas versus la membrana plasmática de una célula?

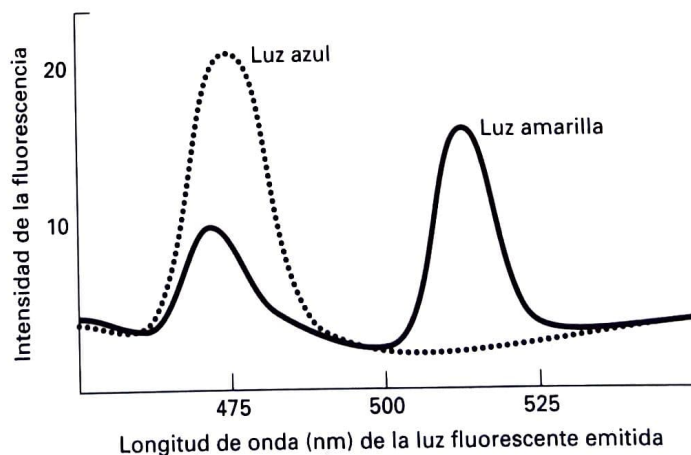
b. Diminutas partículas de oro pueden ser unidas a moléculas individuales; luego, es posible seguir su movimiento al microscopio óptico mediante el seguimiento de las partículas individuales. Este método permite observar la conducta de las proteínas individuales en la membrana. Abajo, se muestran las huellas generadas por partículas de oro unidas al XR presente en una célula (izquierda) o en un

liposoma (medio) o a un XR adherido a un portaobjetos de microscopio (derecha), durante un período de observación de 5 segundos.



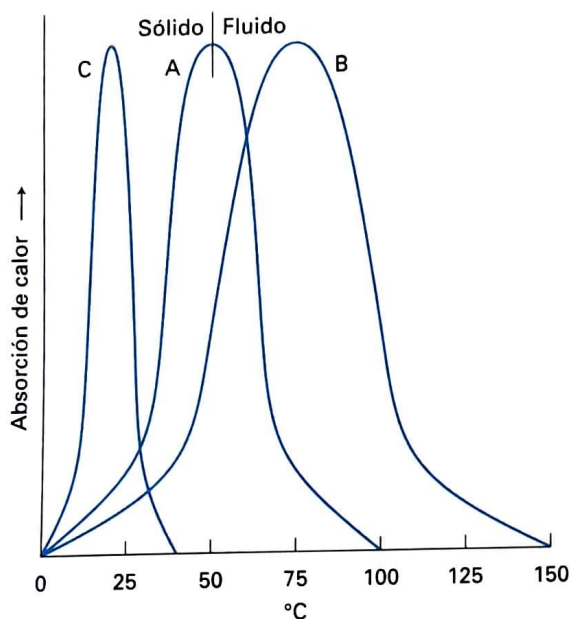
¿Qué información adicional proporcionan estos datos, más allá de la que pudo determinarse a partir de los datos del FRAP?

c. La transferencia de energía por resonancia de la fluorescencia (FRET) es una técnica mediante la cual una molécula fluorescente, después de su excitación con la longitud de onda luminosa adecuada, puede transferir su energía de emisión a una molécula fluorescente diferente cercana y excitarla (véase la Fig. 15-18). La proteína fluorescente azul (CFP) y la proteína fluorescente amarilla (YFP) están relacionadas a la PFV, pero emiten fluorescencia a longitudes de onda azul y amarilla, y no en verde. Si la CFP se excita con la longitud de onda luminosa adecuada y una molécula YFP está muy cercana, entonces la energía puede ser transferida desde la emisión CFP y emplearse para excitar YFP, según se indica por la pérdida de la emisión de la fluorescencia azul y el incremento de la emisión de la fluorescencia amarilla. CFP-XR y YFP-XR se expresan juntas en una línea celular o se incorporan ambas a los liposomas. El número de moléculas de YFP-XR y CFP-XR por cm^2 de membrana es equivalente en las células y en los liposomas. Luego, las células y los liposomas se irradian con una longitud de onda luminosa que hace que la CFP, pero no la YFP, emita fluorescencia. La cantidad de fluorescencia azul (CFP) y amarilla (YFP) emitida por las células (línea continua) o los liposomas (línea punteada) se registra luego, como se muestra más abajo.



¿Qué puede deducirse acerca de la XR de estos datos?

2. Después de llevar a cabo un barrido calorimétrico diferencial (un procedimiento empleado para determinar la transición de temperatura de una membrana en particular, mediante el registro de la cantidad de calor absorbido antes de la transición de fase [del estado sólido al fluido]) en las membranas de tres organismos diferentes, usted obtiene los siguientes resultados:



¿Cuál de las siguientes afirmaciones será probablemente verdadera acerca de la composición de lípidos de la membrana C?

- i. Tiene elevados niveles de hidrocarburos saturados y largas colas hidrocarbonadas, en comparación con A y B.
- ii. Tiene altos niveles de hidrocarburos saturados y cortas colas hidrocarbonadas, en comparación con A y B.
- iii. Tiene altos niveles de hidrocarburos insaturados y largas colas hidrocarbonadas, en comparación con A y B.
- iv. Tiene altos niveles de hidrocarburos insaturados y cortas colas hidrocarbonadas, en comparación con A y B.

Referencias

La bicapa lipídica: composición y organización estructural

- McMahon, H., and J. L. Gallop. 2005. Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodeling. *Nature* **438**:590-596.
- Mukherjee, S., and F. R. Maxfield. 2004. Membrane domains. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**:839-866.
- Ploegh, H. 2007. A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum. *Nature* **448**:435-438.
- Simons, K., and D. Toomre. 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **1**:31-41.
- Simons, K., and W. L. C. Vaz. 2004. Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biomolec. Struct.* **33**:269-295.
- Tamm, L. K., V. K. Kiessling, and M. L. Wagner. 2001. Membrane dynamics. *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group.
- Vance, D. E., and J. E. Vance. 2002. *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins, and Membranes*, 4th ed. Elsevier.

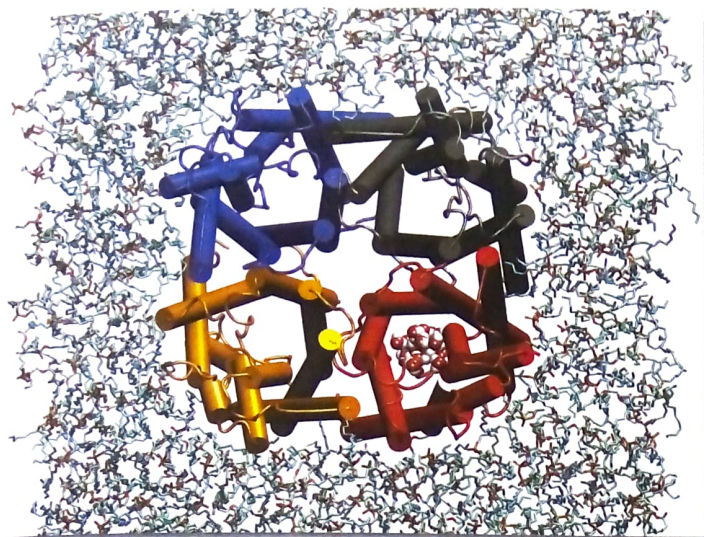
- Van Meer, G. 2006. Cellular lipidomics. *EMBO J.* **24**:3159-3165.
- Yeager, P. L. 2001. Lipids. *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group.
- Zimmerberg, J., and M. M. Kozlov. 2006. How proteins produce cellular membrane curvature. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **7**:9-19.

Proteínas de membrana: estructura y funciones básicas

- Bowie, J. 2005. Solving the membrane protein folding problem. *Nature* **438**:581-589.
- Cullen, P. J., G. E. Cozier, G. Banting, and H. Mellor. 2001. Modular phosphoinositide-binding domains: their role in signalling and membrane trafficking. *Curr. Biol.* **11**:R882-R893.
- Engelman, D. Membranes are more mosaic than fluid. 2005. *Nature* **438**:578-580.
- Lanyi, J. K., and H. Luecke. 2001. Bacteriorhodopsin. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**:415-519.
- Lee, A. G. 2005. A greasy grip. *Nature* **438**:569-570.
- Mackenzie, K. R. J. H. Prestegard, and D. M. Engelman. 1997. A transmembrane helix dimer: structure and implications. *Science* **276**:131-133.
- Mcintosh, T. J., and S. A. Simon. 2006. Roles of bilayer material properties in function and distribution of membrane proteins. *Ann. Rev. Biophys. Biomolec. Struct.* **35**:177-198.
- Wuchterpfennig, K. W., E. Gagnon, M. J. Call, E. S. Huseby, and M. E. Call. 2010. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2**:a005140.
- Schulz, G. E. 2000. β -Barrel membrane proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**:443-447.

Fosfolípidos, esfingolípidos y colesterol: síntesis y movimiento intracelular

- Bloch, K. 1965. The biological synthesis of cholesterol. *Science* **150**:19-28.
- Daleke, D. L., and J. V. Lyles. 2000. Identification and purification of aminophospholipid flippases. *Biochim. Biophys. Acta* **1486**:108-127.
- Futerman, A., and H. Riezman. 2005. The ins and outs of sphingolipid synthesis. *Trends Cell Biol.* **15**:312-318.
- Hajri, T., and N. A. Abumrad. 2002. Fatty acid transport across membranes: relevance to nutrition and metabolic pathology. *Ann. Rev. Nutr.* **22**:383-415.
- Henneberry, A. L., M. M. Wright, and C. R. McMaster. 2002. The major sites of cellular phospholipid synthesis and molecular determinants of fatty acid and lipid head group specificity. *Mol. Biol. Cell* **13**:3148-3161.
- Holthuis, J. C. M., and T. P. Levine. 2005. Lipid traffic: floppy drives and a superhighway. *Nature Rev. Molec. Cell Biol.* **6**:209-220.
- Ioarmou, Y. A. 2001. Multidrug permeases and subcellular cholesterol transport. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2**:657-668.
- Kent, C. 1995. Eukaryotic phospholipid biosynthesis. *Ann. Rev. Biochem.* **64**:315-543.
- Maxfield, F. R., and I. Tabas. 2005. Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature* **438**:612-621.
- Stahl, A., R. E. Gimeno, L. A. Tartaglia, and H. F. Lodish. 2001. Fatty acid transport proteins: a current view of a growing family. *Trends Endocrinol. Metab.* **12**(6):266-273.
- van Meer, G., and H. Sprong. 2004. Membrane lipids and vesicular traffic. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**:373-378.



Vista desde el interior de la proteína acuaporina bacteriana, que transporta agua y glicerol hacia el interior y el exterior de la célula, embebida en una membrana de fosfolípidos. Los cuatro monómeros idénticos están coloreados individualmente; cada uno tiene un canal central. (Tomado de M. O. Jensen y cols., 2002, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* **99**:6731-6736).

Transporte de iones y moléculas pequeñas a través de la membrana

En todas las células, la membrana plasmática forma la barrera de permeabilidad que separa el citoplasma del ambiente exterior, lo que define los límites físicos y químicos de la célula. Al evitar el movimiento sin obstáculos de los iones y moléculas hacia el interior y desde el exterior de las células, la membrana plasmática mantiene diferencias esenciales en la composición del líquido extracelular y del citosol; por ejemplo, la concentración de NaCl en la sangre y los líquidos extracelulares de los animales, por lo general, supera los 150 mM, similar a la del agua del mar en la cual –se cree– todas las células han evolucionado, mientras que la concentración de Na⁺ en el citosol es diez veces más baja. Por el contrario, la concentración del ion potasio (K⁺) es más alta en el citosol que en el exterior.

Las membranas de los orgánulos, que separan el citosol del interior de éstos, también forman barreras de permeabilidad. Por ejemplo, la concentración protónica dentro de los lisosomas, pH 5, es aproximadamente 100 veces superior a la del citosol, y se acumulan muchos metabolitos específicos a concentraciones más elevadas en

el interior de otros orgánulos, como el retículo endoplasmático o el complejo de Golgi, que en el citosol.

Todas las membranas celulares, tanto las plasmáticas como las de los orgánulos, consisten en una bicapa de fosfolípidos en la cual están embebidos otros lípidos y tipos específicos de proteínas. Es esta combinación de lípidos y proteínas la que les confiere a las membranas celulares sus cualidades características de permeabilidad. Si las membranas celulares fueran bicapas de fosfolípidos puros (véase la Fig. 10-4), serían excelentes barreras químicas, impermeables a casi todos los iones, aminoácidos, azúcares y otras moléculas hidrosolubles. De hecho, solo algunos gases y moléculas hidrosolubles pequeñas, no cargadas, pueden difundir fácilmente a través de una bicapa de fosfolípidos puros (Fig. 11-1). Sin embargo, las membranas celulares no solo deben actuar como barreras sino también como conductos, transportando de modo selectivo moléculas e iones de un lado de la membrana al otro. La glucosa rica en energía, por ejemplo, debe ser importada a la célula, y los desechos deben ser eliminados.

CONTENIDO

11.1 Generalidades del transporte transmembrana	474
11.2 Transporte facilitado de glucosa y agua	477
11.3 Bombas impulsadas por ATP y ambiente iónico intracelular	483

11.4 Canales iónicos sin compuerta y potencial de membrana en reposo	495
11.5 Cotransporte por simportadores y antiportadores	502
11.6 Transporte transcelular	508

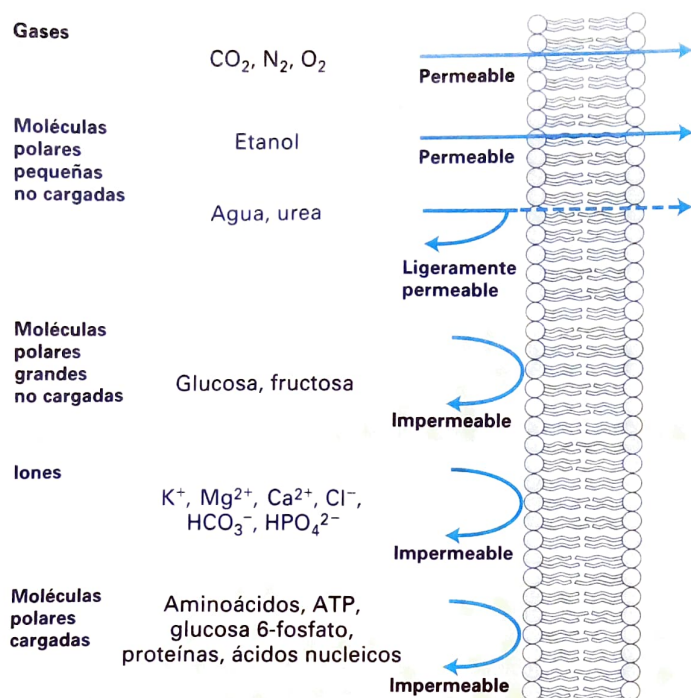


Figura 11-1 Permeabilidad relativa de una bicapa fosfolipídica pura a varios iones y moléculas. Una bicapa es permeable a muchos gases y a moléculas pequeñas, sin carga, hidrosolubles (polares). Es ligeramente permeable al agua y esencialmente impermeable a los iones y moléculas polares grandes.

El movimiento de casi todos los iones y moléculas pequeñas a través de las membranas celulares está mediado por **proteínas de transporte de membrana** (proteínas integrales de la membrana embebidas en múltiples dominios transmembrana en las membranas celulares). Estas proteínas que se insertan en la membrana actúan de diversas maneras, como transportadores, canales o bombas para transportar moléculas o iones a través del interior hidrofóbico de la membrana. En ciertas ocasiones, los iones o moléculas son transportados de una concentración más alta a una más baja, en un proceso favorecido termodinámicamente, impulsado por un incremento de la entropía. Ejemplos de ello son el transporte de agua o glucosa, desde la sangre hasta la mayoría de las células del organismo. En otros casos, las moléculas o los iones deben ser bombeados de una concentración más baja a una más alta, un proceso desfavorable termodinámicamente que solo puede producirse cuando hay una fuente de energía externa disponible para empujar las moléculas “cuesta arriba” contra un gradiente de concentración. Un ejemplo es la capacidad de la célula para concentrar protones en el interior de los lisosomas con el fin de generar un pH bajo en la luz. Con frecuencia, la energía necesaria es proporcionada mecánicamente acoplando la hidrólisis liberadora de energía del enlace fosfoanhidrido terminal del ATP con el movimiento de una molécula o de un ion a través de la membrana. Otras proteínas acoplan el movimiento de una molécula o de un ion contra su gradiente de concentración con el movimiento de otro a favor de su gradiente, empleando la energía liberada por el movimiento cuesta abajo de una molécula o de un ion, con el impulso termodinámico del movimiento cuesta arriba de otro. El adecuado funcionamiento de cualquier célula radica en el preciso equilibrio entre esta importación y exportación de varios iones y moléculas.

Comenzamos nuestro análisis de las proteínas de transporte de membrana revisando algunos de los principios generales de transporte a través de la membrana y distinguiendo entre tres clases principales de estas proteínas. En las secciones siguientes, describimos la estructura y los ejemplos específicos de cada clase; asimismo, mostramos de qué modo los miembros de las familias de proteínas homólogas de transporte tienen propiedades diferentes que les permiten a diversos tipos celulares operar adecuadamente. Explicamos también de qué modo tanto la membrana plasmática como las de los orgánulos contienen combinaciones específicas de proteínas de transporte que les permiten a las células llevar a cabo procesos fisiológicos esenciales, que incluyen el mantenimiento del pH citosólico, la acumulación de sacarosa y sales en las vacuolas de las células vegetales y el flujo direccional de agua, tanto en los vegetales como en los animales. El potencial de la membrana en reposo es una consecuencia importante del transporte iónico selectivo a través de las membranas, y analizamos el modo en el que surge este potencial. Las células epiteliales, como las que tapizan el intestino delgado, emplean una combinación de proteínas de membrana para transportar iones, azúcares, otras pequeñas moléculas y agua desde un lado de la célula hacia el otro. Veremos cómo la comprensión de estos procesos condujo al desarrollo de las bebidas deportivas, así como a los nuevos tratamientos para el cólera.

Nótese que en este capítulo abarcamos solo el transporte de pequeñas moléculas e iones; el transporte de moléculas de mayor tamaño, como proteínas y oligosacáridos, se trata en los **Capítulos 13 y 14**.

11.1 Generalidades del transporte transmembrana

En esta sección, describimos, en primer término, los factores que ejercen influencia en la permeabilidad de las membranas lipídicas; luego, describimos brevemente las tres clases principales de proteínas de transporte de membrana que permiten que las moléculas y los iones las atraviesen. Los diferentes tipos de proteínas embebidas en la membrana llevan a cabo la tarea de movilizar iones y moléculas en diferentes formas.

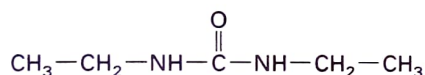
Sólo los gases y las pequeñas moléculas sin carga atraviesan las membranas por difusión simple

Con su núcleo hidrofóbico denso, una bicapa de fosfolípidos es —en gran medida— impermeable a los iones y las moléculas hidrosolubles. Solo los gases, como el O_2 y el CO_2 , y las pequeñas moléculas polares sin carga, como la urea y el etanol, pueden moverse con facilidad por **difusión simple** a través de una membrana artificial compuesta por fosfolípidos puros o fosfolípidos y colesterol (véase la **Fig. 11-1**). Las moléculas de este tipo también pueden difundir a través de las membranas celulares sin la ayuda de las proteínas de transporte. No se requiere gasto de energía metabólica porque el movimiento es desde una región de alta concentración de la molécula a una de baja concentración, a favor de su gradiente de concentración química. Como se vio en el **Capítulo 2**, estos movimientos son espontáneos porque tienen un valor ΔS positivo (incremento de la entropía) y, por lo tanto, un valor ΔG negativo (disminución de la energía libre).

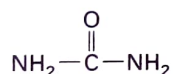
La tasa de difusión relativa de cualquier sustancia, a través de una bicapa de fosfolípidos puros, es proporcional a su gradiente de concentración a través de la bicapa, a su hidrofobicidad y tamaño; el mo-

movimiento de moléculas cargadas también se ve afectado por cualquier potencial eléctrico a través de la membrana. Cuando una bicapa de fosfolípidos pura separa dos espacios acuosos, o “compartimientos”, la permeabilidad de la membrana puede determinarse fácilmente añadiendo una pequeña cantidad de material radiactivo a un compartimiento y midiendo su velocidad de aparición en el otro. Cuanto mayor sea el gradiente de concentración de la sustancia, más rápida será su velocidad de movimiento a través de la bicapa.

La hidrofobicidad de una sustancia se determina midiendo el coeficiente de partición K , la constante de equilibrio para su partición entre el agua y el aceite. Cuanto mayor sea el coeficiente de partición de una sustancia (la mayor fracción encontrada en el aceite en relación con el agua), mayor será la solubilidad en lípidos y, por lo tanto, más rápida su velocidad de movimiento a través de la bicapa. El primer paso, y el que resulta limitante de la velocidad en el transporte por difusión simple, es el movimiento de una molécula desde la solución acuosa hacia el interior hidrofóbico de la bicapa fosfolipídica, que se parece al aceite en sus propiedades químicas. Esta es la razón por la cual cuanto más hidrofóbica es una molécula, más rápido difunde a través de una bicapa fosfolipídica pura. Por ejemplo, la dietilurea, con un grupo etilo unido a cada átomo de nitrógeno:



tiene una K de 0,01, mientras que la urea



tiene una K de 0,0002. La dietilurea, que es 50 veces (0,01/0,0002) más hidrofóbica que la urea, difundirá a través de membranas que son bicapas de fosfolípidos aproximadamente 50 veces más rápido que la urea. De modo similar, los ácidos grasos con cadenas hidrocarbonadas más largas son más hidrofóbicos que los que tienen cadenas más cortas y a todas las concentraciones difundirán con más rapidez, a través de una bicapa fosfolipídica pura.

Si una sustancia lleva una carga neta, su movimiento a través de la membrana se verá afectado tanto por su gradiente de concentración como por el **potencial de membrana**, el potencial eléctrico (voltaje) a través de la membrana. La combinación de estas dos fuerzas, denominada **gradiente electroquímico**, determina la dirección energéticamente favorable del movimiento de una molécula cargada a través de una membrana. El potencial eléctrico que existe a través de la mayoría de las membranas celulares es el resultado de un pequeño desequilibrio en la concentración de iones con carga positiva y negativa, a ambos lados de la membrana. En las Secciones 11.4 y 11.5, analizaremos el modo en el que surgen y se mantienen este desequilibrio iónico y el potencial resultante.

Tres clases principales de proteínas de membrana transportan los iones y las moléculas a través de las biomembranas

Como resulta evidente en la Figura 11-1, muy pocas moléculas y ningún ion pueden atravesar una bicapa fosfolipídica pura, a velocidades apreciables, por difusión simple. Así, el transporte de la mayoría de las moléculas hacia el interior y el exterior de las células requiere la asistencia de proteínas de membrana especializadas. Aun en el caso de moléculas con coeficientes de partición relativamente grandes (p. ej., urea, ácidos grasos) y ciertos gases, como el CO_2 (dióxido de carbono) y el NH_3 (amoníaco), el transporte, con frecuencia, es acelerado por proteínas específicas porque, a menudo, la difusión simple no se produce con la rapidez suficiente como para satisfacer las necesidades celulares.

Todas las proteínas de transporte son proteínas transmembrana que contienen múltiples segmentos que se expanden en la membrana; éstos son, por lo general, hélices α . Se cree que, al formar vías tapizadas por proteínas a través de la membrana, las proteínas de transporte permiten el movimiento de sustancias hidrofílicas sin que éstas entren en contacto con el interior hidrofóbico de la membrana. Aquí presentamos los tres tipos principales de proteínas de transporte de la membrana tratados en este capítulo (Fig. 11-2).

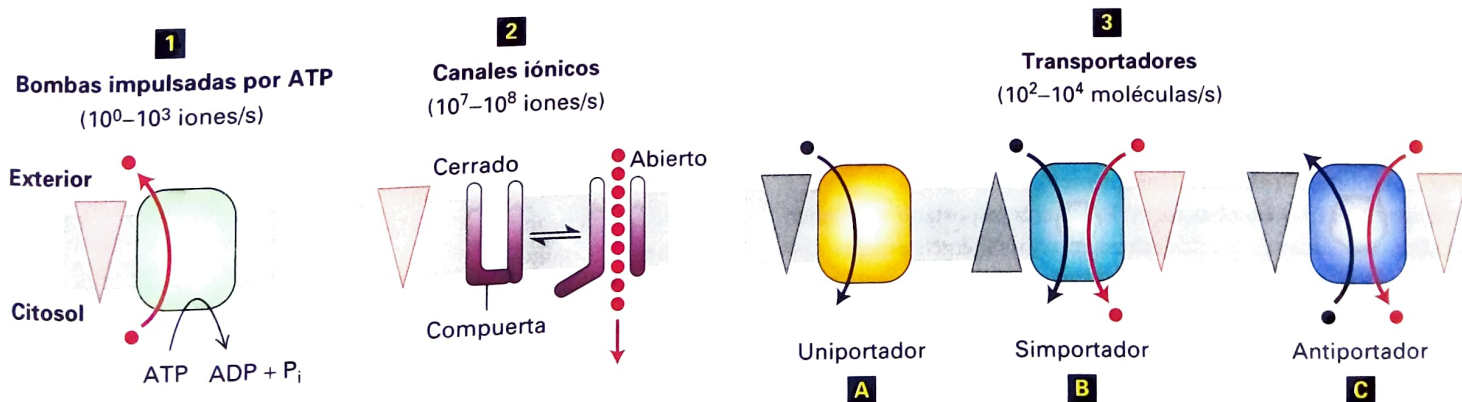


Figura 11-2 Panorama general de las proteínas de transporte de la membrana. Los gradientes están indicados por triángulos cuyos vértices se dirigen hacia la zona de menor concentración, menor potencial eléctrico o ambos. **1** Las bombas emplean la energía liberada por la hidrólisis del ATP para impulsar el transporte de los iones y moléculas (círculos rojos) en contra de su gradiente electroquímico. **2** Los canales permiten el movimiento de iones (o agua) a favor de su gradiente electroquímico. **3** Los transportadores que se encuentran dentro de los tres grupos facilitan el movimiento

de pequeñas moléculas específicas o iones. Los uniportadores transportan un solo tipo de molécula a favor de su gradiente de concentración. **3A** Las proteínas cotransportadoras (simportadores, **3B**, y antiportadores, **3C**) catalizan el movimiento de una molécula en contra de su gradiente de concentración (círculos negros), impulsada por el movimiento de uno o más iones a favor de un gradiente electroquímico (círculos rojos). Las diferencias en los mecanismos de transporte para estas tres clases principales de proteínas dan cuenta de sus diferentes velocidades de movimiento del soluto.

Las **bombas impulsadas por ATP** (o simplemente bombas) son **ATPasas** que emplean la energía de la hidrólisis del ATP para mover iones o moléculas pequeñas a través de una membrana en *contra* de un gradiente de concentración química, un potencial eléctrico o ambos. Este proceso, conocido como **transporte activo**, es un ejemplo de reacción química pequeña “cuesta arriba”, en contra de un gradiente de iones o moléculas pequeñas, que requiere energía, está acoplado a la hidrólisis de ATP, que libera energía. La reacción total –la hidrólisis de ATP y el movimiento “cuesta arriba” de iones o moléculas pequeñas– es energéticamente favorable.

Los **canales** transportan agua, iones específicos o moléculas hidrofílicas pequeñas a través de las membranas *a favor* de sus gradientes de concentración o de potencial eléctrico. Como este proceso requiere proteínas de transporte pero no energía, en ciertas ocasiones se lo conoce como “transporte pasivo” o “difusión facilitada”, aunque se lo designa más adecuadamente como **transporte facilitado**. Los canales forman un “tubo” hidrofílico o pasaje a través de la membrana, por medio del cual se mueven simultáneamente múltiples iones o moléculas de agua, en fila india, a una alta velocidad. Algunos canales permanecen abiertos la mayor parte del tiempo; éstos se conocen como canales *sin compuerta*. La mayoría de los canales iónicos, sin embargo, se abren solo en respuesta a señales químicas o eléctricas específicas. Éstos se conocen como canales *con compuerta* porque una “compuerta” proteica, alternativamente, bloquea el canal o libera el camino para abrirlo (véase la Fig. 11-2). Los canales, como todas las proteínas de transporte, son muy selectivos para el tipo de molécula que transportan.

Los **transportadores** (denominados también acarreadores) movilizan una gran variedad de iones y moléculas a través de las membranas celulares, pero a una velocidad mucho más lenta que los canales. Se han identificado tres tipos de transportadores. Los **uniportadores** transportan un solo tipo de molécula *a favor* de su gradiente de concentración. La glucosa y los aminoácidos atraviesan la membrana plasmática, en la mayoría de las células de mamífero, con la ayuda de uniportadores. Colectivamente, los canales y los uniportadores, a veces, son llamados **transportadores facilitados**, lo que indica el movimiento a favor de un gradiente de concentración o electroquímico.

Por el contrario, los **antiportadores** y los **simportadores** acoplan el movimiento de un tipo de ion o molécula en *contra* de su gradiente de concentración, con el movimiento de uno o más iones diferentes *a favor* de su gradiente de concentración en la misma (simportador) o diferente (antiportador) dirección. Estas proteínas, con frecuencia, se denominan **cotransportadores**, en referencia a su capacidad para transportar dos solutos o más simultáneamente.

Al igual que las bombas de ATP, los cotransportadores median reacciones acopladas en las cuales una reacción energéticamente desfavorable (el movimiento cuesta arriba de un tipo de ion o molécula) está acoplado a una reacción energéticamente favorable (el movimiento cuesta abajo de otra molécula). Nótese, sin embargo, que la naturaleza de la reacción que suministra energía e impulsa el transporte activo de estas dos clases de proteínas difiere. Las bombas de ATP emplean energía de la hidrólisis del ATP, mientras que los cotransportadores utilizan la energía almacenada en un gradiente electroquímico. Este último proceso, en ciertas ocasiones, se conoce como **transporte activo secundario**.

Los cambios de conformación son esenciales para la función de todas las proteínas de transporte. Las bombas impulsadas por ATP y los transportadores sufren un ciclo de cambios de conformación que

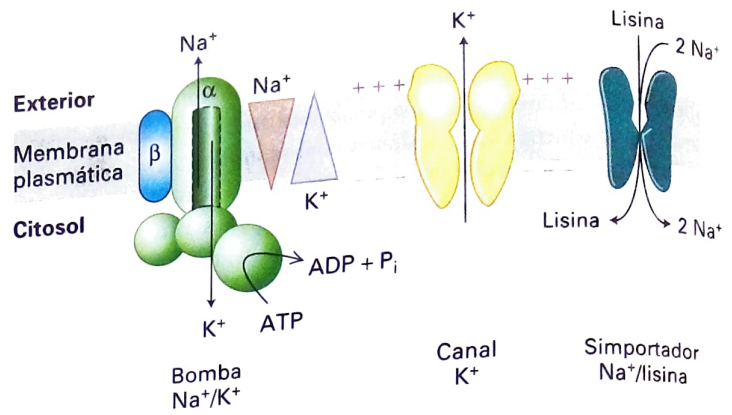


Figura 11-3 Las múltiples proteínas de transporte de la membrana operan en conjunto en la membrana plasmática de las células de los metazoarios. Los gradientes están indicados por triángulos cuyo vértice señala la concentración más baja. La ATPasa Na⁺/K⁺ de la membrana plasmática mueve la concentración más baja. La ATPasa Na⁺/K⁺ para bombear Na⁺ hacia el exterior de la célula y K⁺ hacia el interior; esto crea un gradiente de concentración de Na⁺ que es mayor en el exterior de la célula que dentro de ésta, y uno de K⁺ que es mayor dentro de la célula que en el exterior. El movimiento de los iones K⁺ cargados positivamente fuera de la célula, a través de proteínas canal, crea un potencial eléctrico a través de la membrana plasmática –la cara citosólica es negativa con respecto a la cara extracelular–. Un transportador Na⁺/lisina, un cotransportador típico sodio/aminoácido, moviliza dos iones Na⁺ junto con una lisina desde el medio extracelular hacia el interior de la célula. El movimiento “cuesta arriba” del aminoácido es impulsado por el movimiento “cuesta abajo” de los iones Na⁺, promovidos ambos por el gradiente de concentración exterior mayor que el interior de Na⁺ y por el potencial negativo en el interior de la membrana celular, que atrae los iones Na⁺ cargados positivamente. La fuente última de energía para impulsar la importación de aminoácidos proviene del ATP hidrolizado por la ATPasa Na⁺/K⁺, ya que esta bomba genera tanto el gradiente de concentración del ion Na⁺ como, a través de los canales K⁺, el potencial de membrana que, en conjunto, impulsa el influjo de iones Na⁺.

expone un sitio de unión (o sitios de unión) a un lado de la membrana en una conformación y al otro lado, en una segunda conformación. Puesto que cada ciclo de este tipo da como resultado el movimiento de solo una molécula (o unas pocas) de sustrato, estas proteínas están caracterizadas por velocidades relativamente bajas de transporte, entre 10⁰ y 10⁴ iones o moléculas por segundo (véase la Fig. 11-2). La mayoría de los canales iónicos fluctúan entre un estado cerrado y un estado abierto, pero muchos iones pueden pasar a través de un canal abierto sin ningún cambio de conformación posterior. Por esta razón, los canales se caracterizan por velocidades muy rápidas de transporte, hasta 10⁸ iones por segundo.

Con frecuencia, varios tipos distintos de proteínas de transporte trabajan de modo concertado para lograr una función fisiológica. Un ejemplo de ello se observa en la Figura 11-3, en la que una ATPasa bombea Na⁺ hacia el exterior de la célula e iones K⁺ hacia adentro; esta bomba, que se encuentra en casi todas las células de los metazoarios, establece gradientes de concentración en direcciones opuestas de iones Na⁺ y K⁺ a través de la membrana plasmática (concentraciones relativamente elevadas de K⁺ dentro de las células y Na⁺ fuera de éstas), que se emplean para impulsar la importación de los aminoácidos. El genoma humano codifica cientos de tipos distintos de proteínas de transporte que utilizan la energía almacenada a través de la membrana plasmática en el gradiente de concentración de Na⁺ y su potencial eléctrico asociado.

Cuadro 11-1**Mecanismo de transporte de iones y moléculas pequeñas a través de las membranas celulares**

Propiedad	Difusión simple	Transporte facilitado	Transporte activo	Cotransporte*
Requiere proteína específica	-	+	+	+
Soluto transportado en contra de su gradiente	-	-	+	+
Acoplado a la hidrólisis del ATP	-	-	+	-
Impulsado por el movimiento de un ion cotransportado a favor de su gradiente	-	-	-	+
Ejemplos de moléculas transportadas	O ₂ , CO ₂ , hormonas esteroides, numerosos fármacos	Glucosa y aminoácidos (uniportadores); iones y agua (canales)	Iones, pequeñas moléculas hidrofílicas, lípidos (bombas impulsadas por ATP)	Glucosa y aminoácidos (simportadores); varios iones y sacarosa (antiportadores)

* Denominado también *transporte activo secundario*.

do para transportar una amplia variedad de moléculas hacia el interior de las células en contra de sus gradientes de concentración.

El Cuadro 11-1 resume los cuatro mecanismos mediante los cuales los iones y las moléculas pequeñas son transportados a través de las membranas celulares. En la siguiente sección, consideraremos algunas de las proteínas de transporte de membrana más simples, las causantes del transporte de glucosa y agua.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 11.1

Generalidades del transporte transmembrana

- Las membranas celulares regulan el tránsito de moléculas y de iones hacia el interior y el exterior de las células y sus orgánulos. La velocidad de la difusión simple de una sustancia a través de una membrana es proporcional a su gradiente de concentración y su hidrofobicidad.
- Con excepción de los gases (p. ej., O₂ y CO₂) y las moléculas hidrosolubles pequeñas, sin carga, la mayoría de las moléculas no pueden difundir a través de una bicapa fosfolipídica pura a velocidades suficientes como para satisfacer las necesidades celulares.
- Las proteínas de transporte de la membrana proporcionan un paso hidrofílico para que las moléculas y los iones se desplacen a través del interior hidrofóbico de una membrana.
- Tres clases de proteínas transmembrana median el transporte de iones, azúcares, aminoácidos y otros metabolitos a través de las membranas celulares: bombas impulsadas por ATP, canales y transportadores (véase la Fig. 11-2).
- Las bombas impulsadas por ATP acoplan el movimiento de un sustrato en *contra* de su gradiente de concentración a la hidrólisis de ATP, un proceso conocido como transporte activo.

• Los canales forman un “tubo” hidrofílico a través del cual se movilizan los iones o el agua *a favor* de un gradiente de concentración, un proceso conocido como transporte facilitado o difusión facilitada.

• Los transportadores se encuentran dentro de tres grupos: los uniportadores transportan una molécula a favor de su gradiente de concentración (transporte facilitado), los simportadores y antiportadores acoplan el movimiento de un sustrato en contra de su gradiente de concentración al movimiento de un segundo sustrato a favor de su gradiente de concentración, un proceso conocido como transporte activo secundario o cotransporte (véase el Cuadro 11-1).

• Los cambios de conformación son esenciales para la función de todas las proteínas de transporte de membrana; la velocidad del transporte depende del número de sustratos que pueden pasar a través de una proteína a la vez.

11.2 Transporte facilitado de glucosa y agua

La mayoría de las células animales emplean glucosa como sustrato para la producción de ATP; habitualmente, utilizan un uniportador de glucosa para captarla desde la sangre u otro líquido extracelular. Muchas células emplean proteínas de transporte de membrana del tipo de los canales, denominadas acuaporinas, para incrementar la velocidad del movimiento de agua a través de sus membranas de superficie. Aquí, analizamos la estructura y función de éstos y otros transportadores facilitados.

El transporte con uniportador es más rápido y más específico que la difusión simple

El transporte mediado por proteína de un solo tipo de molécula, como la glucosa u otras moléculas hidrofílicas pequeñas, a favor de un gradiente de concentración a través de una membrana celular es conocido

como uniporte. Varias características distinguen el **uniporte** de la difusión simple:

1. La velocidad de movimiento del sustrato por los uniportadores es mucho más alta que por difusión simple a través de una bicapa fosfolipídica pura.
2. Puesto que la molécula transportada nunca ingresa en el núcleo hidrofóbico de la bicapa fosfolipídica, su coeficiente de partición K es irrelevante.
3. El transporte se produce a través de un número limitado de moléculas uniportadoras. En consecuencia, hay una velocidad de transporte máxima $V_{\max}$ que depende del número de uniportadores en la membrana. La $V_{\max}$ se alcanza cuando el gradiente de concentración a través de la membrana es muy grande y cada uniportador está operando a su velocidad máxima.
4. El transporte es reversible, y la dirección de éste cambiará si la dirección del gradiente de concentración lo hace.
5. El transporte es específico. Cada uniportador transporta solamente un tipo de molécula o un grupo único de moléculas muy relacionadas. Una medida de la afinidad de un transportador por su sustrato es la K_m , que es la concentración de sustrato a la cual el transporte es semimáxima.

Estas propiedades también se aplican al transporte mediado por las otras clases de proteínas que se muestran en la Figura 11-2.

Uno de los uniportadores mejor conocidos es el transportador de glucosa denominado **GLUT1**, que se encuentra en la membrana plasmática de la mayoría de las células de mamífero. El GLUT1 es especialmente abundante en la membrana plasmática de los eritrocitos. Como estas células tienen una membrana simple y carecen de núcleo u otros orgánulos internos (véase la Fig. 10-7a), las propiedades de la GLUT1 y de muchas otras proteínas transportadoras de los eritrocitos maduros se han estudiado ampliamente. La estructura simplificada de estas células hace que el aislamiento y la purificación de una proteína de transporte sea un procedimiento relativamente sencillo.

La Figura 11-4 muestra que la captación de glucosa por los eritrocitos y los hepatocitos exhibe una cinética similar a la de una reacción simple, catalizada por enzima que implique un único sustrato. La cinética de las reacciones de transporte mediadas por otros tipos de proteínas es más compleja que las de los uniportadores. Sin embargo, todas las reacciones de transporte asistidas (facilitadas) por proteínas producen más rápido que la difusión simple a través de la bicapa, son específicas para el sustrato y exhiben una velocidad máxima ($V_{\max}$).

La baja K_m del uniportador GLUT1 permite que se transporte la glucosa hacia el interior de la mayoría de las células de mamífero

Al igual que otros uniportadores, la GLUT1 alterna entre dos estados conformacionales: en uno de ellos, un sitio de unión a la glucosa enfrenta el exterior de la célula; en el otro, un sitio de unión a la glucosa enfrenta el citosol. Puesto que la concentración de glucosa habitualmente es más alta en el medio extracelular (sangre, en el caso de los

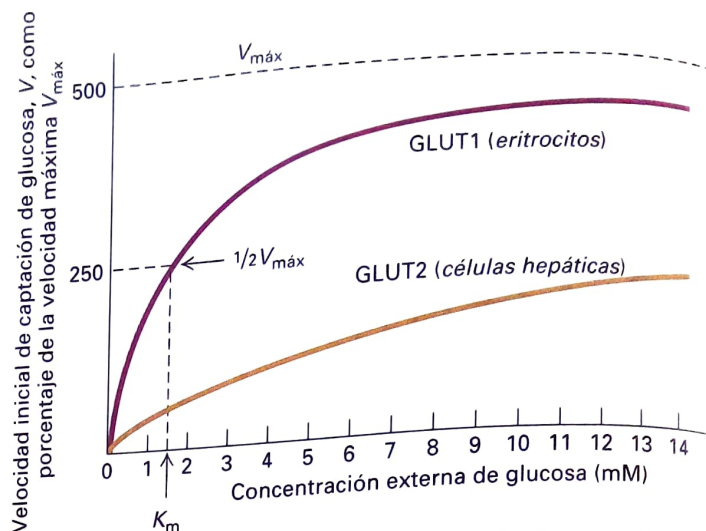


FIGURA EXPERIMENTAL 11-4 La captación celular de glucosa mediada

por las proteínas GLUT muestra una cinética enzimática simple. La velocidad inicial de captación de glucosa, v (medida en micromoles por mililitro de células por hora), en los primeros segundos se representa como un porcentaje de la velocidad máxima $V_{\max}$ en contra de una concentración creciente de glucosa en el medio extracelular. En este experimento, la concentración inicial de glucosa en las células siempre es 0. Tanto la GLUT1, expresada por los eritrocitos, como la GLUT2, expresada por las células hepáticas, catalizan la captación de la glucosa (curvas color borgoña y canela). Al igual que las reacciones catalizadas por las enzimas, la captación de glucosa facilitada por la GLUT exhibe una velocidad máxima ($V_{\max}$). La K_m es la concentración a la cual la velocidad de captación de glucosa es semimáxima. La GLUT2, con una K_m de aproximadamente 20 mM (que no se muestra) tiene una afinidad mucho menor por la glucosa que la GLUT1, con una K_m de aproximadamente 1,5 mM.

eritrocitos) que en la célula, el uniportador GLUT1, en general, cataliza la importación neta de glucosa desde el medio extracelular hacia el interior de la célula. La Figura 11-5 muestra la secuencia de eventos que ocurren durante el transporte unidireccional de glucosa desde el exterior celular hacia el interior del citosol. La GLUT1 también puede catalizar la exportación de glucosa del citosol al medio extracelular, cuando la concentración de glucosa es más alta dentro de la célula que fuera de ésta.

La cinética del transporte unidireccional de glucosa desde el exterior de una célula hacia el interior, por medio de la GLUT1, puede ser descrita por el mismo tipo de ecuación empleada para describir una reacción química simple catalizada por enzimas. Para simplificar, supongamos que el sustrato glucosa, S , está presente inicialmente solo en el exterior de la célula; esto puede lograrse mediante la incubación inicial de las células en un medio que carezca de glucosa, de modo tal que sus depósitos internos estén vacíos. En este caso, podemos escribir



donde $S_{\text{ext}} - \text{GLUT1}$ representa GLUT1 en la conformación que mira al exterior, con una glucosa unida. Esta ecuación es similar a la que describe la vía por la cual una reacción simple es catalizada por una enzima, en la que la proteína se une a un sustrato único y luego lo transforma en una molécula diferente. Aquí, sin embargo, no hay una modificación química en el azúcar unido al GLUT1; en lugar de ello, esta molécula se mueve a través de una membrana celular. Sin embargo, la cinética de esta reacción de transporte es similar a la de la reacción sim-

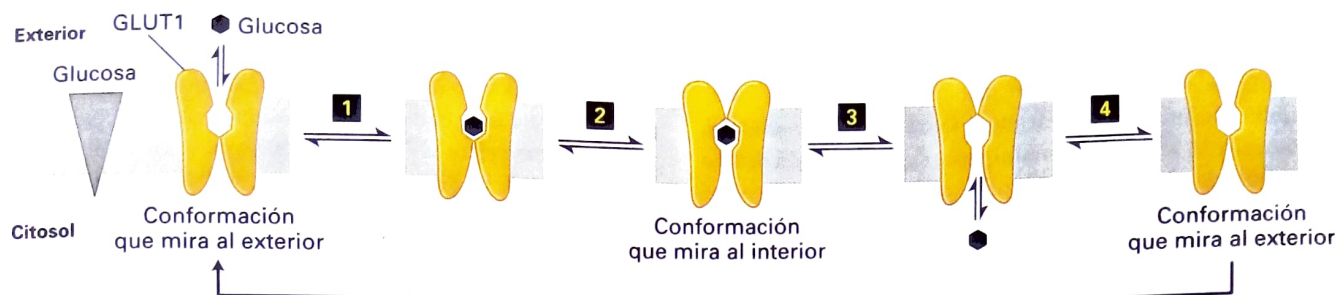


Figura 11-5 Modelo del transporte uniporte por la GLUT1. En una conformación, el sitio de unión a la glucosa enfrenta el exterior; en la otra, el sitio de unión enfrenta el interior. La unión de la glucosa al sitio que enfrenta el exterior (paso **1**) desencadena un cambio de conformación en el transportador, de modo tal que el sitio de unión enfrenta ahora el interior del citosol (paso **2**). Después, la glucosa es liberada hacia el interior de la célula (paso **3**). Finalmen-

te, el transportador sufre el cambio de conformación inverso, y se regenera el sitio de unión que enfrenta el exterior (paso **4**). Si la concentración de glucosa es más elevada en el interior de la célula que en el exterior, el ciclo operará en sentido inverso (paso **4** → paso **1**), lo que dará como resultado el movimiento neto de glucosa hacia el exterior de la célula. Los cambios de conformación reales probablemente sean más pequeños que los que se ilustran aquí.

ple catalizada por enzima, y podemos utilizar la misma derivación que la de la ecuación de Michaelis-Menten —en el Capítulo 3— para derivar la siguiente expresión para v_0 , la velocidad inicial de transporte para S hacia el interior de la célula, catalizada por GLUT1:

$$v_0 = \frac{V_{\max}}{1 + \frac{K_m}{C}} \quad (11-1)$$

donde C es la concentración de S_{ext} (inicialmente, la concentración de $S_{\text{int}} = 0$). $V_{\max}$, la velocidad de transporte cuando todas las moléculas de GLUT1 contienen una S unida; esto se produce a una concentración infinitamente alta de S_{ext} . Cuanto más bajo es el valor de K_m , más estrechamente se une el sustrato al transportador. La Ecuación 11-1 describe la curva para la captación de glucosa por parte de los eritrocitos, que se muestra en la Figura 11-4, así como las curvas similares para otros uniportadores.

Para la GLUT1 de la membrana de los eritrocitos humanos, la K_m para el transporte de glucosa es 1,5 mM. Así, cuando la concentración de glucosa extracelular es 1,5 mM, aproximadamente la mitad de los transportadores GLUT1 con sitios de unión que enfrentan el exterior tendrán una glucosa unida y el transporte se producirá al 50 por ciento de la velocidad máxima. Como la glucosa sanguínea normalmente es 5mM, el transportador de glucosa de los eritrocitos habitualmente está funcionando al 77 por ciento de su velocidad máxima, como puede observarse en la Ecuación 11-1. El transportador GLUT1 (o el transportador de glucosa muy semejante, GLUT3) se expresa en todas las células del organismo que necesitan captar glucosa de la sangre, de manera continua, a altas velocidades; la velocidad de captación de glucosa por parte de estas células permanecerá elevada, independientemente de los pequeños cambios que se produzcan en la concentración de la glucosa sanguínea, ya que la concentración intracelular de glucosa se mantiene alta que la K_m , y la concentración intracelular de glucosa se mantiene baja debido al metabolismo.

Además de la glucosa, los azúcares isoméricos D-manosa y D-galactosa, que difieren en su configuración de la D-glucosa en solo un átomo de carbono, son transportados por la GLUT1 a velocidades medibles. Sin embargo, la K_m para la glucosa (1,5 mM) es mucho más baja que para la D-manosa (20 mM) o la D-galactosa (30 mM). De este modo, la GLUT1 es bastante específica, con una afinidad mucho más elevada (indicada por una K_m más baja) para el sustrato normal D-glucosa que para otros sustratos.

La GLUT1 da cuenta del 2 por ciento de la proteína en la membrana plasmática de los eritrocitos. Después de que la glucosa se ha transportado hacia el interior del eritrocito, se fosforila rápidamente y forma glucosa 6-fosfato, que no puede salir de la célula. A raíz de esta reacción, el primer paso en el metabolismo de la glucosa (véase la Fig. 12-3) es rápido y se produce a una velocidad constante, la concentración intracelular de glucosa se mantiene baja aun cuando ésta se importe desde el medio extracelular. En consecuencia, el gradiente de concentración de glucosa (en el exterior, mayor que el interior celular) se mantiene lo suficientemente elevado como para sostener la importación continua y rápida de moléculas adicionales de glucosa y aportar suficiente glucosa para el metabolismo celular.

El genoma humano codifica una familia de proteínas GLUT transportadoras de azúcares

El genoma humano codifica al menos 14 proteínas GLUT con elevada homología, GLUT1-GLUT14; se cree que todas éstas contienen 12 hélices α que se extienden en la membrana, lo que sugiere que han evolucionado de una sola proteína de transporte ancestral. Aunque no contamos con la estructura tridimensional de ninguna proteína GLUT, los estudios bioquímicos detallados de la GLUT1 han mostrado que los residuos de aminoácidos de las hélices α que atraviesan la membrana son predominantemente hidrofóbicos; sin embargo, varias hélices tienen residuos de aminoácidos (p. ej., serina, treonina, asparagina y glutamina) cuyas cadenas laterales pueden formar puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilos de la glucosa. Se considera que estos residuos forman los sitios de unión de glucosa que enfrentan el interior y el exterior, dentro de la proteína (véase la Fig. 11-5).

Se cree que las estructuras de todas las isoformas de GLUT son bastante similares, y todas transportan azúcares. Sin embargo, su expresión diferencial en varios tipos de células, la regulación del número de transportadores GLUT en las superficies celulares y sus propiedades funcionales específicas posibilitan que diferentes células del cuerpo regulen el metabolismo de la glucosa de modo diferencial y, al mismo tiempo, permiten que se mantenga una concentración constante de glucosa en la sangre. Por ejemplo, la GLUT3 se encuentra en las neuronas del encéfalo. Las neuronas dependen de un influjo constante de glucosa para su metabolismo, y la baja K_m de la GLUT3 por la glucosa ($K_m = 1,5$ mM), al igual que la de la GLUT1, asegura que estas células

incorporen glucosa desde los líquidos extracelulares del encéfalo a una velocidad alta y constante.

La GLUT2, que se expresa en los hepatocitos y las células β secretoras de insulina de los islotes pancreáticos, tiene una K_m de ~ 20 mM, aproximadamente 13 veces más elevada que la K_m de la GLUT1. Como resultado, cuando la glucosa de la sangre se eleva, después de una comida, de su nivel basal de 5 mM a 10 mM aproximadamente, la velocidad de flujo de la glucosa casi se duplica en las células que expresan GLUT2, mientras que se incrementa solo levemente en las células que expresan GLUT1 (véase la Fig. 11-4). En el hígado, el “exceso” de glucosa que se introduce en las células se almacena como el polímero glucógeno. En las células β de los islotes, el aumento de la glucosa desencadena la secreción de la hormona insulina (véase la Fig. 16-38) que, a su vez, hace disminuir la glucosa sanguínea al incrementar la captación de glucosa y su metabolismo en el músculo, y al inhibir la producción de glucosa hepática (véase la Fig. 15-38). De hecho, la inactivación de la GLUT2 en las células pancreáticas β evita la secreción de insulina estimulada por glucosa y, en los hepatocitos (células hepáticas), interrumpe la expresión regulada de los genes sensibles a la glucosa.

Otra isoforma de GLUT, la GLUT4, se expresa solo en las células musculares y grasas, las que responden a la insulina al incrementar su captación de glucosa y la movilizan de la sangre. En ausencia de insulina, la GLUT4 se encuentra en las membranas intracelulares, y no en la membrana plasmática, y es incapaz de facilitar la captación de glucosa desde el líquido extracelular. Mediante un proceso detallado en la Figura 16-39, la insulina hace que estas membranas internas, ricas en GLUT4, se fusionen con la membrana plasmática, lo que incrementa el número de moléculas GLUT4 presentes en la superficie celular y, de este modo, aumenta la velocidad de captación de glucosa. Este es uno de los principales mecanismos por los cuales la insulina provoca un descenso de la glucemia; los defectos en el movimiento de la GLUT4 hacia la membrana plasmática constituyen una de las causas de la diabetes de aparición en la edad adulta o tipo II, una enfermedad caracterizada por la presencia de glucosa elevada, de manera continua, en la sangre.

La GLUT5 es la única proteína GLUT con elevada especificidad (preferencia) por la fructosa; su principal sitio de expresión es la membrana apical de las células epiteliales del intestino, donde transportan la fructosa de la dieta desde la luz del intestino hacia el interior de las células.

Las proteínas de transporte pueden estudiarse empleando membranas artificiales y células recombinantes

Hay una diversidad de enfoques para estudiar las propiedades intrínsecas de las proteínas de transporte, tales como definir los parámetros $V_{\max}$ y K_m e identificar los residuos clave causantes de la unión. La mayoría de las membranas celulares contienen muchos tipos diferentes de proteínas de transporte, pero una concentración relativamente baja de un tipo particular; esto dificulta los estudios funcionales de una proteína individual. Para posibilitar los estudios de este tipo, los investigadores emplean dos enfoques destinados a enriquecer una proteína de transporte de interés, de modo tal que predomine en la membrana: la purificación y la reconstitución en membranas artificiales y la sobreexpresión en células recombinantes.

Según el primer enfoque, una proteína de transporte específica se extrae de su membrana con un detergente y se la purifica. Si bien las proteínas de transporte pueden aislarse de las membranas y purificarse,

sus propiedades funcionales (su papel en el movimiento de sustratos a través de las membranas) puede ser estudiado solo cuando están asociadas con una membrana. Así, la proteína purificada habitualmente se reincorpora a membranas que son bicapas fosfolipídicas puras, como los liposomas (véase la Fig. 10-3), a través de las cuales el transporte del sustrato puede medirse fácilmente. Las membranas de los eritrocitos son buenas fuentes de GLUT1. Otras son las células recombinantes cultivadas de mamífero, que expresan el transgén GLUT1; con frecuencia, una expresa una GLUT1 modificada que contiene una etiqueta epítipo (una porción de una molécula a la cual puede unirse un anticuerpo (una porción de una molécula a la cual puede unirse un anticuerpo (una porción de una molécula a la cual puede unirse un anticuerpo (una porción de una molécula a la cual puede unirse un anticuerpo) fusionado a un extremo N-terminal o C-terminal. Todas las proteínas integrales, en cualquiera de estos dos tipos de células, pueden ser solubilizadas por un detergente no iónico, como el octilglucósido. El uniportador de glucosa GLUT1 puede ser purificado a partir de la mezcla solubilizada por cromatografía de afinidad con anticuerpo (Cap. 3), en una columna que contenga un anticuerpo monoclonal específico contra GLUT1 o un anticuerpo específico para el epítipo etiqueta y luego se incorpore a los liposomas constituidos por fosfolípidos puros.

De modo alternativo, el gen que codifica una proteína transportadora específica puede expresarse a altos niveles en un tipo celular que normalmente no lo expresa. La diferencia en el transporte de una sustancia por las células transfectadas y las células control no transfectadas se deberá a la proteína de transporte expresada. En estos sistemas, las propiedades funcionales de las diversas proteínas de membrana pueden examinarse sin la ambigüedad provocada, por ejemplo, por la desnaturalización parcial de las proteínas durante los procedimientos de aislamiento y purificación. Por ejemplo, la sobreexpresión de GLUT1 en las líneas de fibroblastos cultivados incrementa varias veces su velocidad de captación de glucosa, y la expresión de las proteínas GLUT1 mutantes con alteraciones en aminoácidos específicos puede identificar residuos importantes para la unión al sustrato.

La presión osmótica provoca el movimiento de agua a través de las membranas

El movimiento de agua hacia el interior y el exterior de las células es una característica importante de la vida de los microorganismos, los vegetales y los animales. Las **acuaporinas** constituyen una familia de proteínas de membrana que permiten que el agua y otras pocas moléculas pequeñas sin carga, como el glicerol, atraviesen las biomembranas de modo eficiente. Antes de analizar estas proteínas de transporte, es necesario revisar el concepto de ósmosis, la fuerza que impulsa el movimiento de agua a través de las membranas.

El agua se mueve de modo espontáneo “cuesta abajo” a través de una membrana semipermeable, desde una solución de baja concentración de soluto (concentración de agua relativamente elevada) hacia una de alta concentración de soluto (concentración de agua relativamente baja), en un proceso denominado **ósmosis** o flujo osmótico. En efecto, la ósmosis es equivalente a “difusión” de agua a través de una membrana semipermeable. La presión osmótica se define como la presión hidrostática requerida para detener el flujo neto de agua a través de una membrana que separa soluciones de diferente concentración acuosa (Fig. 11-6). En otras palabras, la presión osmótica equilibra la fuerza termodinámica impulsada por entropía del gradiente de concentración de agua. En este contexto, la “membrana” puede ser una capa de células o una membrana plasmática permeable al agua, pero no a los solutos. La presión osmótica es directamente proporcional a la diferencia de

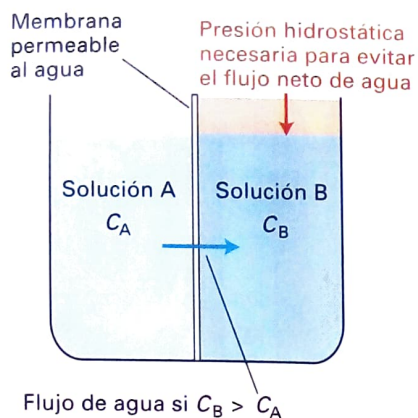


Figura 11-6 Presión osmótica. Las soluciones A y B están separadas por una membrana permeable al agua, pero impermeable a todos los solutos. Si C_B (la concentración total de solutos en la solución B) es mayor que C_A , el agua tenderá a fluir a través de la membrana desde la solución A a la B. La presión osmótica π entre las soluciones es la presión hidrostática que deberá aplicarse a la solución B para evitar este flujo de agua. La presión osmótica se calcula según la ecuación de van't Hoff, como $\pi = RT(C_B - C_A)$, donde R es la constante de los gases y T es la temperatura absoluta.

concentración del número total de moléculas de soluto a cada lado de la membrana. Por ejemplo, una solución de 0,5 M NaCl es, de hecho, 0,5 M iones Na^+ y 0,5 M Cl^- y tiene la misma presión osmótica que una solución 1 M de glucosa o sacarosa.

El movimiento de agua a través de la membrana plasmática determina el volumen de las células individuales, que debe ser regulado para evitar daño celular. Los pequeños cambios en las condiciones osmóticas extracelulares hacen que la mayoría de las células animales se hinchen o se encojan con rapidez. Cuando se colocan en una solución **hipotónica** (en la que la concentración de solutos que no penetran la membrana es *más baja* que en el citosol), las células animales se hinchan debido al flujo osmótico de agua hacia el interior. Por el contrario, cuando se colocan en una solución **hipertónica** (en la cual la concentración de solutos que no penetran la membrana es *más alta* que en el citosol), las células animales se encogen a medida que el agua del citosol sale de la célula por flujo osmótico. En consecuencia, las células animales cultivadas deben ser mantenidas en un medio **isotónico**, que tiene una concentración de solutos y una fuerza osmótica similares a las del citosol celular.

 En las plantas vasculares, el agua y los minerales son absorbidos desde el suelo por las raíces y ascienden por la planta, a través de tubos conductores (el xilema); la pérdida de agua de la planta, principalmente por evaporación en las hojas, impulsa este movimiento de agua. A diferencia de las células animales, las de los vegetales, las algas, los hongos y las bacterias están rodeados por una pared celular rígida, que resiste la expansión del volumen de la célula cuando se incrementa la presión osmótica intracelular. Sin una pared de este tipo, las células animales se expanden cuando la presión osmótica interna se incrementa —si esta presión aumenta demasiado, las células estallarán como globos que se inflan en exceso—. A raíz de la existencia de la pared celular en las células vegetales, el influjo osmótico de agua, que se produce cuando estas células se ubican en una solución hipotónica (aunque se trate de agua pura), conduce a un incremento de la presión intracelular, pero no del volumen celular. En las células vegetales, la concentración de solutos (p. ej., azúcares y sales) habitualmente es más alta en la va-

cuola (véase la Fig. 9-32) que en el citosol que, a su vez, tiene una concentración de solutos más elevada que el espacio extracelular. La presión osmótica, denominada *presión de turgencia*, generada por la entrada de agua al citosol y luego al interior de la vacuola, empuja el citosol y luego la membrana plasmática contra la pared celular resistente. Las células vegetales pueden resistir esta presión, que las ayuda a mantenerse en posición vertical y también a crecer. La elongación celular, durante el crecimiento, es inducida por una hormona localizada en una región definida de la pared celular después del influjo de agua hacia la vacuola, que aumenta su tamaño y, de este modo, el de la célula. ■

Aunque la mayoría de los protozoarios (al igual que las células animales) carecen de una pared celular rígida, muchos contienen una **vacuola contráctil** que les permite evitar la lisis osmótica. La vacuola contráctil capta agua del citosol y, a diferencia de la vacuola vegetal, descarga periódicamente su contenido a través de la fusión con la membrana plasmática. Así, aun cuando ingrese agua continuamente por flujo osmótico en la célula del protozoario, la vacuola contráctil evita que se acumule un exceso de agua en la célula y que se hinche al punto de estallar.

Las acuaporinas incrementan la permeabilidad al agua de las membranas celulares

La tendencia natural del agua a fluir a través de las membranas celulares como resultado de la presión osmótica plantea un interrogante obvio: ¿por qué las células de los animales de agua dulce no estallan en el agua? Por ejemplo, las ranas depositan sus huevos en el agua de los estanques (una solución hipotónica), pero los ovocitos y los huevos no se hinchan en el agua, aun cuando su concentración salina interna (principalmente KCl) es comparable a la de las otras células (~ 150 mM KCl). Estas observaciones fueron las que condujeron a los investigadores, en primer lugar, a sospechar que las membranas plasmáticas de la mayoría de los tipos celulares —aunque no la de los ovocitos de rana— contienen proteínas que son canales de agua que aceleran el flujo osmótico de ésta. Los resultados experimentales que se muestran en la **Figura 11-7** demuestran que una acuaporina de la membrana plasmática del eritrocito funciona como un canal de agua.

En su forma funcional, la acuaporina es un tetrámero de subunidades idénticas de 28 kDa (**Fig. 11-8a**). Cada subunidad contiene seis hélices α que se extienden en la membrana y forman un poro central a través del cual el agua puede moverse en cualquier dirección, dependiendo del gradiente osmótico (**Fig. 11-8b, c**). En el centro de cada monómero, el canal selectivo para agua de ~ 2 nm de longitud, o poro, tiene solo 0,28 nm de diámetro —es solo ligeramente más grande que el diámetro de una molécula de agua—. Las propiedades de cribado molecular del estrechamiento están determinadas por varios residuos de aminoácidos hidrofílicos conservados, cuyas cadenas laterales y grupos carbonilo se extienden hacia el centro del canal por una pared relativamente hidrofóbica que tapiza un lado del canal. Varias moléculas de agua se mueven simultáneamente a través del canal; cada una forma, de modo secuencial, puentes de hidrógeno específicos con los aminoácidos que recubren el canal y desplaza otra molécula de agua corriente abajo. Puesto que las acuaporinas no experimentan cambios de conformación durante el transporte de agua, transportan órdenes de agua más rápido que lo que lo hace la GLUT1 con referencia a la glucosa. La formación de los puentes de hidrógeno, entre los átomos de oxígeno

VIDEO: Ovocitos de rana que expresan la acuaporina estallan en solución hipotónica

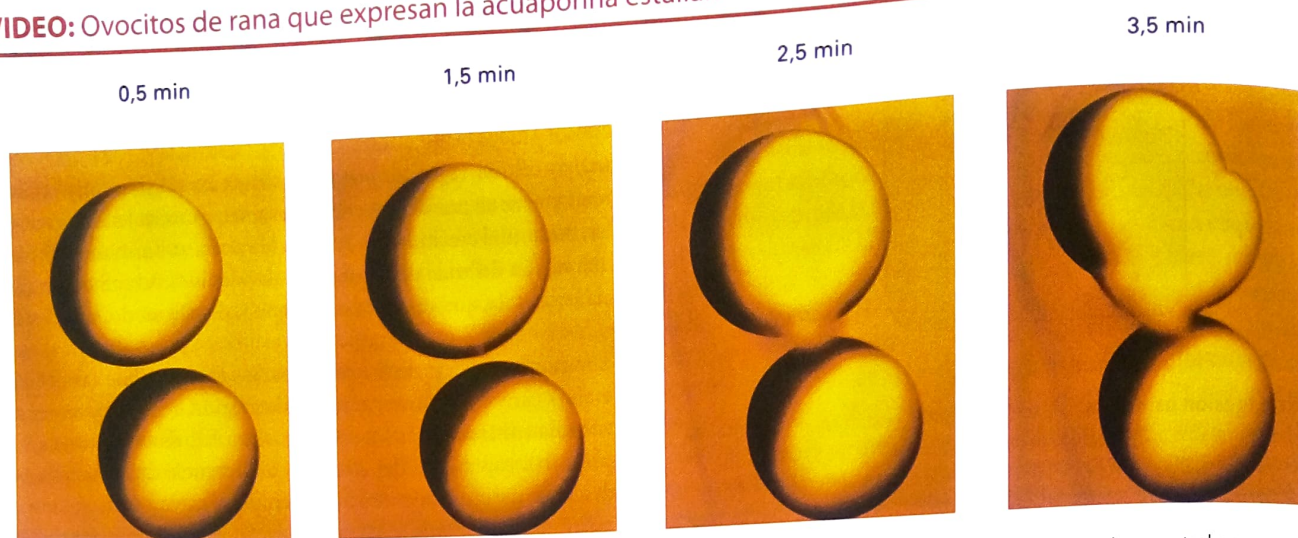


FIGURA EXPERIMENTAL 11-7 La expresión de la acuaporina en los ovocitos de rana incrementa su permeabilidad al agua. Los ovocitos de rana, que normalmente son impermeables al agua y no expresan la proteína acuaporina, fueron microinyectados con mRNA que codifica acuaporina. Estas fotografías muestran ovocitos control (célula inferior de cada panel) y ovocitos microinyectados (célula superior de cada panel) en los tiempos indicados, después de la transferencia de una solución salina isotónica (0,1 M) a una solución

salina hipotónica (0,035 M). El volumen de los ovocitos control permaneció sin cambios porque éstos son escasamente permeables al agua. Por el contrario, los ovocitos microinyectados que expresan acuaporina se hincharon y luego estallaron por el influjo osmótico de agua, lo que indica que la acuaporina es un canal proteico de agua. (Cortesía de Gregory M. Preston y Peter Agre, Johns Hopkins University School of Medicine. Véase L. S. King, D. Kozono y P. Agre, 2004, *Nat. Rev. Mo. Cell. Biol.* **5**:687-698.)

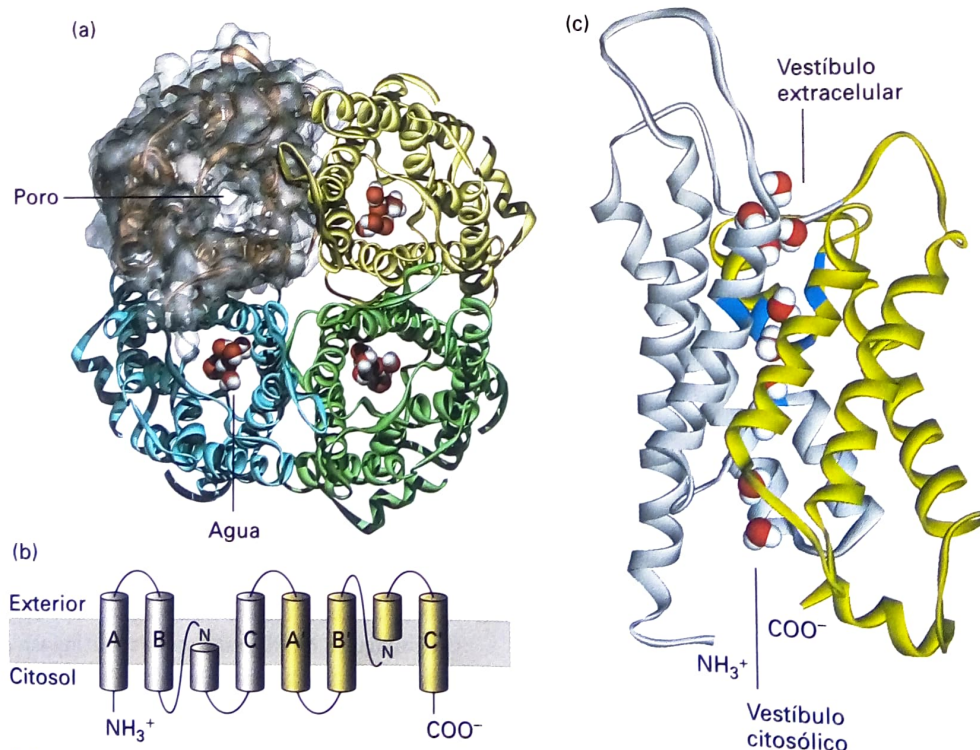


Figura 11-8 Estructura del canal proteico de agua acuaporina. (a) Modelo estructural de la proteína tetramérica que comprende cuatro subunidades idénticas. Cada subunidad forma un canal de agua, como se observa en esta vista desde arriba de la proteína, del lado exoplasmático. Uno de los monómeros se muestra con una superficie molecular según la cual puede notarse la entrada al poro. (b) Diagrama esquemático de la topología de una subunidad individual de acuaporina en relación con la membrana. Tres pares de hélices α transmembrana homólogas (A y A', B y B' y C y C') están orientadas en dirección opuesta con respecto a la membrana y se encuentran conectadas por dos bucles hidrofílicos que contienen hélices cortas que no se expanden en la membrana y tienen residuos de asparagina (N) conservados. Los bucles se curvan en el interior de la cavidad constituida por las seis hélices transmembrana, que se encuentran en el centro, para formar parte de la compuerta selectiva al agua. (c) Vista lateral

del poro en una subunidad individual de acuaporina en la cual varias moléculas de agua (oxígenos rojos e hidrógenos blancos) pueden verse con la compuerta selectiva al agua, de 2 nm de longitud, que separa los vestibulos citosólico y extracelular llenos de agua. La compuerta contiene residuos de arginina e histidina muy conservados, así como los dos residuos de asparagina, cuyas cadenas laterales forman puentes de hidrógeno con las moléculas de agua transportadas. (Los residuos clave de la compuerta que incluyen las dos asparaginas están resaltados en azul). Las moléculas de agua transportadas también forman puentes de hidrógeno con los grupos carbonilo de las cadenas principal de un residuo de cisteína. La disposición de estos puentes de hidrógeno y el estrecho diámetro del poro de 0,28 nm evitan el paso de protones (H₃O⁺) u otros iones. (Tomado de H. Sui y cols., 2001, *Nature* **414**:872. Véase también T. Zeuthen, 2001, *Trends Biochem. Sci.* **26**:17 y K. Murata y cols., 2000, *Nature* **407**:599.)

del agua y los grupos amino de las cadenas laterales de los dos aminoácidos, asegura que solo el agua sin carga (H_2O , pero no H_3O^+) pasa a través del canal; las orientaciones de las moléculas de agua en el canal evitan que los protones salten de una molécula a la siguiente y, de esta manera, el movimiento neto de protones a través del canal. En consecuencia, se mantienen los gradientes iónicos a través de las membranas, aun cuando fluye agua a través de éstas mediante las acuaporinas.



Los mamíferos expresan una familia de acuaporinas; once de estos genes se conocen en los seres humanos. La acuaporina 1 se expresa en abundancia en los eritrocitos, y la acuaporina 2 homóloga se encuentra en las células epiteliales de los riñones, que reabsorben agua desde la orina; de este modo, se controla la cantidad de agua en el organismo. La actividad de la acuaporina 2 está regulada por la vasopresina, llamada también hormona antidiurética. La regulación de la actividad de la acuaporina 2, en las células renales en reposo, se asemeja a la de la GLUT4 de la grasa y el músculo en lo siguiente: si no se requiere su actividad, cuando las células están en estado de reposo y el agua se excreta para formar orina, la acuaporina 2 se secuestra en las membranas de las vesículas intracelulares y, por lo tanto, es incapaz de mediar la importación de agua a la célula. Cuando la hormona polipeptídica vasopresina se une al receptor de vasopresina en la superficie celular, activa una vía de señalización que emplea cAMP como señal intracelular (detallado en el Cap. 15); esto hace que estas vesículas que contienen acuaporina 2 se fusionen con la membrana plasmática, lo que aumenta la velocidad de captación de agua y su retorno a la circulación, no a la orina. Las mutaciones inactivadoras en el receptor de vasopresina o el gen de acuaporina 2 producen *diabetes insípida*, una enfermedad caracterizada por la excreción de grandes volúmenes de orina diluida. Este hallazgo demuestra que el nivel de acuaporina 2 es limitante de la velocidad para la reabsorción de agua desde la orina que está siendo formada por los riñones. ■

Otros miembros de la familia de las acuaporinas transportan moléculas que contienen hidroxilos, como glicerol, en lugar de agua. La acuaporina 3 humana, por ejemplo, transporta glicerol y es similar en su secuencia de aminoácidos y en su estructura a la proteína de transporte de glicerol GlpF de la *Escherichia coli*.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 11.2

Transporte facilitado de glucosa y agua

- El transporte catalizado por proteínas de los solutos biológicos a través de una membrana se produce más rápido que la difusión simple, muestra una $V_{\text{máx}}$ cuando el número limitado de moléculas transportadoras está saturado con el sustrato y es altamente específico para éste (véase la Fig. 11-4).
- Se considera que las proteínas uniportadoras, como los transportadores de glucosa (GLUT), se mueven entre dos estados de conformación, uno en el cual los sitios que unen sustrato enfrentan el exterior y otro en el cual los sitios de unión enfrentan el interior (véase la Fig. 11-5).
- Todos los miembros de la familia de proteínas GLUT transportan azúcares y tienen estructuras similares. Las diferencias en sus valores

de K_m , la expresión en los diversos tipos celulares y las especificidades por los sustratos son importantes para el adecuado metabolismo de los azúcares en el organismo.

- Dos sistemas experimentales comunes, para estudiar las funciones de las proteínas de transporte, son los liposomas que contienen una proteína de transporte purificada y las células transfectadas con el gen que codifica una proteína de transporte en particular.
- La mayoría de las membranas biológicas son semipermeables, más permeables al agua que a los iones o la mayoría de otros solutos. El agua se desplaza por ósmosis a través de la membrana, desde la solución de menor concentración de soluto hacia una de mayor concentración de soluto.
- La pared celular rígida que rodea a las células vegetales evita que se hinchen y conduce a la generación de una presión de turgencia, en respuesta al influjo osmótico de agua.
- Las acuaporinas son proteínas canal de agua que incrementan específicamente la permeabilidad de las biomembranas al agua (véase la Fig. 11-8).
- La acuaporina 2 de la membrana plasmática de ciertas células renales es esencial para la reabsorción de agua desde la orina en formación; la ausencia de acuaporina 2 conduce a la enfermedad conocida como diabetes insípida.

11.3 Bombas impulsadas por ATP y ambiente iónico intracelular

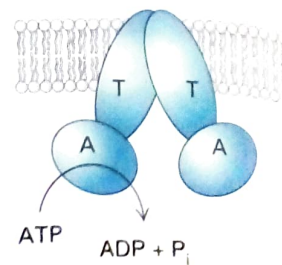
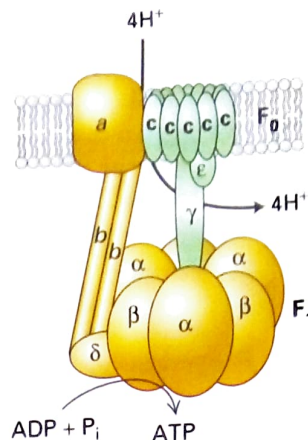
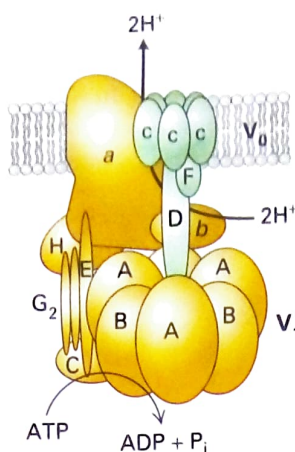
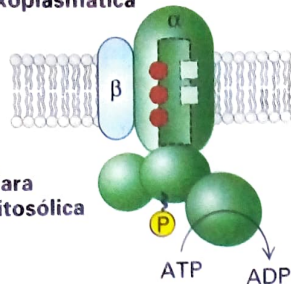
En secciones previas, nos hemos centrado en las proteínas de transporte que movilizan moléculas a favor de sus gradientes de concentración (transporte facilitado). Aquí, nos centramos en una clase principal de proteínas —las bombas impulsadas por ATP— que emplean la energía liberada por la hidrólisis del enlace fosfoanhidrido terminal del ATP para transportar iones y varias pequeñas moléculas a través de las membranas en *contra* de sus gradientes de concentración. Todas las bombas impulsadas por ATP son proteínas transmembrana que poseen uno o más sitios de unión para el ATP, localizados en subunidades o segmentos de la proteína, que siempre enfrentan el citosol. Estas proteínas comúnmente se denominan *ATPasas* y normalmente no hidrolizan ATP para formar ADP y P_i , a menos que se transporten simultáneamente iones u otras moléculas. Dado este estrecho *acoplamiento* entre la hidrólisis de ATP y su transporte, la energía almacenada en el enlace fosfoanhidrido no se disipa como calor sino que se emplea para mover iones u otras moléculas cuesta arriba, en contra de un gradiente electroquímico.

Existen cuatro clases principales de bombas impulsadas por ATP

Las estructuras generales de las cuatro clases de bombas impulsadas por ATP se muestran en la Figura 11-9, con ejemplos específicos de cada clase en la lista que se encuentra debajo de la figura. Nótese que los miembros de tres de las clases (P, F y V) solo transportan iones, al igual que algunos miembros de la cuarta clase, la superfamilia ABC. La

Cara exoplasmática

Cara citosólica



Bombas clase P

Membrana plasmática de los vegetales y de los hongos (bomba H^+)

Membrana plasmática de los eucariontes superiores (bomba Na^+/K^+)

Membrana plasmática apical del estómago de los mamíferos (bomba H^+/K^+)

Membrana plasmática de todas las células eucarióticas (bomba Ca^{2+})

Membrana del retículo sarcoplasmático de las células musculares (bomba Ca^{2+})

Bombas protonicas clase V

Membrana vacuolar de los vegetales, levaduras y otros hongos

Membrana de los endosomas y lisosomas, en las células animales

Membrana plasmática de los osteoclastos y algunas células de los túbulos renales

Bombas protonicas clase F

Membrana plasmática de las bacterias

Membrana interna de las mitocondrias

Membrana tilacoide del cloroplasto

Superfamilia ABC

Membrana plasmática de las bacterias (transportadores de aminoácidos, azúcares y péptidos)

Membranas plasmáticas de los mamíferos (transportadores de fosfolípidos, pequeñas sustancias lipofílicas, colesterol y otras moléculas pequeñas)

Figura 11-9 Las cuatro clases de proteínas de transporte impulsadas por ATP. Las localizaciones de las bombas específicas están indicadas debajo de cada clase. Las bombas clase P están compuestas por dos subunidades catalíticas α , que se fosforilan como parte del ciclo de transporte. Las dos subunidades β presentes en algunas de estas bombas pueden regular el transporte. Solo se muestran una subunidad α y una subunidad β . Las bombas clase V y F no forman intermediarios fosfoproteicos, y casi todas transportan solo protones. Sus estructuras son semejantes y contienen proteínas similares, pero ninguna de sus subunidades están relacionadas con las de las bombas clase P. Las bombas clase V acoplan la hidrólisis del ATP al transporte de protones en contra

de un gradiente de concentración, mientras que las bombas clase F, normalmente, operan en dirección inversa para utilizar energía en una concentración protónica o gradiente de voltaje para la síntesis de ATP. Todos los miembros de la gran superfamilia de proteínas ABC contienen dos dominios transmembrana (T) y dos dominios citosólicos de unión al ATP (A) que acoplan la hidrólisis del ATP al movimiento de solutos. Estos dominios centrales están presentes como subunidades separadas en algunas proteínas ABC (que se muestran aquí), pero se fusionan en un solo polipéptido en otras proteínas ABC. (Véase T. Nishi y M. Forgac, 2002, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 3:94; C. Toyoshima y cols., 2000, *Nature*, 405:647; D. McIntosh, 2000, *Nature Struct. Biol.* 7:532; y T. Elston, H. Wang y G. Oster, 1998, *Nature* 391:510.)

mayoría de los miembros de esta superfamilia transportan moléculas pequeñas, como aminoácidos, azúcares, péptidos, lípidos y otras moléculas incluidas en numerosos tipos de fármacos.

Todas las bombas iónicas clase P poseen dos subunidades catalíticas α idénticas, cada una de las cuales contiene un sitio de unión al ATP. La mayoría también tiene dos subunidades β más pequeñas que, por lo general, tienen funciones de regulación. Durante el transporte, al menos una de las subunidades α se fosforila (de allí el nombre de clase "P", por -fosforilada- phosphorylated en inglés) y los iones transportados se mueven a través de la subunidad fosforilada. Las secuencias de aminoácidos que rodean los residuos fosforilados son homólogas en diferentes bombas. Esta clase incluye la ATPasa Na^+/K^+ de la membrana plasmática, que genera la baja concentración citosólica de Na^+ y la alta concentración de K^+ , típicas de las células animales (véase la Fig. 11-3). Ciertas ATPasas de Ca^{2+} bombean iones Ca^{2+} fuera del citosol hacia el medio externo; otras bombean Ca^{2+} desde el citosol hacia el retículo endoplasmático o al RE especializado denominado **retículo sarcoplasmático**, presente en las células musculares. Otro miembro de la clase P, que se encuentra en las células secretoras de ácido del estómago de los mamíferos, transporta protones (iones H^+) hacia el exterior e iones K^+ al interior de la célula.

Las estructuras de las bombas iónicas clase V y clase F son similares entre sí, pero no están relacionadas con las bombas clase P y son más complejas que éstas. Las bombas clase V y clase F contienen varias subunidades transmembrana y citosólicas diferentes. Casi todas las bombas V y F conocidas transportan solo protones, y lo hacen en un proceso que no involucra un intermediario fosfoproteico. Las bombas clase V, en general, funcionan para generar el bajo pH de las vacuolas de los vegetales y los lisosomas, así como otras vesículas ácidas en las células animales al bombear protones desde la cara citosólica hacia la cara exoplasmática de la membrana, en contra de un gradiente electroquímico de protones. Por el contrario, las bombas de H^+ que generan y mantienen el potencial eléctrico de la membrana plasmática en las células vegetales, en los hongos y en muchas bacterias, pertenecen a las bombas protonicas de la clase P.

Las bombas de la clase F se encuentran en las membranas plasmáticas bacterianas, en las mitocondrias y cloroplastos. A diferencia de las bombas de la clase V, generalmente funcionan como bombas protonicas inversas, en las cuales la energía liberada por el movimiento energéticamente favorecido de protones, desde la cara exoplasmática hacia la cara citosólica de la membrana a favor del gradiente electroquímico de protones, es empleada para impulsar la síntesis energéticamente desfa-

vorable de ATP a partir de ADP y P_i. Dada su importancia en la síntesis de ATP en los cloroplastos y las mitocondrias, las bombas protónicas de clase F, comúnmente denominadas ATP sintasas, son tratadas por separado en el **Capítulo 12 (Energética celular)**.

La clase final de bombas impulsadas por ATP constituye una gran familia de múltiples miembros que son más diversos en función que aquellos de otras clases. Conocida como la **superfamilia ABC** (por su nombre en inglés *ATP binding cassette*, o *cassette* que une ATP), esta clase incluye varios cientos de proteínas de transporte distintas presentes en los organismos, desde las bacterias hasta los seres humanos. Como se detallará más adelante, algunas de estas proteínas de transporte se identificaron inicialmente como proteínas de resistencia a múltiples fármacos que, cuando se sobre expresan en las células cancerosas, exportan fármacos anticancerígenos y hacen que los tumores se tornen resistentes a su acción. Cada proteína ABC es específica para un sustrato en particular o para un grupo de sustratos relacionados que pueden ser iones, azúcares, aminoácidos, fosfolípidos, colesterol, péptidos, polisacáridos o incluso proteínas. Todas las proteínas de transporte ABC comparten una organización estructural que consiste en cuatro dominios “núcleo”: dos dominios transmembrana (T), que forman el pasaje a través del cual las moléculas transportadas atraviesan la membrana, y dos dominios citosólicos que unen ATP (A). En algunas proteínas ABC, principalmente en las bacterianas, los dominios núcleo están presentes en cuatro polipéptidos separados; en otras, los dominios núcleo están fusionados en uno o dos polipéptidos multidominio.

Las bombas iónicas impulsadas por ATP generan y mantienen gradientes iónicos a través de las membranas celulares

La composición iónica específica del citosol difiere habitualmente, en gran medida, de la del líquido extracelular que la rodea. En casi todas las células –incluso los microbios, las células vegetales y animales–, el pH citosólico se mantiene cerca de 7,2 *independientemente* del pH extracelular. En el caso más extremo, hay una diferencia de un millón de veces en la concentración de H⁺ entre el pH del citosol de las células epiteliales que recubren el estómago y el pH del contenido estomacal, después de una comida. Además, la concentración citosólica de K⁺ es mucho más elevada que la de Na⁺. Tanto en los invertebrados como en los vertebrados, la concentración de K⁺ es 20-40 veces más elevada en el citosol que en la sangre, mientras que la concentración de Na⁺ es 8-12 veces más baja en el citosol que en la sangre (**Cuadro 11-2**). Parte del Ca²⁺ del citosol está unido a los grupos cargados negativamente del ATP en las proteínas y otras moléculas, pero es la concentración del Ca²⁺ no unido (o “libre”) la que resulta crítica para sus funciones en las vías de señalización y en la contracción muscular. La concentración del Ca²⁺ libre en el citosol generalmente es inferior a 0,2 micromolar (2 × 10⁻⁷ M), mil veces o más inferior a la de la sangre. Las células vegetales y muchos microorganismos mantienen concentraciones elevadas similares de K⁺ y bajas concentraciones de Ca²⁺ y Na⁺ aun si las células se cultivan en soluciones salinas muy diluidas.

Las bombas iónicas analizadas en esta sección son responsables, en gran medida, de establecer y mantener los gradientes iónicos habituales a través de las membranas plasmáticas e intracelulares. Al llevar a cabo esta tarea, las células gastan una cantidad considerable de energía. Por ejemplo, hasta el 25 por ciento del ATP producido por

Cuadro 11-2 Concentraciones iónicas intracelulares y extracelulares típicas

Ion	Célula (mM)	Sangre (mM)
Axón de calamar (invertebrado*)		
K ⁺	400	20
Na ⁺	50	440
Cl ⁻	40-150	560
Ca ²⁺	0,0003	10
X ^{-†}	300-400	5-10
Célula de mamífero (vertebrado)		
K ⁺	139	4
Na ⁺	12	145
Cl ⁻	4	116
HCO ₃ ⁻	12	29
X ⁻	138	9
Mg ²⁺	0,8	1,5
Ca ²⁺	<#0,0002	1,8

*El gran axón nervioso del calamar ha sido ampliamente utilizado en estudios del mecanismo de conducción de los impulsos eléctricos.
†X⁻ representa las proteínas que tienen una carga eléctrica negativa neta al pH neutro de la sangre y las células.

las células nerviosas y renales se emplea para el transporte iónico, y los eritrocitos humanos consumen hasta el 50 por ciento de su ATP disponible para este propósito; en ambos casos, la mayoría de este ATP se utiliza para impulsar la bomba de Na⁺/K⁺ (véase la Fig. 11-3). Los gradientes de Na⁺ y K⁺ resultantes, en las células nerviosas, son esenciales para su capacidad de conducir las señales eléctricas con rapidez y eficiencia, como detallamos en el **Capítulo 22**. Ciertas enzimas necesarias para la síntesis proteica en todas las células requieren elevada concentración de K⁺ y son inhibidas por elevadas concentraciones de Na⁺; esta cesaría sin la función de la bomba de Na⁺/K⁺. En las células tratadas con venenos que inhiben la producción de ATP (p. ej., 2,4-dinitrofenol en las células aerobias), el bombeo se detiene y las concentraciones iónicas en el interior de la célula se aproximan gradualmente a la del ambiente externo a medida que los iones se mueven espontáneamente a través de los canales de la membrana plasmática a favor de sus gradientes electroquímicos. Finalmente, las células tratadas con el veneno mueren: en parte, porque su síntesis proteica requiere una alta concentración de iones K⁺, y en parte porque en ausencia de un gradiente de Na⁺ a través de la membrana celular, una célula no puede importar ciertos nutrientes tales como aminoácidos (véase la Fig. 11-3). Los estudios sobre los efectos de esos venenos proporcionaron evidencias iniciales sobre la existencia y la importancia de las bombas iónicas.

La relajación muscular depende de las ATPasas de Ca^{2+} que bombean Ca^{2+} desde el citosol hacia el interior del retículo sarcoplasmático

En las células musculares esqueléticas, los iones Ca^{2+} se concentran y almacenan en el **retículo sarcoplasmático (RS)**, un tipo especializado de retículo endoplasmático (RE). La liberación de los iones Ca^{2+} almacenados, desde la luz del RS, en el citosol mediante los canales iónicos provoca la contracción muscular, como se analizará en el **Capítulo 17**. Una ATPasa de Ca^{2+} clase P localizada en la membrana del RS del músculo esquelético bombea Ca^{2+} desde el citosol hacia atrás, al interior de la luz del RS, e induce de esta manera la relajación muscular.

En el citosol de las células musculares, la concentración de Ca^{2+} libre oscila entre 10^{-7} M (células en reposo) y más de 10^{-6} M (células en contracción), mientras que la concentración *total* de Ca^{2+} en la luz del RS puede ser tan alta como 10^{-2} M. La luz del RS contiene dos proteínas abundantes, la calsequestrina y la así denominada proteína que une Ca^{2+} con alta afinidad, cada una de las cuales une múltiples iones Ca^{2+} con alta afinidad. Al unir gran parte del Ca^{2+} de la luz del RS, estas proteínas reducen la concentración de iones Ca^{2+} "libres" en las vesículas del RS. Esto reduce el gradiente de concentración de Ca^{2+} entre el citosol y la luz del RS y, en consecuencia, disminuye la energía necesaria para bombear los iones Ca^{2+} hacia el RS desde el citosol. La actividad de la ATPasa de Ca^{2+} muscular se incrementa a medida que la concentración de Ca^{2+} libre en el citosol lo hace. En las células musculares esqueléticas, la bomba de calcio de la membrana del RS opera en forma concertada con una bomba de Ca^{2+} similar, localizada en la membrana plasmática, para asegurar que la concen-

tración citosólica de Ca^{2+} libre en el músculo en reposo permanezca por debajo de $0,1 \mu\text{M}$.

El mecanismo de acción de la bomba de Ca^{2+} se conoce en detalle

Como la bomba de calcio constituye más del 80 por ciento de la proteína integral en las membranas del RS del músculo, se purifica fácilmente y se ha estudiado ampliamente. La determinación de la estructura tridimensional de esta proteína en varios estados de conformación que representan diferentes pasos en el proceso de bombeo ha revelado mucho acerca de su mecanismo de acción y sirve como paradigma para comprender muchas de las bombas de ATPasa de la clase P.

El modelo actual sobre el mecanismo de acción de la ATPasa Ca^{2+} en la membrana del RS implica múltiples estados conformacionales. Por simplicidad, los agrupamos en estados E1, en los cuales los dos sitios de unión para el Ca^{2+} , localizados en el centro del dominio que se extiende en la membrana, enfrentan el citosol; y los estados E2, en los cuales estos sitios de unión enfrentan la cara exoplasmática de la membrana y señalan hacia la luz del RS. El acoplamiento de la hidrólisis de ATP con el bombeo de iones requiere varios cambios de conformación en la proteína que deben producirse en un orden definido, como se muestra en la **Figura 11-10**. Cuando la proteína está en la conformación E1, dos iones Ca^{2+} se unen a dos sitios de unión de alta afinidad accesibles desde el lado citosólico; aun cuando la concentración citosólica de Ca^{2+} sea baja (véase el **Cuadro 11-2**), los iones calcio todavía llenan estos sitios.

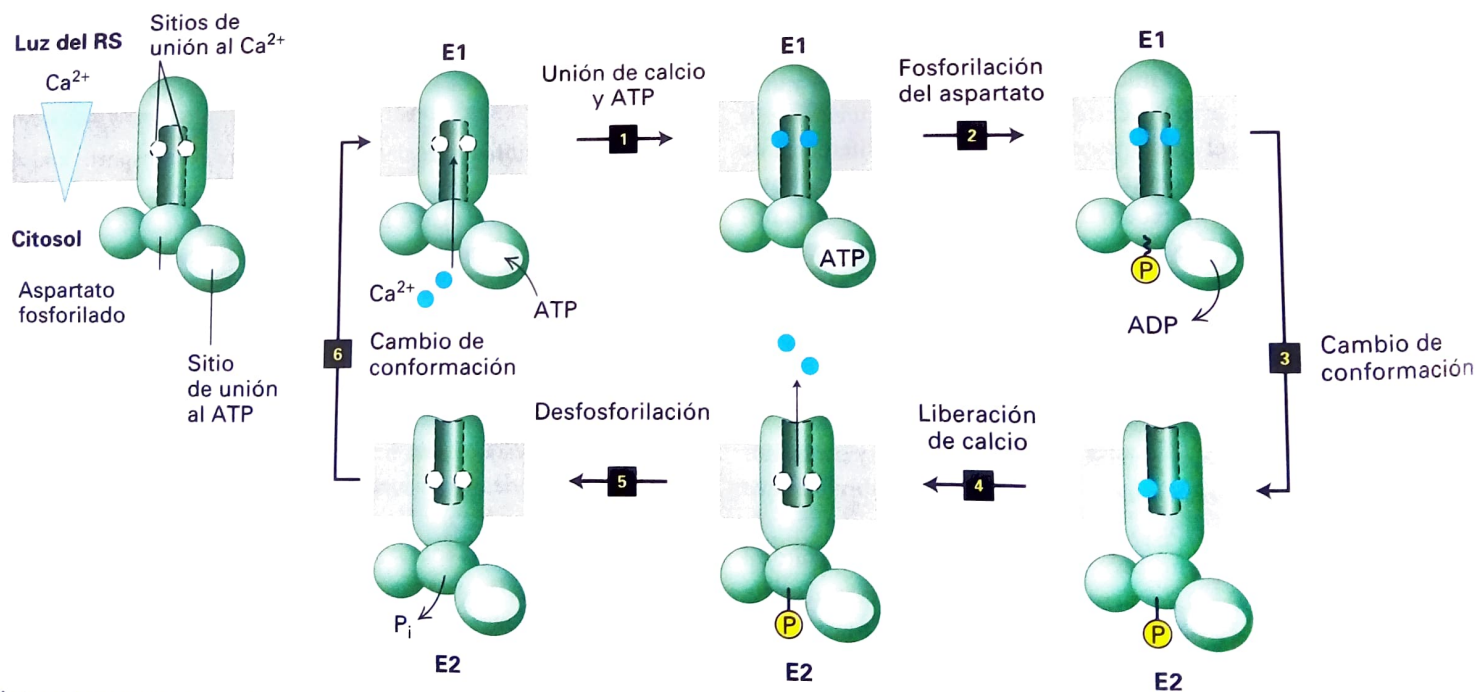


Figura 11-10 Modelo operativo de la ATPasa Ca^{2+} en la membrana del RS de las células de músculo esquelético. Solo se muestra una de las dos subunidades catalíticas α de esta bomba clase P. E1 y E2 son conformaciones alternativas de la proteína en la cual los sitios de unión de Ca^{2+} son accesibles a las caras citosólica y exoplasmática (luz del RS), respectivamente. Una secuencia ordenada de pasos, según se muestra aquí, resulta esencial para el acoplamiento la hidrólisis de ATP y el transporte de iones Ca^{2+} a través de la

membrana. En la figura, $\sim\text{P}$ indica un enlace aspartilfosfato de alta energía; $-\text{P}$ indica un enlace de baja energía. Como la afinidad de Ca^{2+} por los sitios de unión en E1 que enfrentan al citosol es 1 000 veces mayor que la afinidad del Ca^{2+} por los sitios que enfrentan el exoplasmático en E2, esta bomba transporta Ca^{2+} unidireccionalmente desde el citosol hacia la luz del RS. Véanse el texto y la **Figura 11-11** para más detalles. (Véase C. Toyoshima y G. Inesi, 2004, *Ann. Rev. Biochem.* 73:269-292.)

Luego, un ATP se une a un sitio en la cara citosólica (paso 1). El ATP unido se hidroliza a ADP en una reacción que requiere Mg^{2+} , y el fosfato liberado se transfiere a un residuo específico de aspartato en la proteína y forma el enlace fosfato acilo de alta energía denominado $E1 \sim P$ (paso 2). Después, la proteína sufre un cambio de conformación que genera $E2$, en el cual la afinidad de los dos sitios de unión a Ca^{2+} se reduce (lo que se muestra en detalle en la siguiente figura) y en la cual estos sitios ahora son accesibles a la luz del RS (paso 3). La energía libre de la hidrólisis del enlace aspartil fosfato en el $E1 \sim P$ es mayor que en el $E2-P$, y puede decirse que esta reducción de la energía libre del enlace aspartil-fosfato impulsa el cambio de conformación $E1 \rightarrow E2$.

Los iones Ca^{2+} se disocian espontáneamente de los sitios de baja afinidad para ingresar en la luz del RS, porque aun cuando la elevada concentración de Ca^{2+} allí sea más alta en el citosol, es más baja que la K_d para la unión de Ca^{2+} en el estado de baja afinidad (paso 4). Finalmente, el enlace aspartil-fosfato es hidrolizado (paso 5). Esta desfosforilación, acoplada con la unión ulterior de Ca^{2+} citosólico a los sitios de unión $E1$ Ca^{2+} , estabiliza el estado conformacional $E1$ con relación al $E2$, y puede afirmarse que impulsa el cambio de conformación $E2 \rightarrow E1$ (paso 6). Ahora, $E1$ está listo para transportar 2 iones Ca^{2+} adicionales. Así, el ciclo se completa, y la hidrólisis de un enlace fosfoanhidrido del ATP ha impulsado el bombeo de dos iones Ca^{2+} en contra de su gradiente de concentración hacia la luz del RS.

Gran parte de las evidencias estructurales y biofísicas avalan el modelo que se ilustra en la Figura 11-10. Por ejemplo, la bomba de calcio del músculo se ha aislado con fosfato unido al residuo clave de aspartato, y los estudios espectroscópicos han detectado ligeras alteraciones en la conformación de la proteína durante la conversión $E1 \rightarrow E2$. Los dos estados fosforilados también pueden ser distinguidos mediante pruebas bioquímicas; la adición de ADP al $E1$ fosforilado da como resultado la síntesis de ATP, la inversa del paso 2 de la Figura 11-10, mientras que la adición de ADP al $E2$ fosforilado no lo hace. Cada cambio conformacional principal del ciclo de reacción también puede ser caracterizado por una susceptibilidad distinta a varias enzimas proteolíticas, como la tripsina.

La Figura 11-11 muestra la estructura tridimensional de la bomba de Ca^{2+} en el estado $E1$. Como puede observarse en los 2 paneles de la derecha de la parte c, en la mitad inferior de la figura, las 10 hélices α que se expanden en la membrana, en la subunidad catalítica, forman el paso a través del cual se mueven los iones Ca^{2+} . Los aminoácidos de 4 de estas hélices forman los 2 sitios de unión de alta afinidad $E1$ por Ca^{2+} (Fig. 11-11a, izquierda). Un sitio se forma con átomos de oxígeno cargados negativamente de los grupos carboxilo (COO^-) de las cadenas laterales del glutamato y del aspartato, así como de las moléculas de agua. El otro sitio se forma a partir de los átomos de oxígeno de las cadenas laterales y principal. Así, a medida que los iones Ca^{2+} se unen a la bomba de Ca^{2+} pierden las moléculas de agua que normalmente rodean un ion de Ca^{2+} en la solución acuosa (véase la Fig. 2-7), pero estas aguas son reemplazadas por átomos de oxígeno con una geometría similar, que son parte de la proteína de transporte. Por el contrario, en el estado $E2$ (Fig. 11-11a, derecha) varias de estas cadenas de unión se han movido fracciones de nanómetro y son incapaces de interactuar con los iones Ca^{2+} unidos, lo que da cuenta de la baja afinidad del estado $E2$ para los iones Ca^{2+} .

La unión de iones Ca^{2+} a la bomba de Ca^{2+} ilustra un principio general de la unión de iones a los canales y proteínas de transporte

que encontraremos reiteradamente en este capítulo: a medida que los iones se unen, pierden la mayoría de sus aguas de hidratación, pero interactúan con los átomos de oxígeno de las proteínas que se encuentran con una geometría similar a los átomos de oxígeno del agua que están unidos a los iones en solución acuosa. Esto reduce la barrera termodinámica para la unión de iones a la proteína y permite la unión estrecha de los iones aun desde soluciones de concentraciones relativamente bajas.

La región citoplasmática de la bomba de Ca^{2+} consiste en tres dominios que están bien separados entre sí en el estado $E1$ (Fig. 11-11b). Cada uno de estos dominios está conectado a las hélices que se extienden en la membrana mediante segmentos cortos de aminoácidos. Los movimientos de dichos dominios citosólicos, durante el ciclo de bombeo, provocan movimientos de los segmentos que los conectan que se transmiten a movimientos de las hélices α que se expanden en las membranas. Por ejemplo, el residuo fosforilado, Asp 351, se localiza en el dominio P. La fracción de adenosina del ATP se une al dominio N pero el fosfato γ del ATP se une a residuos específicos del dominio P, lo que requiere el movimiento de los dominios, tanto N como P. De este modo, después de la unión de ATP y Ca^{2+} , el fosfato γ del ATP unido se ubica en posición adyacente al aspartato del dominio P que debe recibir el fosfato. Aunque aún no están claros los detalles precisos de los cambios conformacionales de éstas y de otras proteínas, los movimientos de los dominios N y P se transmiten mediante movimientos del tipo de palancas de los segmentos que se conectan en configuraciones de varias hélices α que se expanden en las membranas. Estos cambios son especialmente aparentes en las 4 hélices que contienen los 2 sitios de unión de Ca^{2+} : los cambios evitan que los iones Ca^{2+} unidos retrocedan hacia el citosol cuando se liberen, pero les permiten disociarse en el espacio exoplasmático (luz).

Todas las bombas iónicas de la clase P, independientemente del tipo de ion que transporten, se fosforilan en un residuo de aspartato altamente conservado durante el proceso de transporte. Como se dedujo a partir de las secuencias de cDNA, las subunidades catalíticas α de todas las bombas P examinadas hasta la fecha tienen secuencias de aminoácidos similares y, por lo tanto, se supone que tienen configuraciones semejantes de hélices α transmembrana y dominios A, P y N que enfrentan el citosol (véase la Fig. 11-10). Estos hallazgos indican fuertemente que todas las proteínas de este tipo evolucionaron de un precursor común, aunque ahora transporten iones distintos. Esta sugerencia se generó a partir de las similitudes de las estructuras tridimensionales de los segmentos de la ATPasa Na^+/K^+ con la de la bomba de Ca^{2+} en la zona inserta en la membrana (véase la Fig. 11-12); las estructuras moleculares de los 3 dominios citoplasmáticos también son muy semejantes. Así, el modelo operacional de la Figura 11-11 es, por lo general, aplicable a todas las bombas iónicas de la clase P impulsadas por ATP.

La calmodulina regula las bombas de la membrana plasmática que controlan las concentraciones de Ca^{2+} en el citosol

Como explicaremos en el Capítulo 15, en muchos tipos de células, además de las musculares, pequeños incrementos en la concentración de los iones Ca^{2+} libres en el citosol desencadenan una variedad de respuestas celulares. Para que el Ca^{2+} opere en la señalización intracelular,

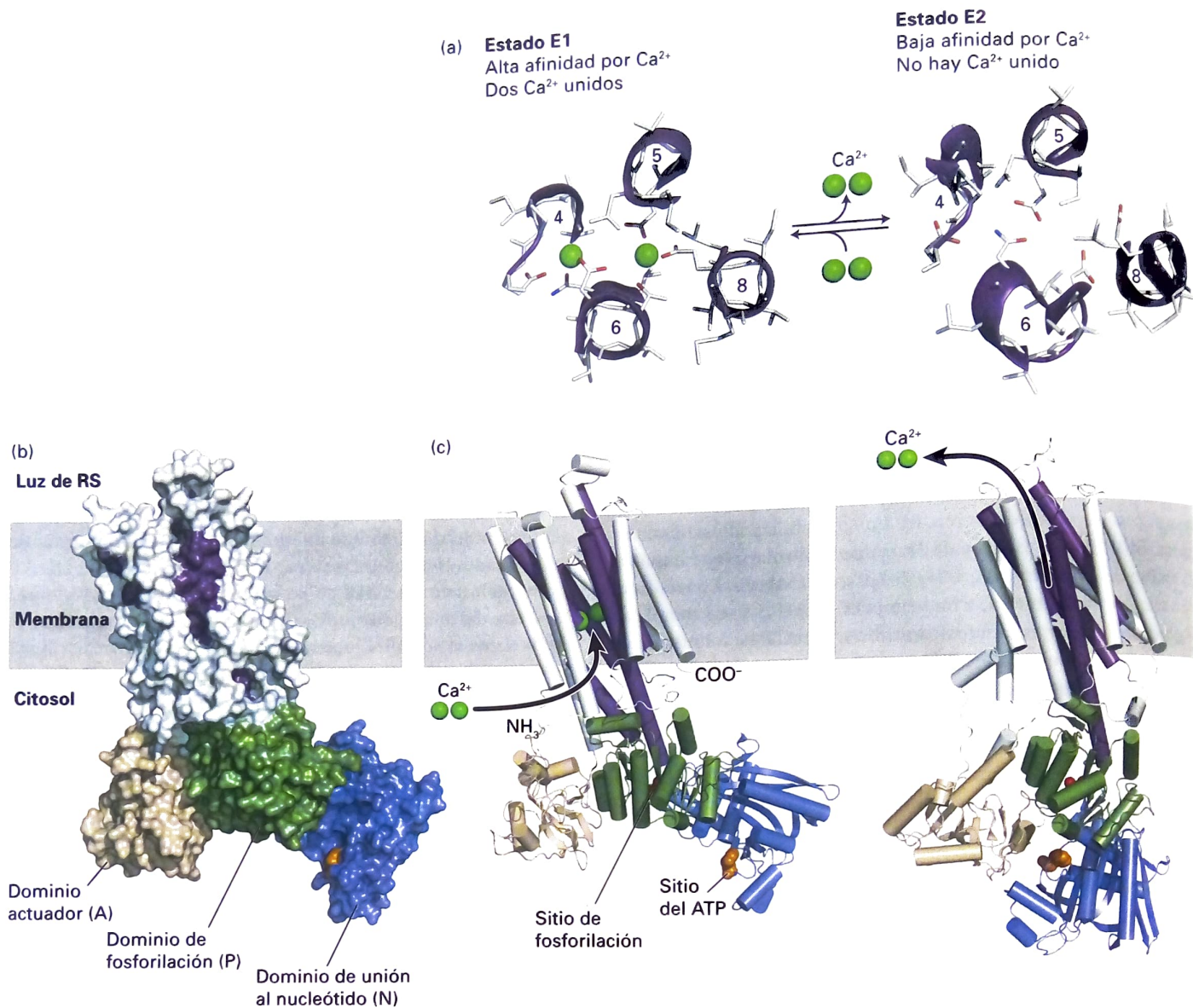


Figura 11-11 Estructura de la subunidad α catalítica en la ATPasa Ca^{2+} del músculo. (a) Sitios de unión a Ca^{2+} en el estado E1 (izquierda), con dos iones calcio unidos, y el estado de baja afinidad E2 (derecha) sin iones unidos.

Las cadenas laterales de los aminoácidos clave son blancas, y los átomos de oxígeno en las cadenas laterales del glutamato y el aspartato son rojas. En la conformación E1 de alta afinidad, los iones Ca^{2+} se unen a dos sitios entre las hélices 4, 5, 6 y 8 dentro de la membrana. Un sitio se forma con átomos de oxígeno con carga negativa de las cadenas laterales del glutamato y el aspartato y moléculas de agua (que no se muestran), y el otro se forma con átomos de oxígeno de las cadenas laterales y principal. Siete átomos de oxígeno rodean el ion Ca^{2+} en ambos sitios. (b) Modelo tridimensional de la proteína en el estado E1, basado en la estructura determinada por cristalografía de rayos X. Hay 10 hélices α transmembrana, 4 de las cuales (púrpura) contienen residuos que participan

en la unión del Ca^{2+} . El segmento citosólico forma 3 dominios: el dominio N que une un nucleótido (azul), el dominio P de fosforilación (verde) y el dominio actuador A (beige) que conecta dos de las hélices que se expanden en la membrana. (c) Modelos de la bomba en el estado E1 (izquierda) y E2 (derecha). Nótese las diferencias entre los estados E1 y E2 en las conformaciones de los dominios que unen nucleótido y actuador; estos movimientos impulsan los cambios de conformación en las hélices α que se expanden en las membranas (púrpura), que constituyen los sitios de unión del Ca^{2+} , y los convierten de uno en el cual los sitios de unión de Ca^{2+} son accesibles a la cara citosólica (estado E1) a uno en el cual el Ca^{2+} , ahora unido laxamente, es accesible a la cara exoplásmica (estado E2). (Adaptado de C. Toyoshima y G. Inesi, 2002, *Nature* **418**:605-611; C. Toyoshima y G. Inesi, 2004, *Annu. Rev. Biochem.* **73**:269-292; y E. Gouaux y R. MacKinnon, 2005, *Science* **310**:1461)

la concentración de los iones Ca^{2+} libres en el citosol habitualmente debe mantenerse por debajo de 0,1-0,2 μM . Las células animales, las levaduras y –probablemente– las células vegetales expresan ATPasas Ca^{2+} de la membrana plasmática, que transportan Ca^{2+} hacia el exterior de las células en contra de su gradiente electroquímico. La subunidad catalítica α de estas bombas de la clase P es semejante en su estructura y secuencia a la subunidad α de la bomba Ca^{2+} del RS.

La actividad de las ATPasas Ca^{2+} de la membrana plasmática está regulada por la **calmodulina**, una proteína citosólica que une Ca^{2+} (véase la Fig. 3-31). Un incremento en el Ca^{2+} citosólico induce la unión de los iones Ca^{2+} a la calmodulina, lo que desencadena la activación de la ATPasa Ca^{2+} . Como resultado, la exportación de iones Ca^{2+} desde la célula se acelera, y se restablece con rapidez la baja concentración de Ca^{2+} citosólica libre característica de la célula en reposo.

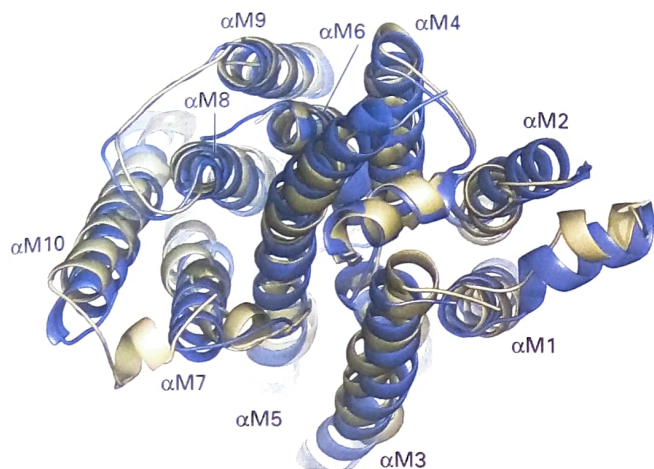


Figura 11-12 Comparaciones estructurales de la ATPasa Na^+/K^+ y de la ATPasa Ca^{2+} muscular. Estructura tridimensional de la ATPasa Na^+/K^+ (dorado) comparada con la de la ATPasa Ca^{2+} muscular (púrpura), vista desde la superficie citoplasmática; α M1-10 denota las 10 hélices α de la ATPasa Na^+/K^+ que se expanden en la membrana. (Tomado de J. P. North y cols., 2007 *Nature* **450**:1043 y H. Ogawa y cols., 2009, *Proc. Nat' Acad. Sci. USA* **106**:13742.)

La ATPasa Na^+/K^+ mantiene las concentraciones intracelulares de Na^+ y K^+ de las células animales

Una bomba iónica importante de la clase P, presente en la membrana plasmática de todas las células animales, es la ATPasa Na^+/K^+ . Esta bomba iónica es un tetrámero con una composición de subunidades $\alpha_2\beta_2$, y comparte homología estructural con la bomba de Ca^{2+} (véase

la Fig. 11-12). El polipéptido transmembrana β glucosilado pequeño, aparentemente, no está implicado de modo directo en el bombeo iónico. Durante el ciclo catalítico de la ATPasa Na^+/K^+ , ésta mueve 3 iones Na^+ hacia el exterior y 2 iones K^+ hacia el interior de la célula por cada molécula de ATP hidrolizada. El mecanismo de acción de la ATPasa Na^+/K^+ , esquematizado en la Figura 11-13, es semejante al de la bomba de calcio del RS, excepto porque los iones se bombean en *ambas* direcciones a través de la membrana, y que cada ion se mueve en *contra* de su gradiente de concentración. En su conformación E1, la ATPasa Na^+/K^+ tiene 3 sitios de unión de alta afinidad que unen Na^+ y 2 sitios de baja afinidad que unen K^+ accesibles a la superficie citosólica de la proteína. La K_m para unir Na^+ o estos sitios citosólicos es 0,6 mM, un valor considerablemente más bajo que la concentración intracelular de $\text{Na}^+ \sim 12$ mM; como resultado, los iones Na^+ normalmente ocupan completamente estos sitios. Por el contrario, la afinidad de los sitios de unión por K^+ es lo suficientemente baja como para que los iones K^+ , transportados hacia el interior a través de la proteína, se disocien de la

ANIMACIÓN GENERAL: Interconversiones de energía biológica

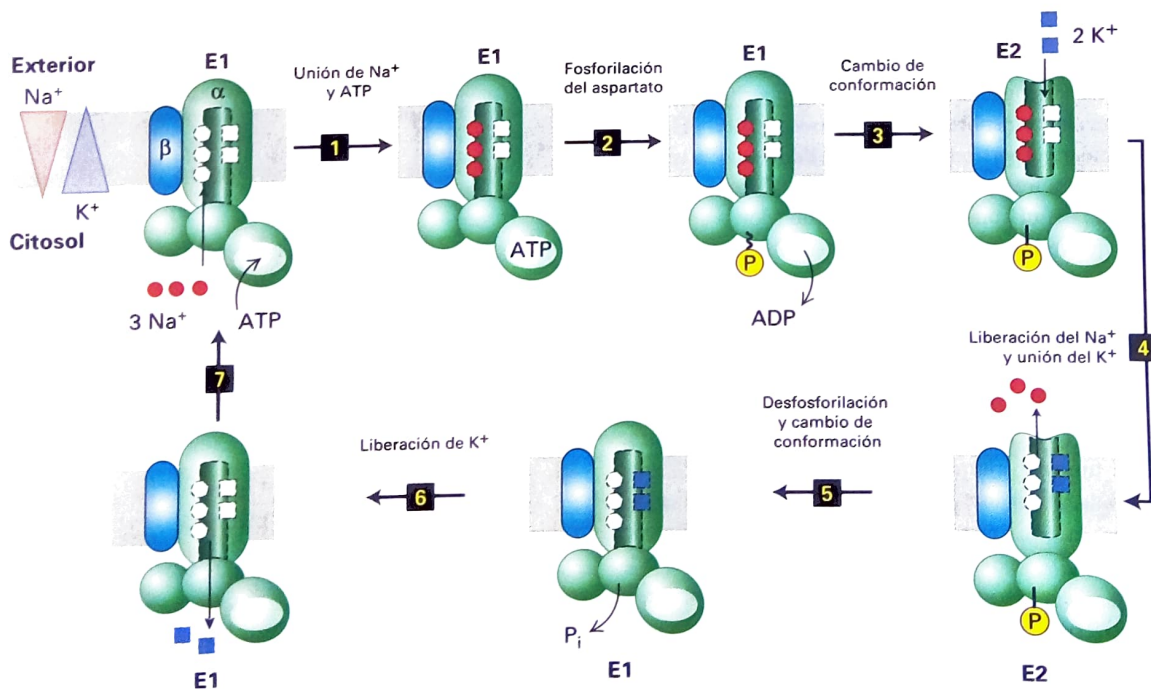


Figura 11-13 Modelo operativo de la ATPasa Na^+/K^+ de la membrana plasmática. Solo una de las dos subunidades α catalíticas de esta bomba clase P se muestra. No se sabe si solamente una o ambas subunidades, en una molécula de ATPasa simple, transportan iones. El bombeo iónico por la ATPasa Na^+/K^+ implica fosforilación, desfosforilación y cambios de conformación similares a

los de la ATPasa Ca^{2+} muscular (véase la Fig. 11-11). En este caso, la hidrólisis del intermediario E2-P impulsa el cambio de conformación $\text{E2} \rightarrow \text{E1}$ y el transporte concomitante de dos iones K^+ hacia el interior. Los iones Na^+ se indican con círculos rojos; los iones K^+ con cuadrados púrpura; el enlace fosfato acilo de alta energía con un $\sim \text{P}$; el enlace fosfoéster de baja energía, con $-\text{P}$.

E1 en el citosol, a pesar de la alta concentración de K^+ intracelular. Durante la transición E1→E2, 3 iones Na^+ unidos se tornan accesibles en la cara exoplasmática y, simultáneamente, la afinidad de los 3 sitios de unión por Na^+ caen. Los 3 iones Na^+ , unidos ahora a sitios de unión de baja afinidad por Na^+ , se disocian uno por vez hacia el medio extracelular, a pesar de la alta concentración extracelular de Na^+ . La transición de la conformación E2 también genera dos sitios K^+ de alta afinidad accesibles a la cara exoplasmática. Como la K_m para la unión de K^+ a estos sitios (0,2 mM) es más baja que la concentración extracelular de K^+ (4 mM), estos sitios se llenarán con iones K^+ a medida que los iones Na^+ se disocian. De modo semejante, durante la transición posterior E2→E1 los 2 iones K^+ unidos se transportan hacia adentro y luego se liberan en el citosol.

Ciertos fármacos (p. ej., la ouabaina y la digoxina) se unen al dominio exoplasmático de la ATPasa Na^+/K^+ de la membrana plasmática e inhiben de modo específico su actividad de ATPasa. La alteración resultante del equilibrio Na^+/K^+ de las células es una fuerte evidencia del papel crítico de esta bomba iónica en el mantenimiento de los gradientes normales de concentración iónica de K^+ y Na^+ . El Experimento Clásico 11.1 que sigue inmediatamente a este capítulo describe el descubrimiento de esta importante enzima necesaria para la vida.

Las ATPasas H^+ clase V mantienen la acidez de los lisosomas y de las vacuolas

Todas las ATPasas clase V transportan solamente iones H^+ . Estas bombas protonicas, presentes en las membranas de los lisosomas, endosomas y vacuolas de los vegetales, funcionan para acidificar la luz de estos orgánulos. El pH de la luz lisosómica puede medirse con precisión en las células vivas mediante el empleo de partículas marcadas con un colorante fluorescente sensible al pH. Cuando estas partículas se añaden al líquido extracelular, las células las engloban e internalizan (fagocitosis; véase el Cap. 17) y, finalmente, las transportan hacia los lisosomas. El pH de los lisosomas puede calcularse a partir del espectro de fluorescencia emitido. El DNA que codifica para una proteína naturalmente fluorescente cuya fluorescencia depende del pH puede ser modificado (por la adición de segmentos de DNA que codifican "secuencias de señalización", detalladas en los Caps. 13 y 14), de modo tal que la proteína sea dirigida hacia la luz del lisosoma; las mediciones de fluorescencia pueden, entonces, ser empleadas para determinar el pH de la luz del orgánulo. El mantenimiento del gradiente protonico de unas 100 veces o más entre la luz del lisosoma (pH ~ 4,5-5) y en el citosol (pH ~ 7) depende de la ATPasa clase V y, así, de la producción de ATP en la célula. El bajo pH de los lisosomas es necesario para la función óptima de muchas proteasas, nucleasas y otras enzimas hidrolíticas de la luz; por otra parte, un pH citosólico de 5 interrumpirá las funciones de muchas proteínas que se encuentran optimizadas para actuar a pH 7, y conducirá a la muerte celular.

El bombeo de relativamente pocos protones es necesario para acidificar una vesícula intracelular. Para comprender por qué, recuerde que una solución de pH 4 tiene una concentración de iones H^+ de 10^{-4} moles por litro o 10^{-7} moles de iones H^+ por mililitro. Como hay $6,02 \times 10^{23}$ átomos de H por mol (número de Avogadro), un mililitro de una solución pH 4 contiene $6,02 \times 10^{16}$ iones H^+ . De este modo, a pH 4, un lisosoma esférico primario con un volumen de $4,18 \times 10^{-15}$ mL (diámetro de 0,2 μm) contendrá exactamente 252 protones. A pH 7, el mismo orgánulo tendrá un promedio de solamente 0,2 protones en su luz y así bombeará aproximadamente solo 250 protones para acidificar el lisosoma.

Por sí solas, las bombas protonicas impulsadas por ATP no pueden acidificar la luz de un orgánulo (o el espacio extracelular) porque estas bombas son *electrogénicas*; es decir, se produce un movimiento neto de carga eléctrica durante el transporte. El bombeo de solo unos pocos protones genera una acumulación de iones H^+ cargados positivamente en la cara exoplasmática (el interior) de la membrana del orgánulo. Por cada H^+ bombeado a través, un ion negativo (p. ej., OH^- o Cl^-) será "dejado atrás" en la cara citosólica, lo que provocará allí la acumulación de iones cargados negativamente. Estos iones con cargas opuestas se atraen en las caras opuestas de la membrana, generando una separación de cargas, o potencial eléctrico, a través de ella. De este modo, la membrana del lisosoma funciona como un condensador en un circuito eléctrico, que almacena cargas opuestas (aniones y cationes) en lados opuestos de una barrera impermeable al movimiento de partículas cargadas.

A medida que se bombean más protones y se acumula un exceso de cargas positivas en la cara exoplasmática, la energía necesaria para mover protones adicionales en contra de este gradiente de potencial eléctrico creciente aumenta notablemente y evita el bombeo de protones adicionales mucho antes de que se establezca un gradiente de concentración transmembrana de H^+ significativo (Fig. 11-14a). De hecho, ésta es la manera en la que las bombas H^+ de la clase P generan un potencial negativo en el citosol a través de las membranas plasmáticas de los vegetales y de las levaduras.

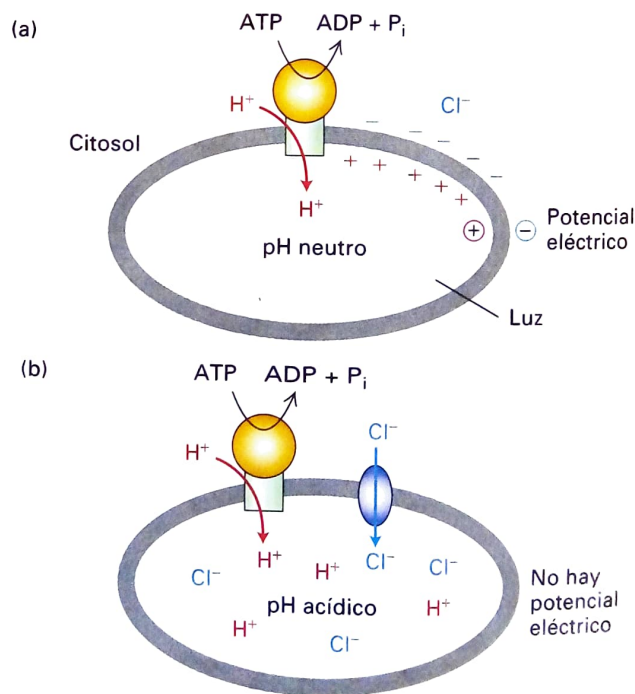


Figura 11-14 Efecto de las bombas H^+ clase V en la concentración de los gradientes de concentración de H^+ y los gradientes de potencial eléctrico a través de las membranas celulares. (a) Si un orgánulo intracelular contiene solo dos bombas clase V, el bombeo de protones genera un potencial eléctrico a través de la membrana (lado que enfrenta el citosol negativo y lado luminal positivo), pero no hay un cambio significativo en el pH intraluminal. (b) Si la membrana del orgánulo también contiene canales Cl^- , los aniones siguen pasivamente a los protones bombeados, lo que da como resultado una acumulación de iones H^+ y Cl^- en la luz (bajo pH luminal), pero sin potencial eléctrico a través de la membrana.

Para que la luz de un orgánulo o un espacio extracelular (p. ej., la luz del estómago) se tornen ácidos, el movimiento de protones debe estar acompañado de (1) el movimiento de un número igual de aniones (p. ej., Cl^-) en la misma dirección o por el (2) movimiento de números equivalentes de un catión distinto en la dirección opuesta. El primer proceso se produce en los lisosomas y las vacuolas vegetales, cuyas membranas contienen ATPasas H^+ clase V y canales aniónicos a través de los cuales se mueven los iones Cl^- acompañantes (Fig. 11-14b). El segundo proceso tiene lugar en el recubrimiento del estómago, que contiene una ATPasa H^+/K^+ clase P que no es electrogénica y bombea un H^+ hacia el exterior y un K^+ hacia el interior. La operación de esta bomba se analizará posteriormente en el capítulo.

Las bombas protónicas impulsadas por ATP en las membranas de las vacuolas y los lisosomas se han solubilizado, purificado e incorporado a liposomas. Como se muestra en la Figura 11-9, estas bombas protónicas clase V contienen dos dominios discretos: un dominio hidrofílico citosólico (V_1) y un dominio transmembrana (V_0), con múltiples subunidades que forman cada dominio. La unión y la hidrólisis de ATP por las subunidades B, en V_1 , proporcionan la energía para el bombeo de los iones H^+ a través del canal que conduce protones formado por las subunidades "c" y "a" de V_0 . A diferencia de las bombas iónicas de la clase P, las bombas protónicas de la clase V no se fosforilan y desfosforilan durante el transporte de protones. Las bombas protó-

nicas clase F, de estructura similar, que describiremos en el Capítulo 12, normalmente operan en dirección "inversa" para generar ATP más que para bombear protones; su estructura y mecanismo de acción se conoce con gran detalle.

Las proteínas ABC exportan una gran variedad de fármacos y toxinas desde la célula

Como se mencionó previamente, todos los miembros de la superfamilia ABC, muy grande y diversa de proteínas de transporte contienen dos dominios transmembrana (T) y dos dominios de unión al ATP citosólicos (A) (véase la Fig. 11-9). Los dominios T, cada uno formado por diez hélices α que se extienden en la membrana, forman la vía a través de la cual la sustancia transportada (sustrato) atraviesa la membrana (Fig. 11-15a) y determina la especificidad del sustrato de cada proteína ABC. Las secuencias de los dominios A son aproximadamente 30-40 por ciento homólogas en todos los miembros de esta superfamilia, lo que indica un origen evolutivo común.

El descubrimiento de la primera proteína eucariótica ABC que fue reconocida provino de estudios en células tumorales y células cultivadas que exhibían resistencia a varios fármacos con estructuras químicas no relacionadas. Estas células, finalmente, expresaron niveles elevados de una proteína de transporte de resistencia multifármaco (MDR) denominada *MDR1* y conocida actualmente como ABCB1. Esta proteína utiliza la energía derivada de la hidrólisis del ATP para exportar una gran diversidad de sustancias desde el citosol hacia el medio extracelular. El gen *Mdr1* con frecuencia está amplificado en las células con resistencia a múltiples fármacos, lo que da como resultado una superproducción de la proteína MDR1. Contrariamente a lo que ocurre con las proteínas bacterianas ABC, construidas con 4 subunidades discretas, los 4 dominios ABCB1 de los mamíferos se fusionan en una proteína única de 170 000 MW.

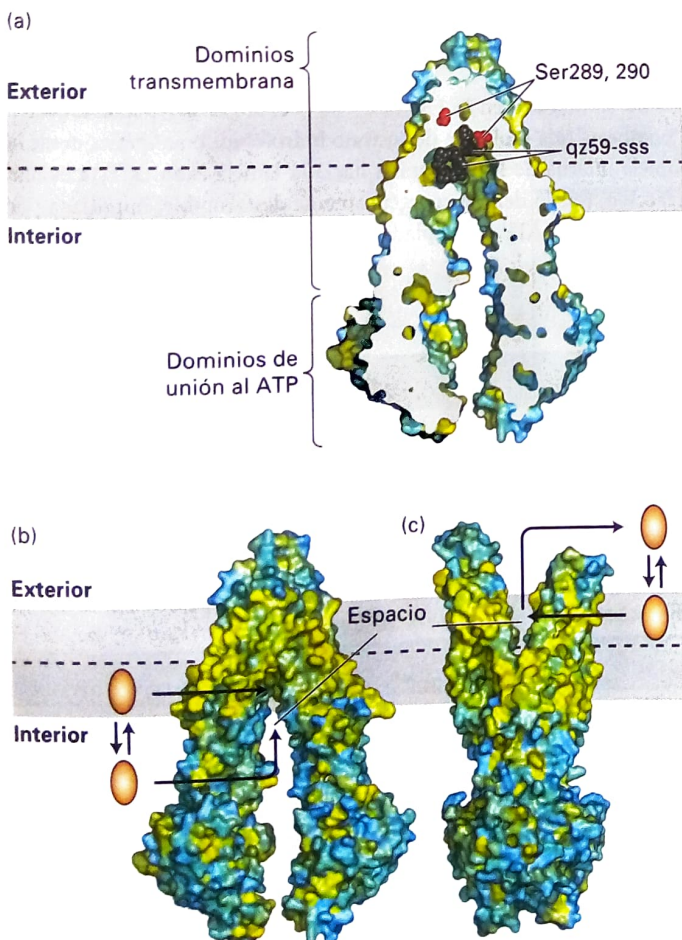


Figura 11-15 El transportador multifármaco ABCB1 (MDR1): estructura y modelo de exportación de ligando. (a) Corte transversal a través del centro de una proteína ABCB1 unida a dos moléculas de un fármaco análogo qz59-sss (negro), que revela la localización central del sitio de unión al ligando con relación a la bicapa fosfolipídica: la cavidad central de unión al ligando se encuentra próxima a la interfase entre ambas lamelas de la membrana. Durante el transporte, esta cavidad de unión queda alternativamente expuesta a la superficie exoplasmática y citosólica de la membrana. Las serinas 289 y 290 afectan la especificidad por el ligando del transportador y se muestran como esferas rojas, para resaltar su yuxtaposición al ligando unido. Los residuos de superficie están coloreados en amarillo para denotar hidrofobicidad y en azul para denotar hidrofiliidad de los aminoácidos. (b) Estructura tridimensional de la ABCB1 con su sitio de unión al ligando que enfrenta el interior hacia el citosol. En esta conformación, un ligando hidrofílico puede unirse directamente desde el citosol. Un ligando más hidrofóbico puede distribuirse en la lamela interna de la membrana plasmática y entrar luego en el sitio de unión al ligando a través de un espacio en la proteína que es accesible directamente al núcleo hidrofóbico de la lamela interna. (c) Modelo para la estructura de la ABCB1 con su sitio de unión al ligando que enfrenta el exterior, sobre la base de las estructuras de proteínas bacterianas ABC homólogas. Cuando el transportador asume esta conformación, el ligando puede difundir a la lamela exoplasmática o directamente hacia el medio extracelular acuoso. (Tomado de D. Gutman y cols., 2009, *Trends Biochem. Sci.* 35:36-42. Estructuras tomadas de S. G. Aller y cols., 2009, *Science*, 323:1718-1722.)

Estos sustratos de la ABCB1 de los mamíferos son, esencialmente, moléculas planas, liposolubles, con una o más cargas positivas; todas compiten entre sí por el transporte, lo que sugiere que se unen al mismo sitio o sitios que se superponen en la proteína. Muchas sustancias transportadas por la ABCB1 difunden desde el medio extracelular a través de la membrana plasmática, sin la ayuda de proteínas de transporte, hacia el citosol celular, donde bloquean varias funciones de la célula. Dos fármacos de este tipo son la colchicina y la vinblastina, que bloquean el ensamblaje de los microtúbulos (Cap. 18). La exportación impulsada por ATP de estos fármacos, por la MDR1, reduce su concentración en el citosol. Como resultado, se necesita una concentración de fármaco extracelular mucho más elevada para eliminar las células que expresen ABCB1 que la que se requeriría para no hacerlo. La ABCB1 es una bomba impulsada por ATP de pequeñas moléculas que ha sido demostrada en liposomas que contienen la proteína purificada. Diferentes sustancias aumentan la actividad de ATPasa de estos liposomas de modo dependiente de la dosis, en concordancia con su capacidad para ser transportadas por ABCB1.

Las estructuras tridimensionales de ABCB1, junto con las de los transportadores bacterianos ABC homólogos, revelaron su mecanismo de transporte, así como su capacidad para unir y transportar un amplio espectro de sustratos hidrofílicos e hidrofóbicos (Fig. 11-15). Los 2 dominios T forman un sitio de unión en el centro de la membrana que alterna entre una orientación que enfrenta el interior (Fig. 11-15b) y el exterior (Fig. 11-15c). La alternancia entre estos dos estados conformacionales de la proteína es impulsada por la unión de ATP a las 2 subunidades A y la hidrólisis posterior a ADP y Pi, pero no se conoce con precisión el modo en que esto sucede.

La cavidad de unión al sustrato, formada por ABCB1, es grande. Parte de los aminoácidos que recubren la cavidad tienen cadenas laterales aromáticas, principalmente tirosina y fenilalanina, lo que permite que la ABCB1 se una a múltiples tipos de ligandos hidrofóbicos. Otros segmentos de la cavidad están recubiertos por residuos hidrofílicos, y esto permite que se unan moléculas hidrofílicas o anfipáticas. En la conformación que mira hacia la cara interna, el sitio de unión se abre directamente a las soluciones acuosas que lo rodean, permitiendo que

las moléculas hidrofílicas entren al sitio de unión directamente desde el citosol. Existe una brecha en la proteína accesible directamente desde el núcleo hidrofóbico de la lamela interna de la bicapa de la membrana; esto posibilita el ingreso de las moléculas hidrofóbicas al sitio de unión, directamente desde la lamela interna de la bicapa fosfolipídica (Fig. 11-15b). Después de producido el cambio de conformación impulsado por ATP que mira hacia el exterior, las moléculas pueden salir del sitio de unión en la lamela de la membrana exoplasmática o directamente hacia el medio extracelular (Fig. 11-15c).

Actualmente, se reconocen aproximadamente 50 proteínas de transporte ABC en los mamíferos (Cuadro 11-3). Varias se expresan en abundancia en el hígado, los intestinos y el riñón –sitios donde se eliminan los productos tóxicos naturales y los productos de desecho del organismo–. Los sustratos de estas proteínas ABC incluyen azúcares, colesterol, ácidos biliares, fosfolípidos, péptidos, proteínas, toxinas y sustancias extrañas. La función normal de ABCB1 probablemente consista en transportar varias toxinas naturales y metabólicas hacia la bilis o la luz intestinal para que se excreten en la orina que se está formando en los riñones. Durante el transcurso de la evolución, la ABCB1 parece haber adquirido la capacidad de transportar fármacos cuyas estructuras son similares a las de estas toxinas endógenas. Los tumores derivados de los tipos celulares que expresan MDR, como los hepatomas (cánceres hepáticos), con frecuencia, son resistentes a casi todos los agentes quimioterapéuticos; por lo tanto, resultan difíciles de tratar, presumiblemente, porque los tumores exhiben una expresión elevada de ABCB1 o una proteína relacionada con ABC.

Ciertas proteínas ABC “voltean” fosfolípidos y otros sustratos liposolubles desde una lamela de la membrana hacia la otra

Como se muestra en la Figura 11-5b y c, la ABCB1 puede mover o “bombear” una molécula de sustrato hidrofóbica o anfipática desde la lamela interna de la membrana hacia la lamela externa. Esta es una reacción, por lo demás, energéticamente desfavorable, impulsada por la actividad de ATPasa acoplada de la proteína. El apoyo para este –así

Cuadro 11-3 Proteínas ABC humanas seleccionadas			
Proteína	Expresión en tejidos	Función	Enfermedad causada por la proteína defectuosa
ABCB1 (MDR1)	Suprarrenal, riñón, cerebro	Exporta sustancias lipofílicas	
ABCB4 (MDR2)	Hígado	Exporta fosfatidilcolina a la bilis	
ABCB11	Hígado	Exporta sales biliares a la bilis	
CFTR	Tejido exocrino	Transporta iones Cl	Fibrosis quística
ABCD1	Ubicua en la membrana de los peroxisomas	Influencia la actividad de las enzimas de los peroxisomas que oxidan ácidos grasos de cadenas muy largas	Adrenoleucodistrofia (ADL)
ABCG5/8	Hígado, intestino	Exporta colesterol y otros esteroides	β-sitosterolemia
ABCA1	Ubicua	Exporta colesterol y fosfolípidos para la captación a lipoproteínas de alta densidad (HDL)	Enfermedad de Tangier

denominado— modelo de *flipasa* de transporte por ABCB1 proviene de experimentos realizados en la ABCB4 (llamada originalmente MDR2), una proteína homóloga a la ABCB1, presente en la región de la membrana plasmática de los hepatocitos que vira hacia los canalículos biliares. La ABCB4 mueve fosfatidilcolina desde la lamela citosólica hacia la exoplasmática de la membrana plasmática para la liberación posterior hacia la bilis, en combinación con el colesterol y los ácidos biliares, que son transportados por otros miembros de la familia ABC. Varios otros miembros de la superfamilia ABC participan en la exportación celular

de varios lípidos, presumiblemente, por mecanismos similares a los de la ABCB1 (véase el Cuadro 11-3).

Se sospechó inicialmente que la ABCB4 tenía actividad de *flipasa* de fosfolípidos porque los ratones que presentaban mutaciones con pérdida de la función en el gen *ABCB4* exhibían defectos en la secreción de fosfatidilcolina hacia la bilis. Para determinar directamente si la ABCB4 —en efecto— era una *flipasa*, los investigadores llevaron a cabo experimentos en una población homogénea de vesículas purificadas aisladas a partir de mutantes de levaduras especiales con ABCB4

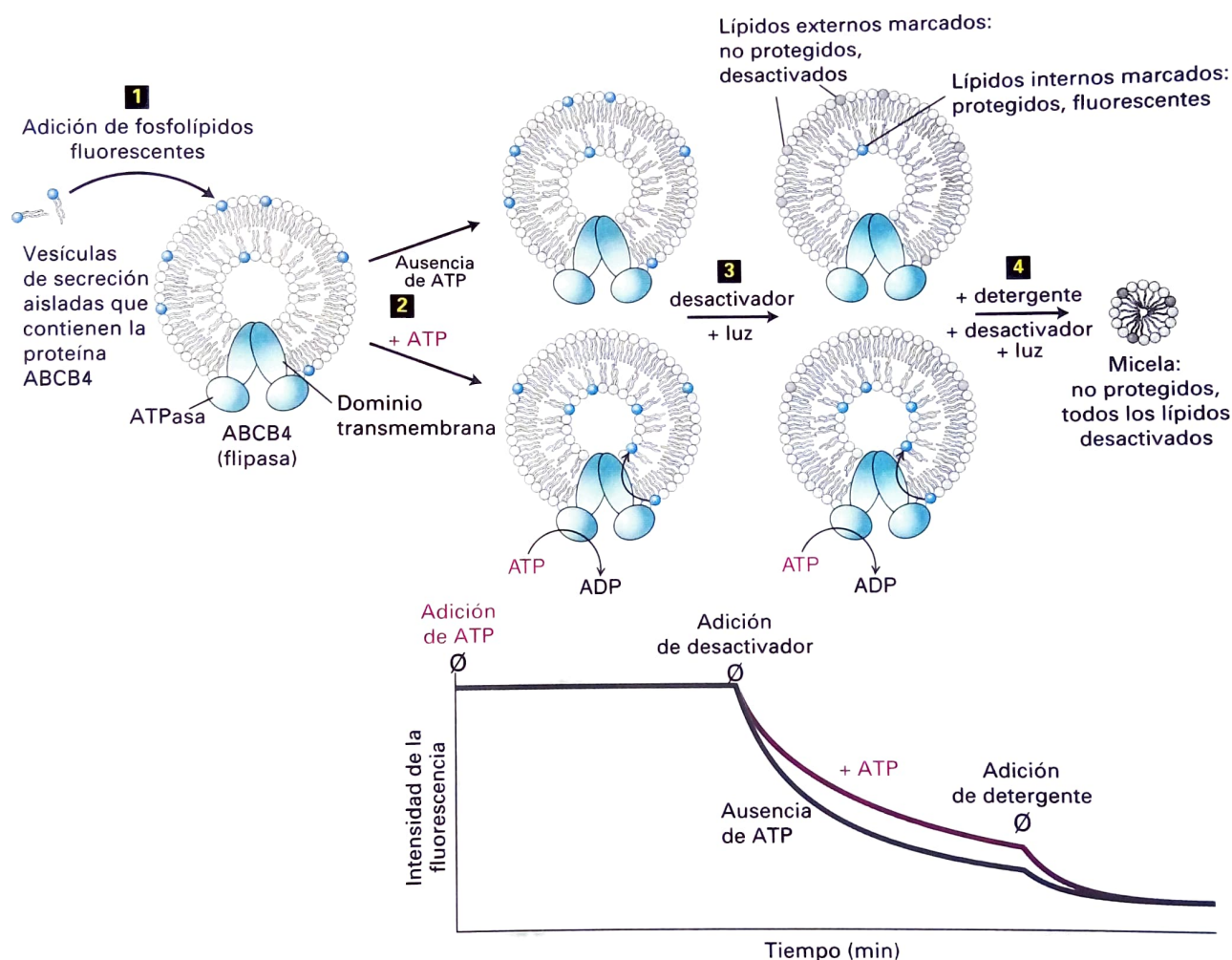


FIGURA EXPERIMENTAL 11-16 Ensayo de desactivación de la fluorescencia in vitro que puede detectar actividad de la flippasa de fosfolípidos de ABCB4.

Una población homogénea de vesículas secretoras que contienen la proteína ABCB4 se obtuvo introduciendo el cDNA que codifica la ABCB4 de mamífero a una mutante de levadura sensible a la temperatura sec, de modo tal que la ABCB4 se localizara intracelularmente en vesículas del retículo endoplasmático en su orientación normal y con la cara citosólica de las vesículas enfrentando el exterior (véase la Fig. 14-4). Paso 1: los fosfolípidos sintéticos que contienen un grupo de la cabeza modificado con fluorescencia, sintético, (en azul) se incorporaron primero a las lamelas citosólicas externas de las vesículas purificadas. Paso 2: si ABCB4 actuara como una flippasa, entonces al adicionar ATP al exterior de las vesículas, una pequeña fracción de los fosfolípidos marcados que enfrentan el exterior pasarían a la lamela interna. Paso 3: el cambio de lamela se detectaría al añadir un compuesto que se desactiva, impermeable en

la membrana, denominado ditionita, al medio que rodeara las vesículas. La ditionita reacciona con el grupo fluorescente de la cabeza destruyendo su capacidad de fluorescer (gris). En presencia del desactivador, solo el fosfolípido marcado en el ambiente protegido de la lamela interna fluorescería. Después de la adición del agente desactivador, la fluorescencia total disminuye con el tiempo hasta que alcanza un *plateau* en el punto en el cual toda la fluorescencia externa se apaga y solo puede detectarse la fluorescencia del fosfolípido interno. La observación de mayor fluorescencia (menor desactivación), en presencia de ATP y en ausencia de éste, indica que la ABCB4 ha cambiado de lugar parte del fosfolípido marcado al interior. No se muestran aquí vesículas "control" aisladas de células que no expresan ABCB4 y que no exhibieron la actividad de flippasa. Paso 4: la adición de detergente a las vesículas genera micelas y, bajando la fluorescencia a valores basales, hace que todos los líquidos fluorescentes sean accesibles al agente de desactivador. (Adaptado de S. Ruetz y P. Gros, 1994, *Cell* 77:1071.)

en la membrana y con la cara citosólica dirigida hacia el exterior (Fig. 11-16). Después de purificar estas vesículas, los investigadores las marcaron in vitro con un derivado fluorescente de la fosfatidilcolina. El ensayo de desactivación de la fluorescencia, que se describe en la Figura 11-16, se empleó para demostrar que las vesículas que contenían ABCB4 exhibían una actividad de flipasa dependiente del ATP.

El regulador transmembrana ABC en la fibrosis quística (CFTR) es un canal de cloro, no una bomba

Varias enfermedades genéticas humanas están asociadas con proteínas ABC defectuosas (véase el Cuadro 11-3). La mejor estudiada y la más extendida es la fibrosis quística (FQ). Ésta es provocada por una mutación en el gen que codifica el *regulador transmembrana de la fibrosis quística* (CFTR, también llamado ABCC7). Al igual que otras proteínas ABC, el CFTR tiene 2 dominios T transmembrana y 2 dominios citosólicos A o de unión al ATP. El CFTR contiene 1 dominio R (de regulación) adicional en la cara citosólica; el R une las dos mitades homólogas de la proteína, creando una organización general de dominio de T1-A1-R-T2-A2. Pero el CFTR es una proteína de canal de Cl^- , no una bomba iónica. Se expresa en las membranas apicales de las células epiteliales del pulmón, las glándulas sudoríparas, el páncreas y otros tejidos. Por ejemplo, la proteína CFTR es importante para la recaptación, en las células de las glándulas sudoríparas, del Cl^- que se pierde por sudoración; los bebés con fibrosis quística, si se los lame, con frecuencia tienen sabor “salado” porque esta recaptación se encuentra inhibida.

El canal de Cl^- de CFTR normalmente está cerrado. La apertura del canal se activa por la fosforilación del dominio R por una proteincinasa (PKA, que se analizará en el Cap. 15) que, a su vez, se activa por un incremento del AMP cíclico (cAMP), una pequeña molécula de señalización intracelular. La apertura del canal requiere, además, la unión secuencial de dos moléculas de ATP a los dos dominios A (Fig. 11-17).

 Aproximadamente dos tercios de todos los casos de enfermos que padecen FQ pueden ser atribuidos a una mutación única en el CFTR: la delección de Phe 508 en el dominio de unión A1 al ATP. A la temperatura del organismo, la proteína mutante no puede plegarse

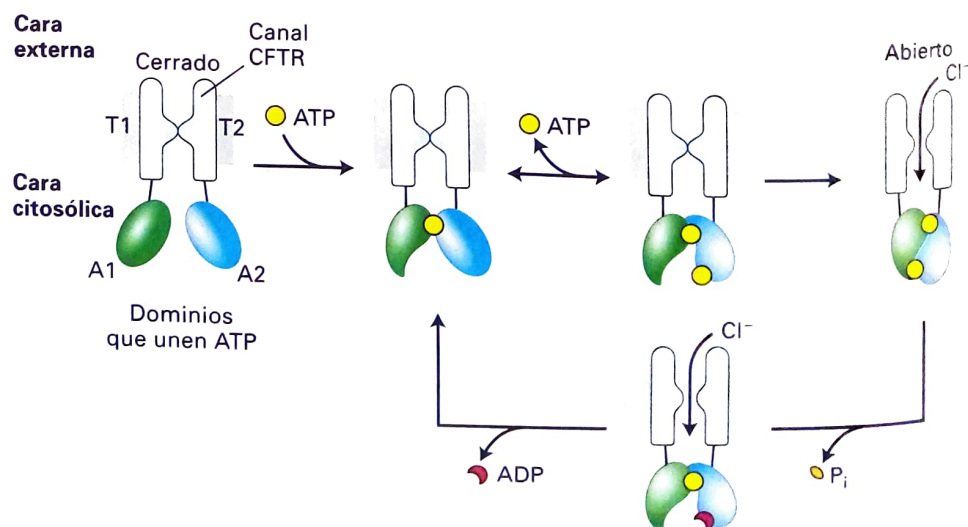
adecuadamente y moverse hacia la superficie celular, donde normalmente actúa. Resulta interesante que si las células que expresan la proteína mutante se incuban a temperatura ambiente, la proteína se acumula normalmente en la membrana plasmática, donde funciona casi tan bien como el canal CFTR de tipo silvestre. Actualmente, están dirigiéndose notables esfuerzos a la identificación de pequeñas moléculas que permitirían que la proteína mutante, en los pacientes con FQ, se desplazara normalmente hacia la superficie celular y, de este modo, se revertirían los efectos de la enfermedad. ■

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 11.3

Las bombas impulsadas por ATP y el ambiente iónico intracelular

- Cuatro clases de proteínas transmembrana acoplan la energía liberada por la hidrólisis del ATP con el transporte de sustancias en contra de sus gradientes de concentración, que requiere energía: las bombas clases P-, V- y F- y las proteínas ABC (véase la Fig. 11-9).
- La acción combinada de las ATPasas Na^+/K^+ clase P de la membrana plasmática y las ATPasas Ca^{2+} homólogas de la membrana plasmática o el retículo sarcoplasmático crea el medio iónico habitual de las células animales: alto K^+ , bajo Ca^{2+} y bajo Na^+ en el citosol; bajo K^+ ; alto Ca^{2+} y alto Na^+ en el líquido extracelular.
- En las bombas clase P, la fosforilación de la subunidad α (catalítica) y los cambios en los estados de conformación son esenciales para el acoplamiento de la hidrólisis de ATP al transporte de iones H^+ , Na^+ , K^+ o Ca^{2+} (véanse las Figs. 11-10 a 11-13).
- Las ATPasas clase V y F, que transportan exclusivamente protones, son complejos grandes de múltiples subunidades que presentan un canal que conduce protones en el dominio transmembrana y sitios de unión al ATP en el dominio citosólico.
- Las bombas de H^+ clase V en las membranas de los lisosomas y endosomas animales, y las membranas de las vacuolas de vegetales cumplen

Figura 11-17 Estructura y función del regulador de transmembrana en la fibrosis quística (CFTR). Interpretación estructural del ciclo dependiente de compuerta de ATP de los canales fosforilados CFTR. El dominio regulatorio (R) (que no se muestra) debe fosforilarse antes de que el ATP sea capaz de sostener la apertura del canal. Un ATP (círculo amarillo) se une estrechamente al dominio A1 (verde). La unión del segundo ATP al dominio A2 (azul) es seguida de la formación de un heterodímero intramolecular estrecho A1-A2 y la lenta apertura del canal. El estado de apertura relativamente estable se desestabiliza por la hidrólisis del ATP unido a A2, al pasar a ADP (medialuna roja) y P_i . La posterior rotura del dímero estrecho A1-A2 conduce al cierre del canal. T = dominio transmembrana; A = dominio de unión al ATP en el citosol (Tomado de D.C. Gatsby y cols., 2006, *Nature* 440:447 and S.G. Aller, 2009, *Science* 323:1718.)



la función de mantener un pH más bajo dentro de los orgánulos que en el citosol que los rodea (véase la Fig. 11-14).

- Todos los miembros de la superfamilia ABC, grande y diversa, de proteínas de transporte contienen 4 dominios centrales: dos dominios transmembrana que forman una vía para el movimiento de solutos y determinan la especificidad del sustrato y dos dominios citosólicos que unen ATP (véase la Fig. 11-15).

- La superfamilia ABC incluye aminoácidos bacterianos y permeasas de azúcares, y aproximadamente 50 proteínas de mamíferos (p. ej., ABCB1, ABCA1), que transportan una amplia variedad de sustratos, incluso toxinas, fármacos, fosfolípidos, péptidos y proteínas hacia el interior y el exterior de la célula.

- Los dos dominios T del transportador multifármaco ABCB1 forman un sitio de unión al ligando en el medio del plano de la membrana; los ligandos pueden unirse directamente desde el citosol o desde la lamela de la membrana interna, a través de un hueco en la proteína.

- Los experimentos bioquímicos demuestran de modo directo que ABCB4 (MDR2) posee actividades flipasa de fosfolípido (véase la Fig. 11-16).

- La CFTR, una proteína ABC, es una proteína canal de Cl^- , no una bomba iónica. La apertura del canal es desencadenada por una fosforilación proteica y por la unión del ATP a los dos dominios A (Fig. 11-17).

11.4 Canales iónicos sin compuerta y potencial de membrana en reposo

Además de las bombas iónicas impulsadas por ATP, que transportan iones en *contra* de sus gradientes de concentración, la membrana plasmática contiene proteínas canal que permiten que los principales iones celulares (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Cl^-) se muevan a través de éstos a diferentes velocidades *a favor* de sus gradientes de concentración. Los gradientes iónicos generados por las bombas y los movimientos selectivos de iones a través de los canales constituyen el principal mecanismo por el cual una diferencia de voltaje, o potencial eléctrico, se genera a través de la membrana plasmática. En otras palabras, las bombas iónicas impulsadas por ATP generan diferencias en las concentraciones iónicas a través de la membrana plasmática, y los canales iónicos utilizan estos gradientes de concentración para generar un potencial eléctrico estrechamente controlado a través de la membrana (véase la Fig. 11-3).

En todas las células, la magnitud de este potencial eléctrico, por lo general, es ~ 70 milivoltios (mV), con la cara citosólica *dentro* de la membrana celular siempre *negativa* con respecto a la cara exoplasmática. Este valor no parece muy probable hasta que consideramos que la distancia es de solamente $\sim 3,5$ nm. Así, el grosor de la membrana plasmática es de $0,07$ V gradiente de voltaje a través de la membrana plasmática es de $0,07$ V por $3,5 \times 10^{-7}$ cm, ¡o 200 000 voltios por centímetro! (Para apreciar el significado de esto, considere que la transmisión de las líneas de alto voltaje para la electricidad emplean gradientes de aproximadamente 200 000 voltios por kilómetro, ¡ 10^5 veces menos!)

Los gradientes iónicos y el potencial eléctrico a través de la membrana plasmática desempeñan funciones cruciales en muchos pro-

cesos biológicos. Como se notó anteriormente, un incremento en la concentración de Ca^{2+} citosólico es una señal de regulación importante, que inicia la contracción de las células musculares y desencadena, en muchas células, la secreción de proteínas, como las enzimas digestivas desde las células del páncreas. En numerosas células animales, la fuerza combinada del gradiente de concentración de Na^+ y el potencial eléctrico de la membrana impulsan la captación de aminoácidos y de otras moléculas en contra de sus gradientes de concentración, por proteínas de simporte y antiporte (véanse la Fig. 11-3 y la Sección 11.5). Más aún, la señalización eléctrica en las células nerviosas depende de la apertura y el cierre de canales iónicos en respuesta a los cambios del potencial eléctrico de la membrana (Cap. 22).

Aquí analizamos el origen del potencial eléctrico de la membrana en las células no neuronales en reposo, denominado con frecuencia el “potencial de reposo” de las células; el modo en el que los canales iónicos median el movimiento selectivo iónico a través de una membrana y las técnicas experimentales útiles para caracterizar las propiedades funcionales de las proteínas canal.

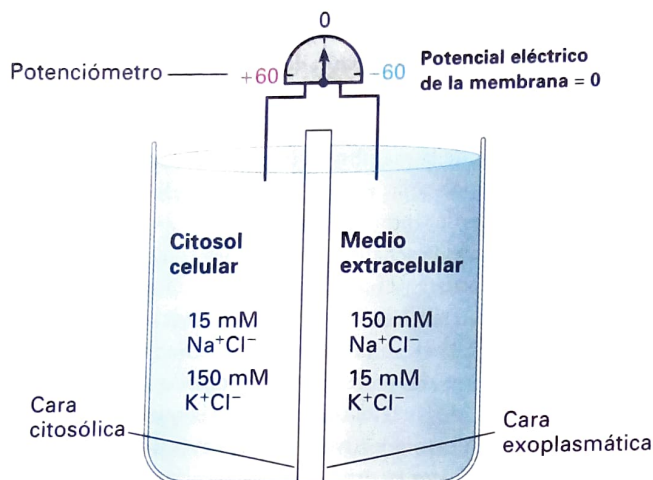
El movimiento selectivo de los iones crea un gradiente eléctrico a través de la membrana

Para ayudar a explicar el modo en que puede surgir el potencial eléctrico a través de la membrana plasmática, consideraremos en primer término un conjunto de sistemas experimentales simplificados en los cuales una membrana separa una solución 150 mM de $\text{NaCl}/15$ mM KCl (similar al medio extracelular que rodea las células de los *Metazoos*) a la derecha de una solución 15 mM de $\text{NaCl}/150$ mM KCl (similar a la del citosol) a la izquierda (Fig. 11-18a). Se conecta un potenciómetro (voltímetro) a ambas soluciones para medir cualquier diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana. Si la membrana fuera impermeable a todos los iones, no fluirían iones a través de ella. Inicialmente, ambas soluciones contienen un número igual de iones con carga positiva y negativa. Más aún, no habrá diferencia de voltaje o gradiente de potencial eléctrico a través de la membrana, como se observa en la Figura 11-18a.

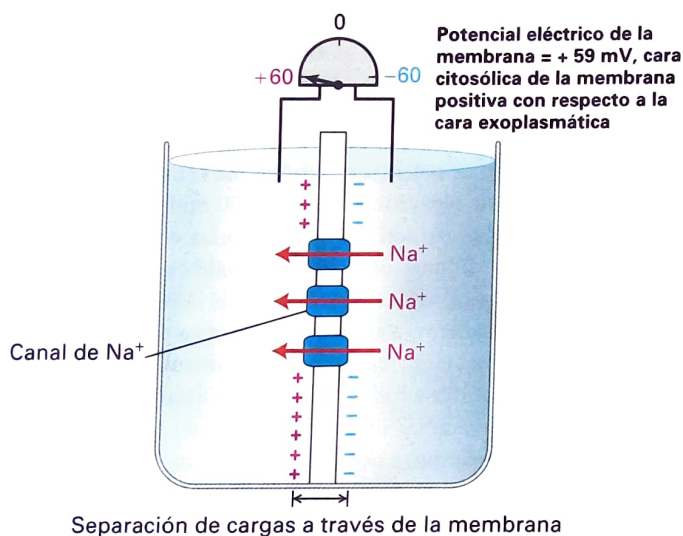
Supongamos ahora que la membrana contiene proteínas canal para Na^+ que acomodan los iones Na^+ pero excluyen los iones K^+ y Cl^- (Fig. 11-18b). Entonces los iones Na^+ tienden a moverse a favor de su gradiente de concentración desde el lado derecho hacia el izquierdo, lo que deja un exceso de iones Cl^- negativos, en comparación con los iones Na^+ del lado derecho, y genera un exceso de iones Na^+ , en comparación con los iones Cl^- en el lado izquierdo. El exceso de Na^+ a la izquierda y de Cl^- a la derecha permanece cerca de las superficies respectivas de la membrana porque el exceso de cargas positivas a un lado de la membrana es atraído por el exceso de cargas negativas al otro lado. La separación resultante de carga a través de la membrana constituye un potencial eléctrico o voltaje con el lado izquierdo (citosólico) de la membrana, con un exceso de carga positiva con respecto al derecho.

A medida que más iones Na^+ se mueven a través de los canales atravesando la membrana, la magnitud de esta diferencia de carga (es decir, voltaje) se incrementa. Sin embargo, el movimiento continuo de derecha a izquierda de los iones Na^+ es inhibido, finalmente, por la repulsión mutua entre el exceso de cargas positivas (Na^+), acumuladas en el lado izquierdo de la membrana, y la atracción de iones Na^+ al exceso de cargas negativas acumuladas en el lado de-

(a) Membrana impermeable a Na^+ , K^+ y Cl^-



(b) Membrana permeable solo al Na^+



(c) Membrana permeable solo al K^+

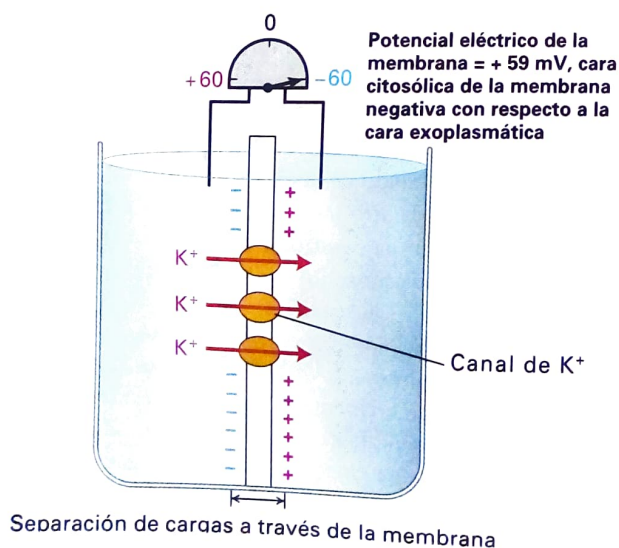


FIGURA EXPERIMENTAL 11-18 La generación de un potencial eléctrico transmembrana (voltaje) depende del movimiento selectivo de los iones a través de una membrana semipermeable. En este sistema experimental, una membrana separa una solución 15 mM de NaCl /150 mM KCl (izquierda) de una solución 150 mM NaCl /15 mM KCl (derecha); estas concentraciones iónicas son similares a las presentes en el citosol y la sangre, respectivamente. Si la membrana que separa ambas soluciones es impermeable a todos los iones (a), no habrá movimiento eléctrico en el potenciómetro que conecta los dos soluciones. Si la membrana es selectivamente permeable solo a los iones Na^+ (b) o K^+ (c), la difusión de iones a través de sus canales respectivos conduce a una separación de cargas a través de la membrana. En equilibrio, el potencial de membrana provocado por la separación de cargas es igual al potencial de Nernst (E_{Na}) o E_{K} registrado en el potenciómetro. Véase el texto para ampliar la información.

recho. El sistema rápidamente alcanza un punto de equilibrio en el cual los dos factores opuestos que determinan el movimiento de los iones Na^+ —el potencial eléctrico de la membrana y el gradiente de concentración iónica— se equilibran entre sí. En equilibrio, no hay movimiento neto de iones Na^+ a través de la membrana. Así, esta membrana, al igual que todas las membranas biológicas, actúa como un *condensador* —un dispositivo que consiste en una lámina delgada de un material no conductor (el interior hidrofóbico) rodeado a ambos lados por un material conductor de la electricidad (los grupos de las cabezas polares de los fosfolípidos y los iones en la solución acuosa que las rodea) que pueden almacenar cargas positivas de un lado y negativas del otro.

Si una membrana es permeable solo a los iones Na^+ , entonces en equilibrio, el potencial eléctrico medido a través de la membrana iguala al potencial de equilibrio del Na^+ en voltios, E_{Na} . La magnitud de E_{Na} es dada por la *ecuación de Nernst*, derivada de los principios básicos de la fisicoquímica:

$$E_{\text{Na}} = \frac{RT}{ZF} \ln \frac{[\text{Na}_{\text{der}}]}{[\text{Na}_{\text{izq}}]} \quad (11-2)$$

donde R (la constante de los gases) = 1,987 cal/(grados·mol), o 8,28 joules/(grados · mol); T (la temperatura absoluta en grados Kelvin) = 293 °K a 20 °C; Z (la carga, también denominada valencia) aquí = +1; F (la constante de Faraday) = 23,062 cal/(mol · V) o 96 000 coulombs/(mol · V); $[\text{Na}_{\text{izq}}]$ y $[\text{Na}_{\text{der}}]$ son las concentraciones de Na^+ a los lados izquierdo y derecho, respectivamente, en equilibrio. Por convención, el potencial se expresa como la cara *citosólica* de la membrana con relación a la cara *exoplasmática*, y la ecuación se escribe con la concentración de los iones en la solución extracelular (aquí, el lado derecho de la membrana), ubicada en el numerador; y la del citosol, en el denominador.

A 20 °C, la Ecuación 11-2 se reduce a:

$$E_{\text{Na}} = 0,059 \log_{10} \frac{[\text{Na}_{\text{der}}]}{[\text{Na}_{\text{izq}}]} \quad (11-3)$$

Si $[\text{Na}_{\text{der}}]/[\text{Na}_{\text{izq}}] = 10$, un cociente de concentraciones de diez, como en la Figura 11-18b, entonces $E_{\text{Na}} = +0,059 \text{ V}$ (o + 59 mV), con el lado izquierdo, citosólico, positivo con respecto al lado derecho, exoplasmático.

Si la membrana fuera permeable solo a iones K^+ y no a iones Na^+ o Cl^- , una ecuación similar describiría el potencial de equilibrio de potasio E_K :

$$E_K = 0,059 \log_{10} \frac{[K_{\text{ext}}]}{[K_{\text{int}}]} \quad (11-4)$$

La *magnitud* del potencial eléctrico de membrana es la misma (59 mV para una diferencia de 10 veces en la concentración de iones) excepto que el lado izquierdo, citosólico, ahora será *negativo* con respecto al derecho (Fig. 11-18c), opuesto a la polaridad obtenida a través de la membrana selectivamente permeable a los iones Na^+ .

El potencial de membrana en reposo en las células animales depende en gran medida del flujo de iones K^+ a través de los canales K^+ abiertos

Las membranas plasmáticas de las células animales contienen muchos canales abiertos K^+ , pero pocos canales abiertos de Na^+ , Cl^- o Ca^{2+} . Como resultado de ello, gran parte del movimiento iónico a través de la membrana plasmática es de K^+ , desde el *interior hacia el exterior*, impulsado por el gradiente de concentración de K^+ , que deja un exceso de cargas *negativas* en la cara citosólica de la membrana plasmática y crea un exceso de cargas *positivas* en la cara exoplasmática, similar al sistema experimental que se muestra en la **Figura 11-18c**. Este eflujo de iones K^+ a través de estos canales, denominados **canales de K^+ en reposo**, es el principal determinante del potencial de membrana negativo en el interior. Al igual que todos los canales, éstos alternan entre un estado abierto y uno cerrado (Fig. 11-2), pero como su apertura y cierre no se ven influidos por el potencial de membrana o por pequeñas moléculas de señalización, estos canales *no son de compuerta*. Los varios canales de compuerta de las células nerviosas (**Cap. 22**) se abren solo en respuesta a ligandos específicos o a cambios en el potencial de la membrana.

Cuantitativamente, el potencial de membrana en reposo habitual de -70 mV está cerca del potencial de equilibrio del potasio, calculado a partir de la ecuación de Nernst, y las concentraciones de K^+ en las células y el medio que las rodea, que se muestra en el **Cuadro 11-2**. Habitualmente, el potencial es más bajo (menos negativo) que el calculado a partir de la ecuación de Nernst, por la presencia de unos pocos canales abiertos de Na^+ . Estos canales abiertos de Na^+ permiten el *influjo* neto de iones Na^+ , lo que hace que la cara citosólica de la membrana plasmática sea más positiva, es decir, menos negativa que la predicha por la ecuación de Nernst para el K^+ . El gradiente de concentración de K^+ , que impulsa el flujo de iones a través de los canales de K^+ en reposo, se genera por la Na^+/K^+ ATPasa descrita anteriormente (véanse las **Figs. 11-3 y 11-13**). En ausencia de esta bomba, o cuando está inhibida, el gradiente de concentración de K^+ no puede mantenerse, la magnitud del potencial de membrana cae a cero y la célula finalmente muere.

Aunque los canales de K^+ en reposo desempeñan la función dominante en la generación del potencial eléctrico a través de la membrana plasmática de las células animales, esto no es lo que ocurre en las bacterias, vegetales y hongos. El potencial de membrana con el interior negativo, en las células vegetales y los hongos, se genera por el transporte de protones cargados positivamente (H^+) hacia el exterior de la célula, por medio de bombas protónicas impulsadas por ATP, un proceso semejante al que se produce en las membranas de los lisosomas carentes de canales de Cl^- (véase la **Fig. 11-14a**): cada H^+ bombeado hacia el ex-

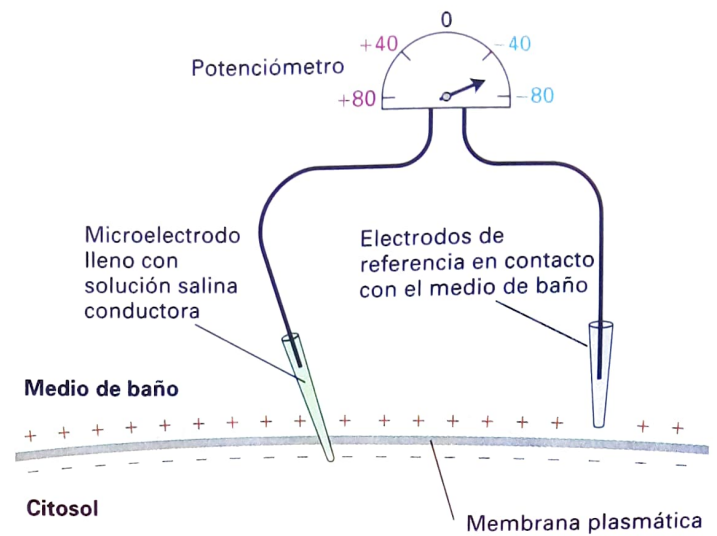


FIGURA EXPERIMENTAL 11-19 Puede medirse el potencial eléctrico a través de la membrana plasmática de las células vivas. Se inserta un microelectrodo construido con un tubo de vidrio de un diámetro, muy delgado, con un líquido conductor –como una solución de KCl – en una célula, de modo tal que la membrana de la superficie se selle alrededor de la punta del electrodo. Se coloca un electrodo de referencia en la solución de baño. El potenciómetro que conecta los dos electrodos registra el potencial, en este caso -60 mV, con la cara citosólica *negativa* con respecto a la cara exoplasmática de la membrana. Se registra una diferencia de potencial solo cuando el microelectrodo se inserta en la célula; no se detecta diferencia de potencial si el microelectrodo se encuentra en la solución de baño.

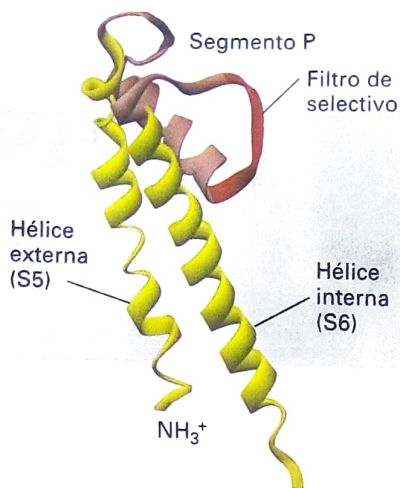
terior de las células deja atrás un ion Cl^- , lo que genera un gradiente de potencial eléctrico (cara citosólica negativa) a través de la membrana. En las bacterias aerobias, el potencial negativo en el interior de la célula se origina por un bombeo de los protones hacia el exterior durante el transporte electrónico, en un proceso similar al del bombeo de protones en las membranas internas de las mitocondrias, que se analizará en detalle en el **Capítulo 12** (véase la **Fig. 12-16**).

El potencial a través de la membrana plasmática de las células grandes puede ser medido por un microelectrodo insertado dentro de la célula y un electrodo de referencia ubicado en el líquido extracelular. Los dos están conectados a un potenciómetro capaz de medir pequeñas diferencias de potencial (Fig. 11-19). El potencial a través de la superficie de la membrana de la mayoría de las células animales, por lo general, no varía en el tiempo. Por el contrario, las neuronas y las células musculares –los principales tipos de células con actividad eléctrica– experimentan cambios controlados en su potencial de membrana, como analizaremos en el **Capítulo 22**.

Los canales iónicos son selectivos para ciertos iones en virtud de un “filtro selectivo” molecular

Todos los canales iónicos exhiben especificidad por iones particulares: los canales de K^+ permiten que los K^+ pero no los iones Na^+ muy relacionados ingresen, mientras que los canales de Na^+ admiten los Na^+ pero no los K^+ . La determinación de la estructura tridimensional de un canal bacteriano de K^+ mostró, en primer término, de qué modo se logra esta exquisita selectividad iónica. Las comparaciones de las secuencias y estructuras de otros canales de K^+ de organismos tan distintos como bacterias, hongos y

(a) Subunidad individual



(b) Canal tetramérico

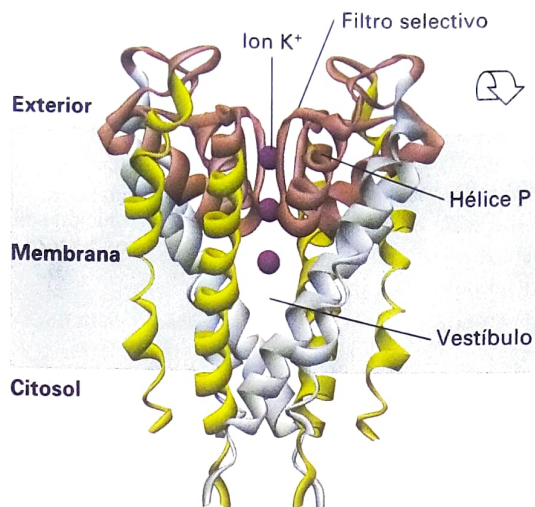


FIGURA 11-20 La estructura de un canal de K^+ en reposo de la bacteria *Streptomyces lividans*. Todas las proteínas canal de K^+ son tetrámeros compuestos por cuatro subunidades idénticas, cada una de las cuales contienen dos hélices α conservadas que se extienden en la membrana, denominadas por convención S5 y S6, y un segmento P más corto o segmento poro. (a) Una de las subunidades, en una vista lateral, con sus características estructurales clave indicadas. (b) El canal tetramérico completo en vista lateral (izquierda) y la parte superior o extremo extracelular (derecha). Los segmentos P (rosado) se localizan cerca de la superficie exoplasmática y conectan las hélices α S5 y S6 (amarillo y

plata); consisten en dos "torrecillas" no helicoidales que cubren la parte superior del poro; una hélice α corta y un bucle extendido que sobresale hacia la parte más estrecha del poro y forma el filtro de selectividad iónica. Este filtro permite que pase el K^+ (esferas púrpura) pase, pero no otros iones. Más allá del filtro, se encuentra la cavidad central o vestíbulo tapizado por las hélices internas α o S6. La subunidades en los canales K^+ con compuerta que se abren y se cierran en respuesta a estímulos específicos contienen hélices transmembrana adicionales que no se muestran aquí; éstas se analizan en el Capítulo 22. (Vease Y. Zhou y cols., 2001 *Nature* 414:43.)

seres humanos estableció que todos comparten una estructura en común y, probablemente, hayan evolucionado de un solo tipo de canal proteico.

Al igual que otros canales de K^+ , los canales de K^+ de las bacterias están contruidos por cuatro subunidades transmembrana idénticas dispuestas de modo simétrico alrededor de un poro central (Fig. 11-20). Cada subunidad contiene dos hélices α que se expanden en la membrana (S5 y S6) y un segmento P (poro) corto que penetra parcialmente en la bicapa de la membrana, desde la superficie exoplasmática. En el canal de K^+ tetramérico, las ocho hélices transmembrana α (dos de cada subunidad) forman un cono invertido, lo que genera una cavidad llena de agua denominada *vestíbulo*, en la porción central del canal que se extiende a mitad de camino, a través de la membrana, hacia el lado citosólico. Cuatro bucles extendidos que son parte de los cuatro segmentos P forman el *filtro iónico selectivo* real, en la parte estrecha del poro, cerca de la superficie exoplasmática, por encima del vestíbulo.

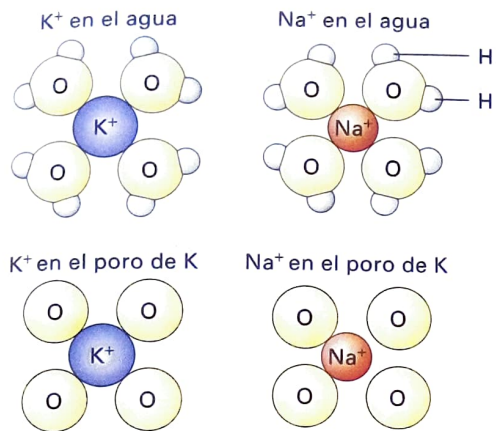
Varias evidencias relacionadas avalan el papel de los segmentos P en la selección de los iones. En primer término, la secuencia de aminoácidos del segmento P es homóloga en todos los canales de K^+ conocidos y es diferente de la de los otros canales iónicos. En segundo lugar, la mutación de ciertos aminoácidos en este segmento altera la capacidad de un canal de K^+ de distinguir entre Na^+ y K^+ . Finalmente, el reemplazo del segmento P de un canal K^+ de las bacterias por el segmento homólogo de un canal de K^+ de mamífero da como resultado una proteína quimérica que exhibe selectividad normal por el K^+ preferencialmente frente a otros iones. Así, se considera que todos los canales de K^+ emplean el mismo mecanismo para distinguir K^+ con respecto a otros iones.

Los iones Na^+ son más pequeños que los iones K^+ . ¿Cómo, entonces, puede un canal proteico excluir iones Na^+ más pequeños y permitir, no obstante, el paso de iones K^+ de mayor tamaño? La capacidad del filtro

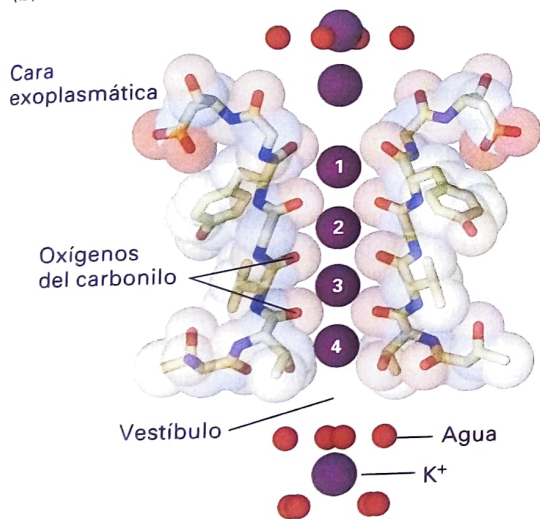
selectivo a los iones para permitir K^+ preferencialmente antes que Na^+ en sus canales K^+ se debe, principalmente, a los oxígenos del esqueleto carbonilo de los residuos localizados en la secuencia Gly-Tyr-Gly, presente en la posición análoga en el segmento P en cada canal K^+ conocido. Cuando un ion K^+ ingresa en el filtro selectivo estrecho —el espacio entre las secuencias filtro del segmento P al que contribuyen cuatro subunidades adyacentes— pierde sus ocho moléculas de agua de hidratación, pero se une con la misma geometría a ocho oxígenos del esqueleto carbonilo, dos del bucle extendido de cada uno de los cuatro segmentos P que recubren el canal (Fig. 11-21a, parte inferior izquierda). De este modo, se requiere poca energía para eliminar las ocho moléculas de agua de hidratación de un ion K^+ y, como resultado, se requiere relativamente poca energía de activación para el paso de iones K^+ hacia el interior del canal, desde una solución acuosa. Un ion Na^+ deshidratado es demasiado pequeño como para unir los ocho oxígenos del carbonilo que recubren el filtro selectivo con la misma geometría que un ion Na^+ , rodeado por sus ocho moléculas normales de agua en la solución acuosa. Como resultado de ello, los iones Na^+ "preferirán" permanecer en el agua, en lugar de ingresar en el filtro de selectividad y, así, el cambio de energía libre para el ingreso de los iones Na^+ al canal es relativamente elevado (Fig. 11-21a, derecha). Esta diferencia en las energías libres favorece el paso de iones K^+ a través del canal, más que el de Na^+ en un factor 1 000. Como el Na^+ y el ion Ca^{2+} deshidratado son más pequeños que el ion K^+ deshidratado, no pueden interactuar adecuadamente con los átomos de oxígeno en el filtro selectivo. Además, puesto que el ion Ca^{2+} tiene dos cargas positivas y une oxígenos del agua más estrechamente que un ion Na^+ o K^+ con una sola carga positiva, se requiere más energía para separar las aguas de hidratación del Ca^{2+} que para hacerlo del K^+ o del Na^+ .

Estudios cristalográficos de rayos X recientes revelan que tanto abierto como cerrado, el canal contiene iones K^+ dentro del filtro selectivo; sin

(a) Los iones K^+ y Na^+ en el poro de un canal de K^+ (vista superior)



(b) Los iones K^+ en el poro de un canal de K^+ (vista lateral)



(c) Movimiento de iones a través del filtro selectivo

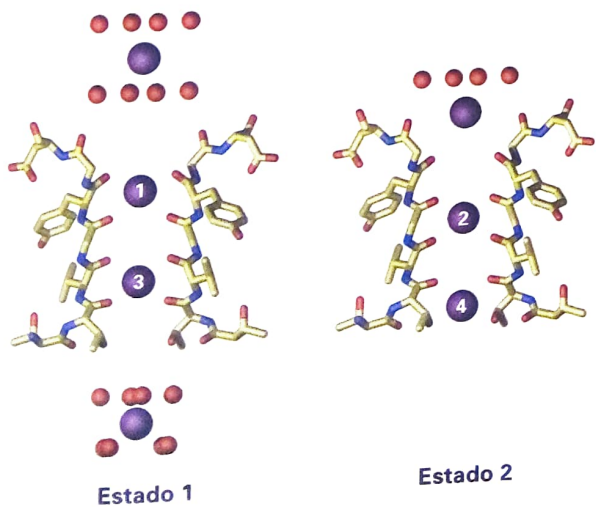


Figura 11-21 Mecanismo de selectividad iónica y transporte en los canales K^+ en reposo. (a) Diagramas esquemáticos de iones K^+ y Na^+ hidratados en reposo. A medida que los iones K^+ pasan a través

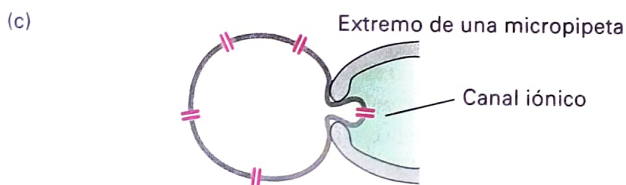
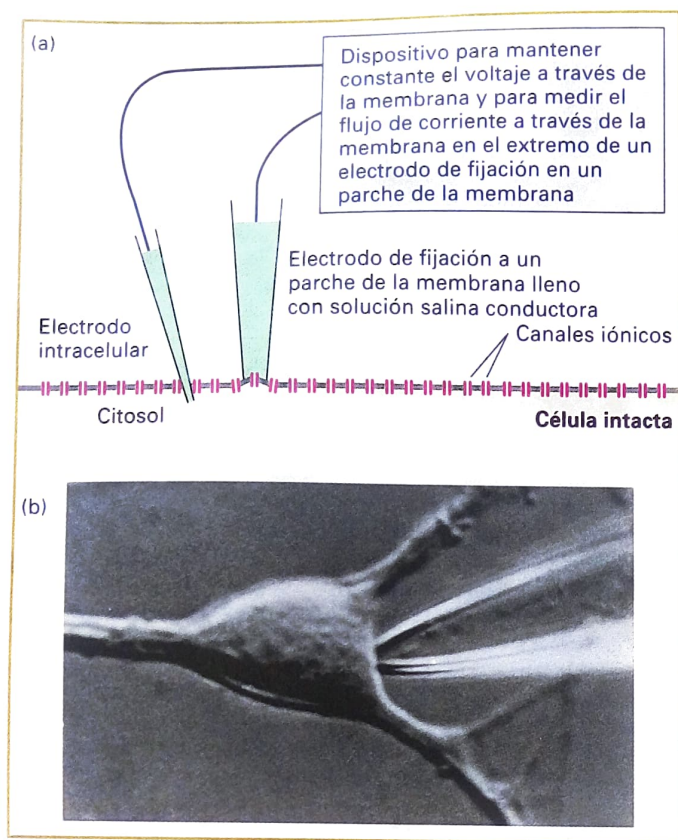
solución y en el poro de un canal K⁺. A medida que las moléculas de agua unidas y se unen a los del filtro de selectividad pierden sus moléculas de agua unidades y se unen a los del esqueleto de ocho carbonilos, cuatro de los cuales (según se muestran) son parte de los aminoácidos conservados en el bucle del filtro de selectividad que tapiza el canal de cada segmento P. Los iones Na⁺ más pequeños con su cubierta más estrecha de moléculas de agua no pueden coordinar perfectamente con los átomos de oxígeno del canal y, por lo tanto, pasan a través de éste solo en raras ocasiones. (b) Mapa de densidad electrónica de alta resolución obtenido a partir de cristalografía de rayos X, que muestra los iones K⁺ (esferas púrpuras) que atraviesan el filtro de selectividad. Solo se observan dos de las subunidades del canal opuestas en diagonal. Dentro del filtro selectivo, cada ion K⁺ no hidratado interactúa con ocho átomos de oxígeno carbonilo (palillos rojos) que recubren el canal, dos de cada una de las cuatro subunidades, como para mimetizar las ocho aguas de hidratación. (c) Interpretación del mapa de densidad electrónica, que muestra los dos estados alternantes por los cuales los iones K⁺ se mueven a través del canal. En el estado 1, numerados desde arriba hacia abajo, desde el lado exoplásmico del canal hacia adentro, puede observarse el ion K⁺ hidratado con sus ocho moléculas de agua unidas, los iones K⁺ en las posiciones 1 y 3, dentro del filtro selectivo, y un ion K⁺ completamente hidratado dentro del vestibulo. Durante el movimiento de K⁺, cada ion en el estado 1 se desplaza hacia adentro y forma el estado 2. Así, en el estado 2, el ion K⁺ que se encuentra en el lado exoplasmático del canal ha perdido cuatro de sus ocho aguas, el ion en la posición 1 —en el estado 1— se ha movido hacia la posición 2, y el ion de la posición 3 —en el estado 1— se ha movido hacia la posición 4. Al pasar del estado 2 al estado 1, el K⁺ en la posición 4 se desplaza hacia el vestibulo y recoge ocho moléculas de agua, mientras que otro ion K⁺ hidratado se desplaza hacia el canal y lo abre; los otros iones K⁺ se mueven un paso hacia abajo. Nótese que los iones K⁺ que se muestran aquí, se movilizan desde el lado exoplasmático del canal hacia el lado citósólico porque es la dirección normal de movimiento de las bacterias. En las células animales, la dirección típica del movimiento de K⁺ es la inversa —desde el interior hacia el exterior. (La parte [a], adaptada de C. Armstrong, 1998, Science 280:56. Las partes [b] y [c], adaptadas de Y. Zhou y cols., Nature 414:43).

éstos, probablemente colapsaría. Se cree que los iones K^+ están presentes en las posiciones 1 y 3 o en las 2 y 4, cada uno rodeado por ocho átomos de oxígeno de carbonilo (Fig. 11-21b y c). Varios iones K^+ se mueven simultáneamente a través del canal, de modo tal que, cuando el ion en la cara exoplasmática —que ha sido parcialmente separado de su agua de hidratación— se mueve a la posición 1, el ion de la posición 2 salta a la posición 3 y el de la posición 4 sale del canal (Fig. 11-21c).

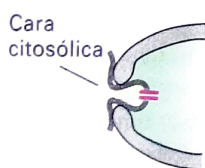
Aunque las secuencias de aminoácidos de los segmentos P en los canales de Na^+ y K^+ difieren en cierta medida, son lo suficientemente similares como para sugerir que la estructura general de los filtros de selectividad iónica son comparables en ambos tipos de canales. Presuntamente, el diámetro del filtro en los canales de Na^+ es lo suficientemente pequeño como para permitir que los iones Na^+ deshidratados se unan a los oxígenos del esqueleto carbonilo, pero impida el ingreso de los iones K^+ de mayor tamaño, aunque la primera estructura tridimensional de un canal de sodio fue determinada a finales de 2011 y el mecanismo de selectividad iónica está en estudio en estos momentos.

La técnica de fijación de membrana permite la medición de los movimientos iónicos a través de canales individuales

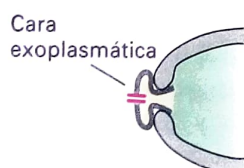
En cierta ocasión, se notó que en la mayoría de las células hay solo un canal o unos pocos canales iónicos por micrómetro cuadrado de membrana plasmática, por lo que resulta posible registrar los movimientos iónicos a través de canales iónicos individuales y medir las velocidades



La fijación en una zona (región) de una célula mide el efecto indirecto de los solutos extracelulares en los canales dentro de un área de la membrana en la célula intacta



Zona (región) desprendida, invertida, que mide los efectos de los solutos intracelulares en los canales en un parche o zona aislada de la membrana



Región desprendida, invertida, en la que se miden los efectos de los solutos extracelulares sobre los canales dentro de una zona aislada

a las cuales éstos se abren, se cierran y conducen iones específicos, mediante el empleo de una técnica conocida como **fijación de membrana** (*patch clamping*) o fijación de voltaje. Como se ilustra en la Figura 11-22, una pipeta diminuta se aplica firmemente sobre la superficie de una célula; el segmento de membrana plasmática comprendida dentro de su extremo contendrá solo uno o pocos canales iónicos. Un dispositivo de registro eléctrico detecta el flujo iónico, medido en forma de corriente eléctrica, a través de los canales; habitualmente, esto ocurre

FIGURA EXPERIMENTAL 11-22 El flujo de corriente a través de los canales iónicos individuales se mide mediante la fijación de membrana.

(a) Disposición experimental básica para la medición del flujo de corriente a través de los canales iónicos individuales en la membrana plasmática de una célula viva. El electrodo lleno con una solución salina conductora de la corriente se aplica con una ligera succión a la membrana plasmática. Su extremo de 0,5 μm de diámetro cubre una región que contiene solo un canal iónico o unos pocos. Un segundo electrodo se inserta, a través de la membrana, en el citosol. Un dispositivo de registro mide el flujo de corriente solamente a través de los canales en ese sector de la membrana plasmática. (b) Fotomicrografía del cuerpo celular de una neurona en cultivo y de la punta de una pipeta que está tocando la membrana celular. (c) Diferentes configuraciones de fijación de la membrana. Regiones aisladas desprendidas son las mejores configuraciones para el estudio de los efectos de diversas concentraciones iónicas sobre los canales y de distintos solutos, como hormonas extracelulares y segundos mensajeros intracelulares (p. ej., cAMP). Una región de membrana invertida, en la que una zona de una célula se forma y luego se invierte con el interior enfrentado al exterior, se utiliza en el experimento de la Figura 11-23. (La parte [b], tomada de B. Sakmann, 1992, *Neuron* 8:513 [Nobel lectura]; también publicado en E. Neher y B. Sakmann, 1992, *Sci. Am.* 266[3]:44. La parte [c], adaptada de B. Hille, 1992, *Ion Channels of excitable Membranes*, 2d ed., Sinauer Associates, p.89.)

en pequeños estallidos cuando el canal se abre. El dispositivo eléctrico "pinza" o fija el potencial eléctrico a través de la membrana, a un valor predeterminado (de allí el término fijación de membranas).

El movimiento de los iones hacia el interior y el exterior, a través de una zona de la membrana, se cuantifica a partir de la cantidad de corriente eléctrica necesaria para mantener el potencial de membrana en un valor "fijo" particular (Fig. 11-22a y b). Para preservar la electroneutralidad y mantener el potencial de membrana constante aun aunque los iones se muevan a través de los canales en esa zona de la membrana, el ingreso de cada ion positivo (p. ej., unión Na^+) a la célula, a través de un canal en esa zona de la membrana, se equilibra con la adición de un electrón al citosol, por medio de un microelectrodo insertado en éste; un dispositivo electrónico mide el número de electrones (corriente) necesario para contraequilibrar el influjo de iones a través de los canales de la membrana. Por el contrario, la salida de cada ion positivo desde la célula (p. ej., unión K^+) se equilibra al quitar un electrón desde el citosol. La técnica de fijación de zonas de la membrana puede emplearse en las células completas o en zonas de la membrana aisladas para medir los efectos de diferentes sustancias y concentraciones iónicas sobre el flujo de iones (Fig. 11-22c).

Los trazos resultantes de la fijación de membrana que se muestran en la Figura 11-23 ilustran el uso de esta técnica para estudiar las propiedades de canales de sodio dependientes de voltaje, con compuerta en la membrana plasmática de las células musculares. Como analizaremos en el Capítulo 22, estos canales normalmente están cerrados en las células musculares en reposo y se abren después de la estimulación nerviosa. Las zonas de la membrana muscular, cada una con un promedio de un canal de Na^+ , se fijaron a un voltaje predeterminado que, en este estudio, era ligeramente inferior al potencial de la membrana en reposo. En estas circunstancias, pulsos transitorios de cargas positivas (iones Na^+) atraviesan la membrana desde la cara exoplasmática hacia la cara citosólica, a medida que los canales individuales de Na^+ se abren y luego se cierran. Cada canal se encuentra completamente abierto o cerrado. A partir de estos trazos, es posible determinar el tiempo que un canal permanece abierto y el flujo de iones a través de éste. Para los canales medidos en la Figura 11-23, el flujo es de aproximadamente 10 millones de iones Na^+ por canal y por segundo, un valor típico para los

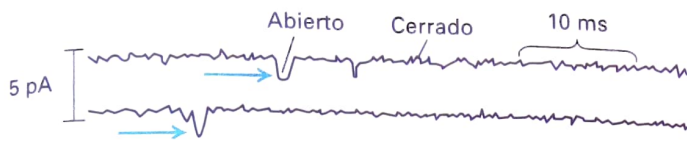


FIGURA EXPERIMENTAL 11-23 El flujo iónico a través de los canales de Na^+ individuales puede calcularse mediante los registros de fijación de membrana. Dos regiones con inversión de la membrana de membranas plasmáticas de músculo fueron fijados a potenciales ligeramente menores que el potencial de reposo de la membrana. El electrodo de fijación contenía NaCl . Los pulsos transitorios de corriente eléctrica en picoamperes (pA), registrados como grandes desviaciones hacia abajo (flechas azules), indican la apertura de un canal de Na^+ y el movimiento de cargas positivas (iones Na^+) hacia adentro a través de la membrana. Las pequeñas desviaciones de corriente representan el ruido de fondo. La corriente promedio a través de un canal abierto es 1,6 pA o $1,6 \times 10^{-12}$ amperes. Como un ampere = 1 coulomb (C) de carga por segundo, esta corriente equivale al movimiento de aproximadamente 9 900 iones Na^+ por canal por milisegundo: ($1,6 \times 10^{-12}$ C/s) (10^{-3} s/ms) (6×10^{23} moléculas/mol) = 96 500 C/mol. (Véase F. J. Sigworth y E. Neher, 1980, *Nature* 287:447).

canales iónicos. El reemplazo del NaCl dentro de la pipeta en esa zona (correspondiente al exterior de la célula) con KCl o cloruro de colina inhibe la corriente a través de los canales, lo que confirma que pueden conducir solo iones Na^+ , no K^+ ni otros iones.

Los canales iónicos nuevos pueden caracterizarse por una combinación de expresión de ovocitos y fijación de la membrana

La clonación de los genes que provocan enfermedades humanas y la secuenciación del genoma humano han permitido identificar muchos genes que codifican proteínas que actúan como canales putativos, incluso 67 proteínas que son canales putativos de K^+ . Una manera de caracterizar la función de estas proteínas consiste en transcribir un cDNA clonado en un sistema libre de células, para producir el mRNA correspondiente. La inyección de este mRNA en ovocitos de rana y las mediciones de *patch clamp* de las proteínas de canal recién sintetizadas, con frecuencia, revelan la función (Fig. 11-24). Este enfoque experimental resulta de especial utilidad, ya que los ovocitos de rana, por lo general, no expresan ninguna proteína de canal sobre su membrana de superficie, de modo que solo el canal en estudio está presente en la membrana. Además, dado el gran tamaño de los ovocitos de rana, los estudios de *patch clamping* son técnicamente más sencillos de llevar a cabo en éstos que en células más pequeñas.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 11.4

Los canales iónicos sin compuerta y el potencial de reposo de la membrana

- Existe un potencial eléctrico (voltaje) con interior negativo de aproximadamente -70 mV a través de la membrana plasmática de todas las células.
- El potencial de membrana en reposo de las células animales es el resultado de la acción combinada de la bomba de Na^+/K^+ impulsada por

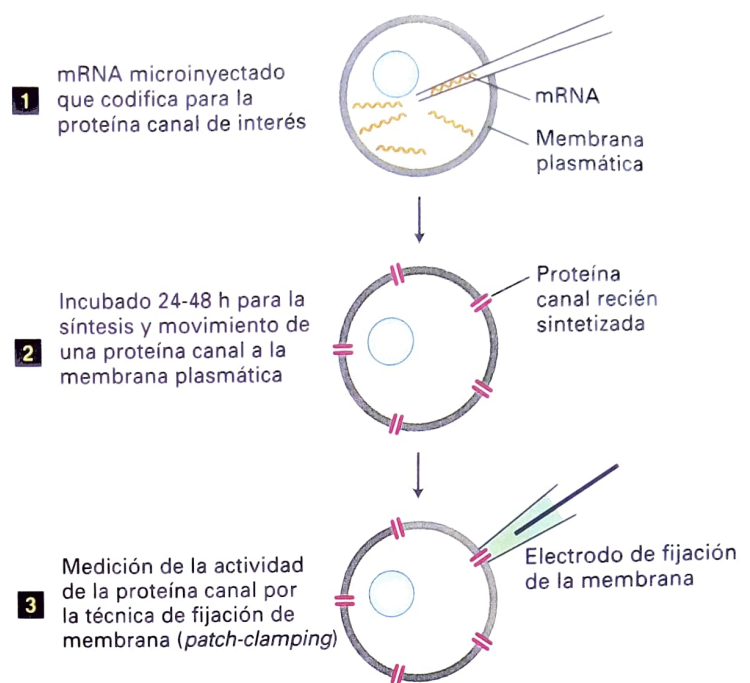


FIGURA EXPERIMENTAL 11-24 El ensayo de expresión de los ovocitos es útil para comparar la función de las formas normales y mutantes de un canal proteico. Un ovocito folicular de rana fue tratado, en primer lugar, con colagenasa para remover las células foliculares que lo rodeaban, dejando el ovocito desnudo; luego, se le microinyectó mRNA que codificaba para la proteína canal en estudio (Adaptado de T. P. Smith, 1988, *Trends Neurosci.* 11:250.)

ATP, que establece gradientes de concentración Na^+ y K^+ a través de la membrana, y los canales de K^+ en reposo que permiten el movimiento selectivo solo de iones K^+ en contra de su gradiente de concentración a través del medio externo (véase la Fig. 11-3).

- A diferencia de los canales iónicos de compuerta más comunes, que se abren solo en respuesta a varias señales, estos canales de K^+ sin compuerta habitualmente están abiertos.
- El potencial eléctrico generado por el flujo selectivo de iones a través de una membrana puede calcularse mediante la ecuación de Nernst (véase la Ecuación 11-2).
- En los vegetales y en los hongos, el potencial de membrana se mantiene por el bombeo impulsado por ATP de los protones, desde el citosol hacia el exterior de la célula.
- Los canales de K^+ se ensamblan a partir de cuatro subunidades idénticas, cada una de las cuales tiene, al menos, dos hélices α que se expanden en la membrana y un segmento P no helicoidal que tapiza el poro iónico y forma el filtro de selectividad (véase la Fig. 11-20).
- La especificidad iónica de las proteínas del canal de K^+ se debe, principalmente, a la coordinación del ion seleccionado con ocho átomos de oxígeno de los carbonilos de aminoácidos específicos, en los segmentos P, que bajan la energía de activación para el paso de los K^+ seleccionados, comparados con Na^+ u otros iones (véase la Fig. 11-21).
- Las técnicas de fijación de la membrana que permiten la medición de los movimientos iónicos a través de canales únicos se utilizan para determinar la conductividad iónica de un canal y el efecto de varias señales sobre su actividad (véase la Fig. 11-22).

• Las técnicas de DNA recombinante y fijación de la membrana permiten la expresión y caracterización funcional de las proteínas del canal en los ovocitos de rana (véase la Fig. 11-24).

11.5 Cotransporte por simportadores y antiportadores

En secciones anteriores, hemos visto de qué manera las bombas impulsadas por ATP generan gradientes de concentración iónica a través de las membranas celulares y de qué modo las proteínas que son canales de K^+ emplean el gradiente de concentración de K^+ para establecer un potencial eléctrico a través de la membrana plasmática. En esta sección, veremos cómo los cotransportadores utilizan la energía almacenada en el potencial eléctrico y los gradientes de concentración de los iones Na^+ o H^+ , para impulsar el movimiento cuesta arriba de otra sustancia, que puede ser una molécula orgánica pequeña como la glucosa, un aminoácido o un ion diferente. Una característica importante de este **cotransporte** es que ninguna sustancia puede moverse sola; el movimiento de ambas sustancias en conjunto es obligatorio o **acoplado**.

Los cotransportadores comparten rasgos comunes con los uniportadores, como las proteínas GLUT. Los dos tipos de transportadores exhiben ciertas similitudes estructurales, operan a velocidades equivalentes y experimentan cambios de conformación cíclicos durante el transporte de sus sustratos. Difieren en que los uniportadores solo pueden acelerar el transporte termodinámicamente favorable a favor de un gradiente de concentración, mientras que los cotransportadores pueden emplear la energía liberada cuando una sustancia se mueve a favor de su gradiente de concentración para impulsar el movimiento de otra sustancia en contra de su gradiente de concentración.

Cuando la molécula transportada y el ion cotransportado se mueven en la misma dirección, el proceso se denomina **simporte**; cuando se mueven en direcciones opuestas, se llama **antiporte** (véase la Fig. 11-2). Algunos cotransportadores transportan solamente iones positivos (cationes), mientras que otros transportan solo iones negativos (aniones). Otro tipo de cotransportadores median el movimiento tanto de cationes como de aniones en conjunto. Los cotransportadores están presentes en todos los organismos, incluso bacterias, vegetales y animales. En esta sección, describimos la intervención y el funcionamiento de varios simportadores y antiportadores fisiológicamente importantes.

El ingreso de Na^+ en las células de mamífero está termodinámicamente favorecido

Las células de mamífero expresan muchos tipos de simportadores acoplados a Na^+ . El genoma humano codifica, literalmente, cientos de diferentes tipos de proteínas de transporte que emplean la energía almacenada a través de la membrana plasmática en el gradiente de concentración de Na^+ y en el potencial eléctrico con interior negativo, a través de la membrana, para transportar una amplia variedad de moléculas hacia el interior de las células en contra de sus gradientes de concentración. Para ver por qué estos transportadores permiten que las células acumulen sustratos contra un considerable gradiente de concentración, necesitamos calcular, primero, el cambio de la energía libre (ΔG) que se produce durante el ingreso de Na^+ . Como se mencionó an-

teriormente, dos fuerzas gobiernan el movimiento de los iones a través de las membranas selectivamente permeables: el voltaje y el gradiente de concentración iónica a través de la membrana. La suma de estas fuerzas constituye el gradiente electroquímico. Para calcular el cambio de energía libre, ΔG , correspondiente al transporte de cualquier ion a través de una membrana, necesitamos considerar las contribuciones independientes de cada una de las fuerzas al gradiente electroquímico.

Por ejemplo, cuando el Na^+ se mueve desde el exterior hacia el interior de la célula, el cambio generado en la energía libre por el gradiente de Na^+ está dado por

$$\Delta G_c = RT \ln \frac{[Na_{int}]}{[Na_{ext}]} \quad (11-5)$$

A las concentraciones de Na_{int} y Na_{ext} que se muestran en la Figura 11-25, que son típicas para muchas células de mamífero, ΔG_c , el cambio en la energía libre debido al gradiente de concentración, es $-1,45$ kcal para el transporte de 1 mol de iones Na^+ desde el exterior hacia el interior de una célula, si se supone que no hay potencial eléctrico de membrana. Nótese que la energía libre es negativa, lo que indica el movimiento espontáneo de Na^+ hacia el interior de la célula a favor de su gradiente de concentración.

El cambio en la energía libre generado a partir del potencial eléctrico de la membrana está dado por

$$\Delta G_m = FE \quad (11-6)$$

donde F es la constante de Faraday [= 23,062 cal/(mol · V)]; y E es el potencial eléctrico de la membrana. Si $E = -70$ mV, entonces ΔG_m , el cambio de energía libre debido al potencial de la membrana es $-1,61$ kcal para el transporte de un mol de iones Na^+ desde el exterior hacia el interior de la célula, si se supone que no hay gradiente de concentración de Na^+ . Puesto que ambas fuerzas, de hecho, actúan sobre los iones Na^+ el ΔG total es la suma de los dos valores parciales:

$$\Delta G = \Delta G_c + \Delta G_m = (-1,45) + (-1,61) = -3,06 \text{ kcal/mol}$$

En este ejemplo, el gradiente de concentración de Na^+ y el potencial eléctrico de la membrana contribuyen, casi en igual medida, a la ΔG total para el transporte de iones Na^+ . Como ΔG es < 0 , el movimiento hacia el interior de los iones Na^+ se ve termodinámicamente favorecido. Como se analizará en la sección siguiente, el desplazamiento hacia el interior de Na^+ se emplea para impulsar el movimiento cuesta arriba de otros iones y varios tipos de moléculas pequeñas hacia el interior o el exterior de las células animales. El movimiento rápido, energéticamente favorable, de iones Na^+ a través de canales de sodio con compuerta, también es crítico para generar potenciales de acción en las células nerviosas y musculares, como analizaremos en el Capítulo 22.

Los simportadores ligados a Na^+ permiten a las células animales importar glucosa y aminoácidos en contra de gradientes de concentración elevados

La mayoría de las células animales importan glucosa desde la sangre a favor de un gradiente de concentración de glucosa mediante el uso de las proteínas GLUT, para facilitar este transporte. Sin embargo, ciertas células, como

Figura 11-25 Fuerzas transmembrana que actúan sobre los iones Na⁺.

Como ocurre con todos los iones, el movimiento de iones Na⁺ a través de la membrana plasmática está gobernado por la suma de dos fuerzas separadas –el gradiente de concentración iónica y el potencial eléctrico de la membrana– a las concentraciones de Na⁺ internas y externas típicas de las células de mamífero; estas fuerzas, por lo general, actúan en la misma dirección para permitir el movimiento energéticamente favorable, hacia adentro, de los iones Na⁺.

las que tapizan el intestino delgado y los túbulos renales, necesitan importar glucosa desde los líquidos extracelulares (productos de la digestión u orina) en contra de un gradiente de concentración muy elevado (concentración de glucosa más alta en el interior de la célula). Estas células utilizan un *simportador dos Na⁺/una glucosa*, una proteína que acopla la importación de una molécula de glucosa a la importación de dos iones Na⁺:



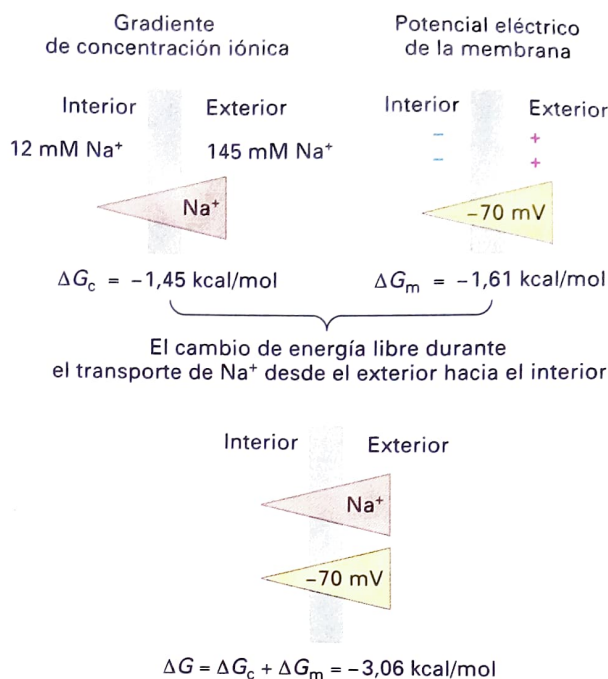
Cuantitativamente, el cambio de energía libre para el simporte de dos iones Na⁺ y una molécula de glucosa puede escribirse como

$$\Delta G = RT \ln \frac{[\text{glucosa}_{\text{int}}]}{[\text{glucosa}_{\text{ext}}]} + 2RT \ln \frac{[\text{Na}^+_{\text{int}}]}{[\text{Na}^+_{\text{ext}}]} + 2FE \quad (11-7)$$

Así, la ΔG para la reacción global es la suma de los cambios de energía libre, generados por el gradiente de concentración de glucosa (1 molécula transportada), el gradiente de concentración de Na⁺ (2 iones Na⁺ transportados) y el potencial de membrana (2 iones Na⁺ transportados). Como se ilustra en la **Figura 11-25**, la energía libre liberada por el movimiento de 1 mol de iones Na⁺ hacia la célula de mamífero a favor de su gradiente electroquímico tiene un cambio de energía libre ΔG de aproximadamente -3 kcal por mol de Na⁺ transportado. Así, la ΔG para el transporte de dos moles de Na⁺ hacia el interior será el doble de esta cantidad o aproximadamente -6 kcal. Este cambio negativo de energía libre en la importación de sodio está acoplado con el transporte cuesta arriba de la glucosa, un proceso con ΔG positiva. Podemos calcular el gradiente de concentración de glucosa, el interior mayor que el exterior que puede ser establecido por la acción de este simportador impulsado por Na⁺, al darnos cuenta de que en el equilibrio para la importación de glucosa acoplada al sodio, la $\Delta G = 0$. Al sustituir los valores para la importación de sodio en la Ecuación 11-7 y fijar $\Delta G = 0$, vemos que

$$0 = RT \ln \frac{[\text{glucosa}_{\text{int}}]}{[\text{glucosa}_{\text{ext}}]} - 6 \text{ kcal}$$

y podemos calcular que en equilibrio, el cociente de glucosa^{int}/glucosa^{ext} $\approx 30\,000$. De este modo, el flujo hacia adentro de dos moles de Na⁺ puede generar una concentración de glucosa intracelular que es $\sim 30\,000$ veces mayor que la concentración exterior. Si solo un ion Na⁺ se importara (ΔG de aproximadamente -3 kcal/mol) por molécula de glucosa, entonces la energía disponible podría generar un gradiente de concentración de glucosa (interior/exterior) de solo aproximadamente 170 veces. Así, al acoplar el transporte de dos iones Na⁺ al transporte de una glucosa,



el simportador dos Na⁺/una glucosa permite a las células acumular una concentración muy elevada de glucosa con relación a la concentración externa. Esto significa que la glucosa presente, aun a concentraciones muy bajas en la luz del intestino o en los túbulos renales, puede transportarse eficientemente hacia las células del tapiz y no perderse del organismo.

Se cree que el simportador dos Na⁺/una glucosa contiene 14 hélices α transmembrana con su extremo N-terminal y C-terminal que se extienden hacia el citosol. Una proteína recombinante truncada que consista solo en cinco hélices α transmembrana C-terminales puede transportar glucosa, independientemente del Na⁺, a través de la membrana plasmática a favor de su gradiente de concentración. Esta porción de la molécula funciona, de este modo, como un uniportador de glucosa. La porción N-terminal de la proteína que incluye las hélices 1-9 se requiere para acoplar la unión de Na⁺ y el influjo al transporte de glucosa en contra de un gradiente de concentración.

La **Figura 11-26** muestra el modelo actual de transporte por los simportadores Na⁺/glucosa. Este modelo comprende cambios de conformación en la proteína, análogos a los que se producen en los transportadores uniportadores, como la GLUT1, que no requieren un ion cotransportado (compárese con la **Fig. 11-5**). La unión de todos los sustratos con sus sitios en el dominio extracelular es necesaria antes de que la proteína sufra el cambio de conformación que convierte los sitios de unión al sustrato desde el exterior hacia la zona que enfrenta el interior; esto asegura que, en el transporte hacia el interior, la glucosa y los iones Na⁺ se encuentran acoplados.

Nótese que las células utilizan simportadores impulsados por Na⁺ comparables para transportar sustancias distintas de la glucosa hacia el interior de la célula en contra de gradientes elevados de concentración. Por ejemplo, varios tipos de simportadores Na⁺/aminoácidos permiten que las células importen numerosos aminoácidos a su interior.

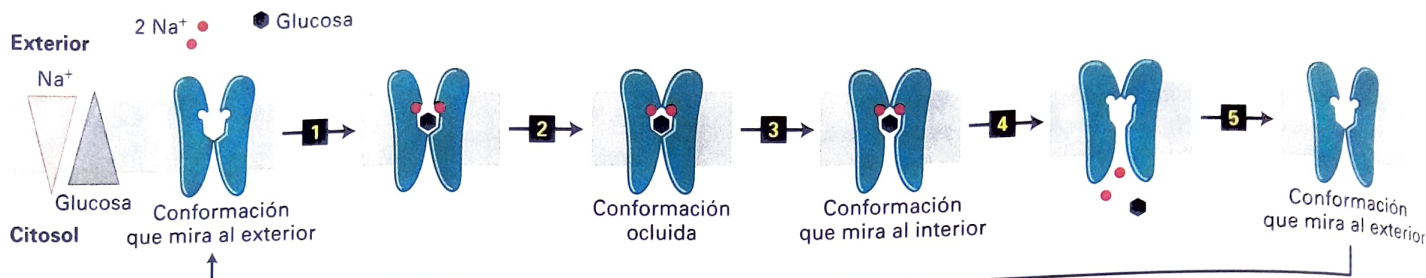


Figura 11-26 Modelo operativo para el simportador dos Na⁺/una glucosa. La unión simultánea de Na⁺ y glucosa a la conformación con los sitios de unión que enfrentan el exterior (paso 1) provoca un cambio de conformación en la proteína, de modo tal que los sustratos unidos quedan ocluidos transitoriamente, incapaces de disociarse al medio (paso 2). En el paso 3, la proteína asume una tercera conformación, con los sitios que enfrentan el interior. La disociación

de Na⁺ unido y la glucosa en el citosol (paso 4) permite que la proteína revierta a su conformación original, enfrentada al exterior (paso 5), lista para transportar sustrato adicional. (Véase H. Krishnamurthy y cols., 2009, *Nature* 459:347-355 para observar detalles de la estructura y el funcionamiento de este transportador que une Na⁺ y otros transportadores relacionados.)

Un simportador bacteriano Na⁺/aminoácido revela la forma en que opera el simportador

No hay una estructura tridimensional determinada para ningún simportador de sodio de los mamíferos, aunque la estructura de varios simportadores homólogos de sodio/sustrato en las bacterias haya proporcionado información considerable acerca de la función de los simportadores. El simportador bacteriano dos Na⁺/una leucina, que se muestra en la Figura 11-27a, consiste en 12 hélices α que se extienden en la membrana. Dos de las hélices (números 1 y 6) tienen segmentos no helicoidales en el medio de la membrana, que forman parte del sitio de unión a la leucina.

Los residuos de aminoácidos involucrados en la unión de la leucina y los dos iones Na⁺ están localizados en el medio del segmento que se extiende en la membrana (como se muestra para el simportador dos Na⁺/una glucosa de la Fig. 11-26) y se encuentran muy cercanos en el espacio tridimensional. Esto demuestra que el acoplamiento del aminoácido y el transporte iónico en estos transportadores es la consecuencia de la interacción física directa o casi directa de los sustratos. De hecho, uno de los iones Na⁺ está unido al grupo carboxilo de la leucina transportada (Fig. 11-27b). De este modo, ninguna sustancia puede unirse al transportador sin la otra, lo que indica de qué manera están acoplados el transporte de sodio y leucina. Cada uno de los dos iones Na⁺ está unido a seis átomos de oxígeno. El sodio 1, por ejemplo, está unido a los oxígenos carbonilo de varios aminoácidos del transportador, así como a los oxígenos carbonilo y el oxígeno hidroxilo de una treonina. De modo igualmente importante, no hay moléculas de agua que rodeen ninguno de los átomos Na⁺ unidos, como en el caso de los iones K⁺ en los canales de potasio (véase la Fig. 11-21). Así, a medida que los iones Na⁺ pierden su agua de hidratación al unirse al transportador, se unen a seis átomos de oxígeno con una geometría similar. Esto reduce el cambio energético necesario para unir iones Na⁺ y evita que otros iones, como el K⁺, se unan en lugar del Na⁺.

Una característica sorprendente de la estructura, que se muestra en la Figura 11-27, es que los iones Na⁺ unidos y la leucina están **ocluídos** —es decir, no pueden difundir fuera de la proteína al medio extracelular

o citoplasmático que la rodea. Esta estructura representa un intermedio en el proceso de transporte (véase la Fig. 11-26) en el cual la proteína parece estar cambiando de una conformación con un sitio de unión exoplasmático a uno con un sitio que enfrenta el citosol.

El antiportador Na⁺ ligado a Ca²⁺ regula la fuerza de la contracción del músculo cardíaco

En todas las células musculares, un incremento en la concentración de Ca²⁺ citosólico desencadena la contracción. En las células del músculo cardíaco, un **antiportador tres Na⁺/un Ca²⁺**, más que la ATPasa de Ca²⁺ de la membrana plasmática que analizamos previamente, desempeña el rol principal de mantener una baja concentración de Ca²⁺ en el citosol. La reacción de transporte mediada por este **antiportador catiónico** puede escribirse como



Nótese que el movimiento hacia adentro de los tres iones de Na⁺ es necesario para impulsar la exportación de un ion Ca²⁺ desde el citosol, con una [Ca²⁺] de $\sim 2 \times 10^{-7}$ M, al medio extracelular, con una [Ca²⁺] de $\sim 2 \times 10^{-3}$ M, un gradiente de aproximadamente 10 000 veces (más elevado en el exterior). Al disminuir el Ca²⁺ citosólico, la operación del antiportador Na⁺/Ca²⁺ reduce la fuerza de la contracción del músculo cardíaco.

 La ATPasa Na⁺/K⁺ de la membrana plasmática de las células musculares cardíacas, como las de otras células del organismo, crea el gradiente de concentración de Na⁺ necesario para la exportación del Ca²⁺ por el antiportador Na⁺ ligado a Ca²⁺. Como se mencionó anteriormente, la inhibición de la ATPasa Na⁺/K⁺ por los fármacos ouabaina y por la digoxina baja la concentración citosólica de K⁺ y, lo que resulta más relevante aquí, simultáneamente eleva el Na⁺ en el citosol. El gradiente electroquímico reducido de Na⁺ resultante, a través de la membrana, hace que el antiportador de Na⁺ ligado a Ca²⁺ opere con menor eficiencia. Como resultado de ello, se exportan me-

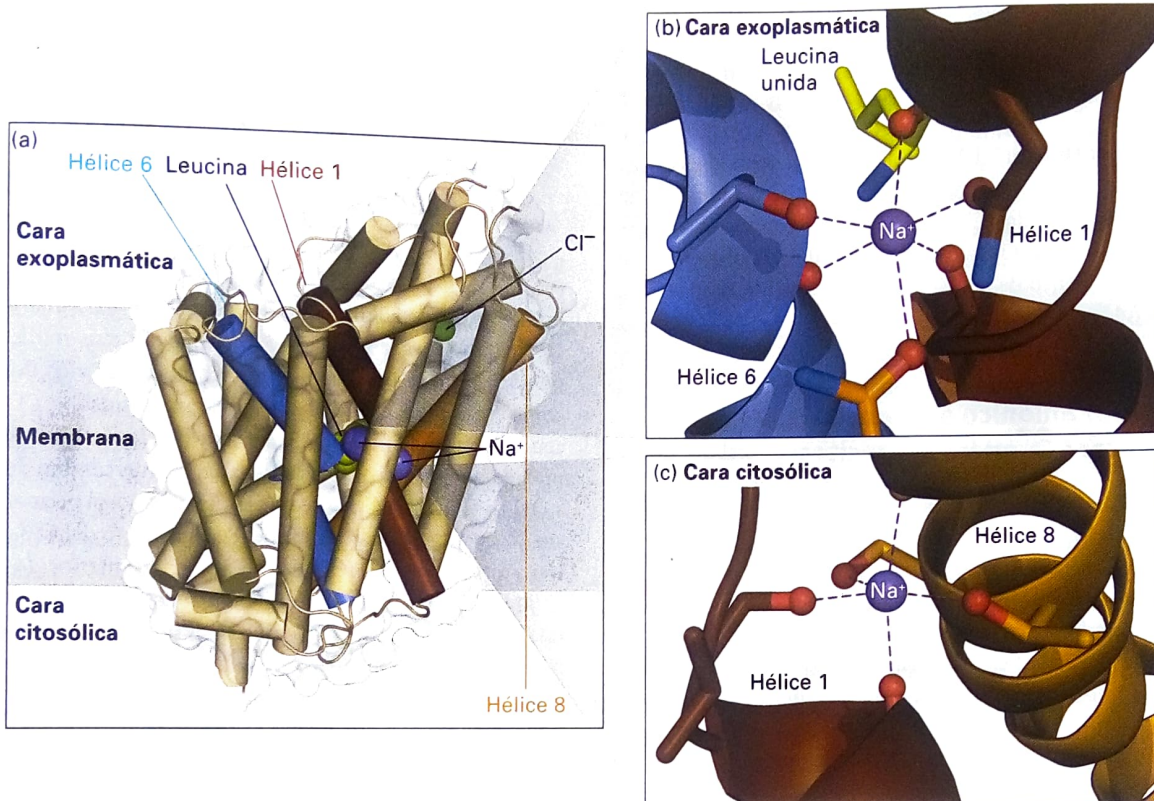


Figura 11-27 Estructura tridimensional del simportador dos Na⁺/una leucina de la bacteria *Aquifex aeolicus*. (a) La L-leucina unida, dos iones Na⁺ y el ion Cl⁻ se muestran en amarillo, púrpura y verde, respectivamente. Las tres hélices α que se expanden en la membrana y unen el Na⁺ o la leucina están coloreadas en pardo, azul y anaranjado. (b, c) La unión de los dos iones Na⁺ a los átomos de oxígeno de la cadena principal de carbonilo o de las cadenas

laterales de carboxilo (rojo), que son parte de las hélices 1 (pardo), 6 (azul) u 8 (anaranjado). Es importante que uno de los iones sodio también esté unido al grupo carboxilo de la leucina transportada (parte b). (Tomado de A. Yamashita y cols., 2005 *Nature* **437**:215; véase también H. Krishnamurthy y cols., 2009, *Nature* **459**:347-355 para observar detalles de la estructura y el funcionamiento de este transportador que une Na⁺ y otros transportadores relacionados.)

nos iones Ca²⁺ y la concentración citosólica de Ca²⁺ aumenta, lo que hace que el músculo se contraiga con mayor intensidad. Dada su capacidad de incrementar la fuerza de las contracciones citosólicas del músculo cardíaco, los fármacos como la ouabaina y la digoxina que inhiben la ATPasa Na⁺/K⁺ se usan ampliamente en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca congestiva. ■

Varios cotransportadores regulan el pH citosólico

El metabolismo anaerobio de la glucosa produce ácido láctico, y el metabolismo aerobio produce CO₂, que se combina con el agua para formar ácido carbónico (H₂CO₃). Estos ácidos débiles se disocian y producen iones H⁺ (protones); si estos protones —en exceso— no se eliminan de las células, el pH citosólico descendería abruptamente, lo que pondría en peligro las funciones celulares. Existen dos tipos de proteínas cotransportadoras que ayudan a eliminar parte de los protones en “exceso” generados durante el metabolismo de las células animales. Uno es un *antiportador* Na⁺ HCO₃⁻/Cl⁻, que importa un ion Na⁺ junto con uno HCO₃⁻ y lo intercambia al exportar un ion Cl⁻. La

enzima citosólica *anhidrasa carbónica* cataliza la disociación de los iones HCO₃⁻ importados para formar CO₂ y un ion OH⁻ (hidroxilo):



Los iones OH⁻ se combinan con los protones intracelulares y forman agua, y el CO₂ difunde hacia el exterior de la célula. Así, la acción general de este transportador es *consumir* iones H⁺ citosólicos y *eleva*r, por lo tanto, el pH del citosol. Igualmente importante para elevar el pH citosólico es el *antiportador* Na⁺/H⁺, que acopla la entrada de un ion Na⁺ a la célula, a favor de su gradiente de concentración, a la exportación de un ion H⁺.

En ciertas circunstancias, el pH citosólico puede elevarse más allá de la escala normal de 7,2-7,5. Para manejar el exceso de iones OH⁻ asociados con el pH elevado, muchas células animales emplean el *antiportador* aniónico, que cataliza el intercambio uno a uno de HCO₃⁻ y Cl⁻, a través de la membrana plasmática. A elevado pH, este *antiportador* Cl⁻/HCO₃⁻ exporta una molécula de HCO₃⁻ (que puede ser vista

La actividad de estas tres proteínas antiportadoras está regulada por el pH citosólico, que proporciona a las células un mecanismo de ajuste fino para controlar el pH del citosol. Los dos antiportadores que operan para incrementar el pH del citosol se activan cuando el pH de éste descende. De modo semejante, un incremento de pH por encima de 7,2 estimula el antiportador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, lo que conduce a una exportación más rápida de HCO_3^- y a un descenso del pH citosólico. De este modo, el pH citosólico de las células en crecimiento se mantiene muy próximo a 7,4.

El intercambio aniónico transmembrana es esencial para una función importante de los eritrocitos —el transporte de CO_2 de desecho desde los tejidos periféricos hacia los pulmones, en la exhalación—. El CO_2 de desecho, liberado desde las células hacia la sangre de los capilares, difunde libremente a través de la membrana de los eritrocitos (Fig. 11-28a). En su forma gaseosa, el CO_2 se disuelve escasamente en las soluciones acuosas, como el citosol o el plasma sanguíneo, como resulta aparente para cualquiera que haya abierto una botella de una bebida carbonatada. Sin embargo, la gran cantidad de la potente enzima anhidrasa carbónica que se encuentra dentro del eritrocito combina el CO_2 con los iones hidroxilo (OH^-) para formar aniones bicarbonato hidrosolubles (HCO_3^-). Este proceso se lleva a cabo mientras los eritrocitos se encuentran en los capilares sistémicos (de los tejidos) y liberan oxígeno hacia el plasma sanguíneo. La liberación de oxígeno desde la hemoglobina induce un cambio en su conformación que permite que

En una reacción catalizada por el antiportador AE1 de los glóbulos rojos, el HCO_3^- citosólico es transportado hacia afuera de los eritrocitos y se intercambia con un anión Cl^- que ingresa:



La AE1 cataliza el intercambio secuencial preciso, uno a uno, de aniones en lados opuestos de la membrana, requerido para preservar la electroneutralidad celular; solo una vez cada 10 000 ciclos de transporte, aproximadamente, un anión se mueve de manera unidireccional desde un lado de la membrana hacia el otro. La AE1 está compuesta por un dominio inserto en la membrana, plegado en al menos doce hélices

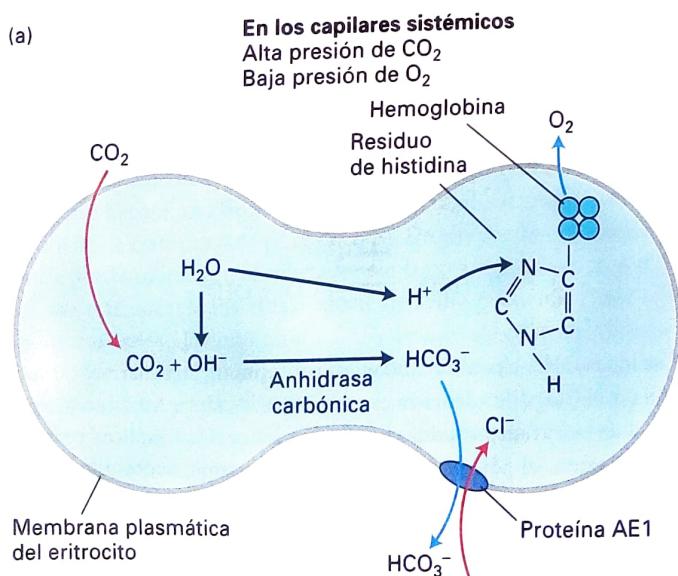
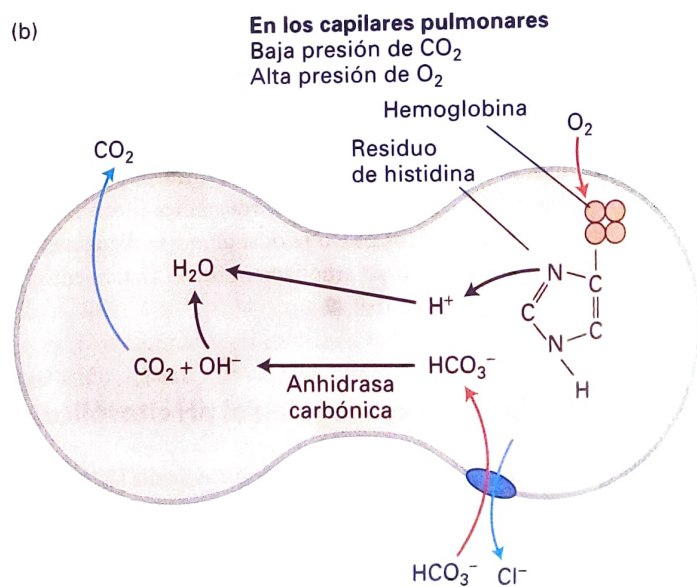


Figura 11-28 El transporte de dióxido de carbono en la sangre requiere un antiportador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$. (a) En los capilares sistémicos, el gas dióxido de carbono difunde a través de la membrana plasmática del eritrocito y se convierte en HCO_3^- soluble, por medio de la enzima anhidrasa carbónica; al mismo tiempo, el oxígeno abandona la célula y la hemoglobina une un protón. El antiportador aniónico AE1 (púrpura) cataliza el intercambio reversible de iones



Cl^- y HCO_3^- a través de la membrana. La reacción general hace que el HCO_3^- sea liberado desde la célula, lo que resulta esencial para el transporte máximo de CO_2 desde los tejidos hacia los pulmones y para mantener la neutralidad de pH en la célula sanguínea. (b) En los pulmones, donde se excreta el dióxido de carbono, la reacción general se invierte. Véase el texto para mayor detalle.

α transmembrana que catalizan el transporte aniónico, y un dominio que enfrenta el citosol y ancla ciertas proteínas del citoesqueleto a la membrana (véase la Fig. 17-21).

Numerosas proteínas de transporte permiten que las vacuolas vegetales acumulen iones y metabolitos

La luz de las vacuolas de los vegetales es mucho más ácida (pH 3-6) que el citosol (pH 7,5). La acidez de las vacuolas se mantiene merced a una bomba protónica clase V, impulsada por ATP (véase la Fig. 11-9), y por una bomba protónica impulsada por pirofosfato, exclusiva de las plantas. Ambas bombas, localizadas en la membrana vacuolar, importan iones H^+ a la luz de las vacuolas en contra de un gradiente de concentración. La membrana vacuolar contiene, además, canales Cl^- y NO_3^- que transportan estos aniones desde el citosol hacia el interior de la vacuola. El ingreso de estos aniones en contra de sus gradientes de concentración está impulsado por el potencial con el interior positivo generado por las bombas de H^+ . La operación combinada de estas bombas protónicas y canales aniónicos produce un potencial eléctrico con el interior positivo de aproximadamente 20 mV, a través de la membrana de la vacuola, y también un gradiente de pH significativo (Fig. 11-29).

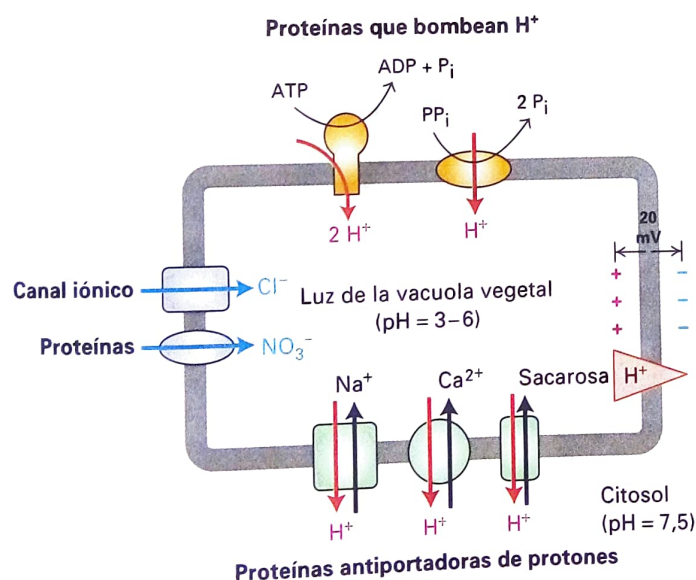


Figura 11-29 Concentración de iones y sacarosa en la vacuola vegetal.

La membrana vacuolar contiene dos tipos de bombas protónicas (anaranjado): una ATPasa H^+ clase V (izquierda) y una bomba protónica que hidroliza pirofosfato (derecha), que difiere de todas las otras proteínas de transporte de iones, y probablemente sea exclusiva de los vegetales. Estas bombas generan un pH y probablemente sea exclusiva de los vegetales. Estas bombas generan un pH y probablemente sea exclusiva de los vegetales. Estas bombas generan un pH y probablemente sea exclusiva de los vegetales. El potencial membrana vacuolar debido al bombeo de iones H^+ hacia el interior. El potencial membrana vacuolar debido al bombeo de iones H^+ hacia el interior. El potencial membrana vacuolar debido al bombeo de iones H^+ hacia el interior. Los antiportadores protónicos a través de proteínas de canal separadas (púrpura). Los antiportadores protónicos a través de proteínas de canal separadas (púrpura). Los antiportadores protónicos a través de proteínas de canal separadas (púrpura). impulsados por el gradiente H^+ acumulan Na^+ , Ca^{2+} y sacarosa en el interior de la vacuola. (Tomado de B. J. Barkla y O. Pantoja, 1996, *Rev. Plant Physiol Plant Mol Biol*

El gradiente electroquímico de protones a través de la membrana de la vacuola vegetal se emplea, en gran medida, del mismo modo que el gradiente electroquímico de Na^+ a través de la membrana plasmática de la célula animal: para impulsar la captación o expulsión selectiva de pequeñas moléculas e iones por varios antiportadores. En la hoja, por ejemplo, el exceso de sacarosa generado durante la fotosíntesis durante el día se almacena en la vacuola; durante la noche, la sacarosa almacenada se mueve hacia el citoplasma y se metaboliza en CO_2 y H_2O , con la generación concomitante de ATP a partir de ADP y P_i . Un antiportador $proton/sacarosa$ de la membrana de la vacuola opera para acumular sacarosa en las vacuolas de los vegetales. El movimiento hacia adentro de sacarosa es impulsado por el movimiento hacia afuera de H^+ , que se ve favorecido por su gradiente de concentración (luz > citosol) y el potencial citosólico negativo a través de la membrana vacuolar (véase la Fig. 11-29). La captación de Ca^{2+} y Na^+ por parte de la vacuola desde el citosol, en contra de los gradientes de concentración, es mediada de modo similar por antiportadores protónicos.

El conocimiento acerca del transporte de las proteínas en las membranas de las vacuolas vegetales resulta sumamente importante para incrementar la producción agrícola en suelos de alta salinidad ($NaCl$), que se encuentran dispersos en todo el mundo. Como la mayoría de las cosechas útiles no pueden crecer en estos suelos salinos, los científicos especializados en agricultura han buscado, desde hace tiempo, desarrollar plantas tolerantes a la sal, por los métodos de injerto tradicionales. Con la disponibilidad de genes clonados que codifican el antiportador de las vacuolas Na^+/H^+ , los investigadores, en la actualidad, pueden producir plantas transgénicas que sobreexpresen esta proteína transportadora, lo que conduce al secuestro elevado de Na^+ en el interior de las vacuolas. Por ejemplo, las plantas transgénicas de tomate que sobreexpresan el antiportador vacuolar Na^+/H^+ pueden crecer, florecer y fructificar en presencia de concentraciones de $NaCl$ en el suelo, que matarían las plantas de tipo silvestre. Resulta interesante que, aunque las hojas de estas plantas transgénicas de tomate acumulen grandes cantidades de sal, los frutos tengan una concentración de sal muy baja. ■

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 11.5

Cotransporte por simportadores y antiportadores

- El gradiente electroquímico a través de una membrana semipermeable determina la dirección del movimiento iónico a través de proteínas transmembrana. Las dos fuerzas que constituyen el gradiente electroquímico —el potencial eléctrico de la membrana y el gradiente de concentración iónica— pueden actuar en la misma dirección o en direcciones opuestas (véase la Fig. 11-25).
- Los cotransportadores utilizan la energía liberada por el movimiento de un ion (habitualmente, H^+ o Na^+) a favor de su gradiente electroquímico para impulsar la importación o la exportación de una molécula pequeña o de un ion diferente en contra de su gradiente de concentración.
- Las células que tapizan el intestino delgado y los túbulos renales contienen proteínas simportadoras que acoplan la entrada energéticamente favorable de Na^+ a la importación de glucosa en contra de su gradiente de concentración (véase la Fig. 11-26). Los aminoácidos también ingresan en la célula mediante simportadores acoplados a Na^+ .

- La estructura molecular de un simportador Na^+ /aminoácido bacteriano revela el modo en el que la unión de Na^+ y leucina están acoplados y proporciona un panorama de un intermediario de transporte ocluido en el cual los sustratos unidos no pueden difundir fuera de la proteína (véase la Fig. 11-27).

- En las células musculares cardíacas, la exportación de Ca^{2+} está acoplada a la importación de Na^+ y es impulsada por éste a través de un antiportador catiónico que transporta tres iones Na^+ hacia el interior, por cada ion Ca^{2+} exportado.

- Dos cotransportadores activados a bajo pH ayudan a mantener el pH citosólico en las células animales, muy cercano a 7,4, a pesar de la producción metabólica de ácido carbónico y láctico. Uno, un antiportador Na^+/H^+ , exporta el exceso de protones. El otro, un cotransportador $\text{Na}^+\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$, importa HCO_3^- que se disocia en el citosol para generar iones OH^- que elevan el pH.

- Un antiportador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ activado, a elevado pH, exporta HCO_3^- cuando el pH citosólico se incrementa por encima de lo normal y provoca un descenso del pH.

- El AE1, un antiportador $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ de la membrana de los eritrocitos, aumenta la capacidad de la sangre para transportar CO_2 desde los tejidos hacia los pulmones (véase la Fig. 11-28).

- La captación de sacarosa, Na^+ , Ca^{2+} y otras sustancias por parte de las vacuolas vegetales es llevada a cabo por antiportadores protónicos de la membrana de las vacuolas. Los canales iónicos y las bombas protónicas de la membrana son críticos para generar un gradiente de concentración protónico lo suficientemente elevado como para impulsar la acumulación de iones y metabolitos en las vacuolas por estos antiportadores protónicos (véase la Fig. 11-29).

11.6 Transporte transcelular

Las secciones previas ilustraron el modo en que varios tipos de transportadores operan en conjunto para desempeñar funciones celulares importantes. Aquí, ampliamos este concepto al centrarnos en el transporte de varios tipos de moléculas e iones a través de células polarizadas, que son células asimétricas (con diferentes "lados") y poseen regiones diferentes de la membrana plasmática, desde el punto de vista bioquímico. Una clase particularmente bien estudiada de células polarizadas son las epiteliales que forman capas del tipo de láminas (epitelios) que cubren la mayoría de las superficies externas e internas de los órganos del cuerpo. Las células epiteliales se analizarán con mayor detalle en el Capítulo 20. Al igual que muchas células epiteliales, una célula del epitelio intestinal implicada en la absorción de nutrientes, desde el tubo digestivo, tiene una membrana plasmática organizada en dos regiones discretas principales: la superficie que enfrenta el exterior del organismo, denominada superficie **apical** o parte superior, y la cara que enfrenta el interior (cara que enfrenta el torrente sanguíneo) del organismo, llamada superficie **basolateral** (véase la Fig. 20-10).

Las regiones especializadas de la membrana plasmática, denominadas **uniones fuertes**, separan las membranas apical y basolateral y evitan que muchas, aunque no todas, sustancias hidrosolubles se mue-

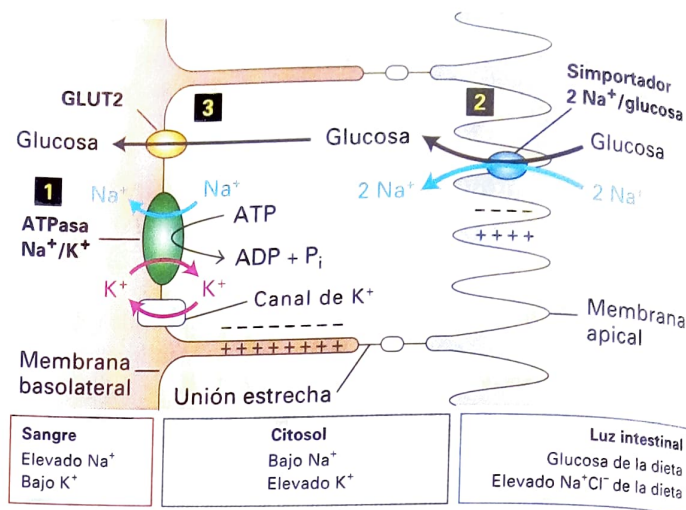


Figura 11-30 Transporte transcelular de glucosa desde la luz del intestino hacia la sangre. La ATPasa Na^+/K^+ de la superficie basolateral de la membrana genera gradientes de concentración de Na^+ y K^+ (paso 1). El movimiento hacia afuera de los iones K^+ a través de canales de K^+ sin compuerta genera un potencial de membrana con el interior negativo a través de toda la membrana plasmática. Tanto el gradiente de concentración de Na^+ como el potencial de membrana se emplean para impulsar la captación de glucosa desde la luz del intestino mediante un simportador de dos Na^+ / una glucosa localizado en la superficie de la membrana apical (paso 2). La glucosa sale de la célula por medio de difusión facilitada catalizada por la GLUT2, un uniportador de glucosa localizado en la membrana basolateral (paso 3).

van de un lado al otro a través del espacio extracelular existente entre las células. Por esta razón, la absorción de muchos nutrientes desde la luz del intestino a través de la capa de células epiteliales y, finalmente, a la sangre se lleva a cabo en un proceso de dos etapas llamado *transporte transcelular*: la importación de moléculas a través de la membrana plasmática, desde el lado apical de las células del epitelio intestinal, y su exportación a través de la membrana plasmática del lado basolateral (que enfrenta la sangre) (Fig. 11-30). La porción apical de la membrana plasmática, que enfrenta la luz intestinal, está especializada para la absorción de azúcares, aminoácidos y otras moléculas producidas a partir de los alimentos por múltiples enzimas digestivas.

Se requieren múltiples proteínas de transporte para movilizar la glucosa y los aminoácidos a través de los epitelios

La Figura 11-30 muestra las proteínas que median la absorción de la glucosa desde la luz del intestino hacia la sangre e ilustra el importante concepto según el cual diferentes tipos de proteínas están localizadas en las membranas apical y basolateral de las células epiteliales. En la primera etapa de este proceso, un simportador dos Na^+ / una glucosa, localizado en la membrana apical, importa la glucosa, contra su gradiente de concentración, desde la luz del intestino a través de la superficie apical de las células epiteliales. Como se vio anteriormente, este simportador acopla el ingreso energéticamente desfavorable hacia el interior de una molécula de glucosa al transporte hacia adentro, ener-

géticamente favorable, de dos iones Na^+ (véase la Fig. 11-26). En el estado estacionario, todos los iones Na^+ transportados desde la luz del intestino hacia el interior de la célula durante el simporte Na^+ /glucosa o el proceso similar al simportador Na^+ /aminoácido, que también ocurre en la membrana apical, son bombeados al exterior a través de la membrana basolateral que enfrenta a la sangre. Así, se mantiene la baja concentración intracelular de Na^+ . La $\text{ATPasa Na}^+/\text{K}^+$ que lleva a cabo este proceso se encuentra exclusivamente en la membrana basolateral de las células del epitelio intestinal. La operación coordinada de estas dos proteínas de transporte permite el movimiento cuesta arriba de glucosa y aminoácidos, desde el intestino hacia el interior de la célula. Esta primera etapa en el transporte transcelular, finalmente, está impulsada por la hidrólisis de ATP por la $\text{ATPasa Na}^+/\text{K}^+$.

En la segunda etapa, la glucosa y los aminoácidos concentrados dentro de las células intestinales por los simportadores apicales son importados a favor de sus gradientes de concentración a la sangre mediante proteínas uniportadoras de la membrana basolateral. En el caso de la glucosa, este movimiento está mediado por GLUT2 (véase la Fig. 11-30). Como se comentó previamente, esta isoforma GLUT tiene una afinidad relativamente baja por la glucosa, pero incrementa su velocidad de transporte de modo notable cuando el gradiente de glucosa a través de la membrana aumenta (véase la Fig. 11-4).

El resultado final de este proceso de dos etapas es el movimiento de iones Na^+ , glucosa y aminoácidos desde la luz del intestino, a través del epitelio intestinal, hacia el medio extracelular que rodea la superficie basolateral de las células del epitelio intestinal y, finalmente, a la sangre. Las uniones fuertes entre las células epiteliales evitan que estas moléculas difundan nuevamente hacia la luz del intestino. La presión osmótica elevada, creada por el transporte transcelular de sal, glucosa y aminoácidos a través del epitelio intestinal, arrastra agua desde la luz del intestino principalmente a través de las uniones estrechas al medio extracelular que rodea la superficie basolateral; las acuaporinas no parecen desempeñar una función central. En un sentido, las sales, la glucosa y los aminoácidos, “llevan” el agua junto con ellos.

La terapia de rehidratación simple depende del gradiente osmótico creado por la absorción de glucosa y Na^+



El conocimiento de la ósmosis y de la absorción intestinal de sal y glucosa forma las bases de un tratamiento simple que salva millones de vidas cada año, en particular, en los países menos desarrollados. En éstos, el cólera y otros patógenos intestinales son causas centrales de muerte en los niños pequeños. Una toxina liberada por la bacteria activa la secreción de cloro, desde la superficie apical de las células epiteliales del intestino hacia la luz; el agua la sigue osmóticamente, y la pérdida masiva de agua resultante provoca diarrea, deshidratación y finalmente la muerte. La curación requiere no solo la eliminación de las bacterias con antibióticos, sino también la *rehidratación* —el reemplazo del agua perdida desde la sangre y otros tejidos—.

El simple consumo de agua no ayuda porque se excreta desde la vía digestiva casi tan rápido como ingresa a través de ésta. Sin embargo, como hemos aprendido recientemente, el transporte coordinado de glucosa y Na^+ a través del epitelio intestinal crea un gradiente osmótico transepitelial y fuerza el movimiento de agua desde la luz del

intestino, a través de la capa de células epiteliales y, finalmente, a la sangre. Así, dar a un niño afectado una solución de azúcar y agua para beber (pero no de sal o azúcar solamente) provoca un incremento del transporte de sodio y azúcar a través del epitelio y, en consecuencia, un flujo osmótico elevado de agua hacia la sangre desde la luz del intestino, lo que conduce a la rehidratación. Las soluciones azúcar-sal de este tipo constituyen la base de las bebidas populares que consumen los atletas para administrar azúcar y agua al organismo de modo rápido y eficiente. ■

Las células parietales acidifican el contenido del estómago y mantienen el pH citosólico neutro

El estómago de los mamíferos contiene una solución 0,1 M de ácido clorhídrico (HCl). Este medio muy ácido elimina muchos patógenos ingeridos y desnaturaliza numerosas proteínas, de modo tal que pueden ser degradadas por enzimas proteolíticas (p. ej., pepsina), que funcionan a pH ácido. En el estómago, el ácido clorhídrico es secretado por células epiteliales especializadas denominadas *células parietales* (conocidas también como *células oxínticas*) de la cubierta estomacal. Estas células contienen una $\text{ATPasa H}^+/\text{K}^+$ en su membrana apical, que enfrenta la luz del estómago y genera un gradiente de concentración de H^+ de un millón de veces: pH $\sim 1,0$ en la luz del estómago frente a un pH $\sim 7,2$ en el citosol celular. Esta proteína de transporte es una bomba iónica clase P, impulsada por ATP, de estructura y función similar a la $\text{ATPasa Na}^+/\text{K}^+$ de la membrana plasmática analizada anteriormente. Las numerosas mitocondrias de las células parietales producen abundante ATP para ser empleado por la $\text{ATPasa H}^+/\text{K}^+$.

Si las células parietales simplemente exportaran iones H^+ en intercambio por K^+ , la pérdida de protones conduciría a un incremento de la concentración de iones OH^- en el citosol y, de este modo, un aumento pronunciado del pH citosólico. (Recuerde que $[\text{H}^+] \times [\text{OH}^-]$ es siempre una constante, 10^{-14} M^2). Las células parietales evitan este incremento del pH citosólico en conjunto con una acidificación de la luz estomacal, con el empleo de antiportadores $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ en la membrana basolateral, para exportar el “exceso” de iones OH^- desde el citosol hacia la sangre. Como ya se mencionó, este antiportador aniónico se activa a un pH citosólico elevado.

El proceso general por el cual las células parietales acidifican la luz del estómago se ilustra en la Figura 11-31. En una reacción catalizada por la anhidrasa carbónica, el OH^- citosólico en “exceso” se combina con el CO_2 , que difunde al interior desde la sangre y forma HCO_3^- . Catalizado por el antiportador aniónico basolateral $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, este ion bicarbonato es exportado a través de la membrana basolateral (y, finalmente, a la sangre) en intercambio por un ion Cl^- . Los iones Cl^- luego salen a través de los canales de Cl^- de la membrana apical e ingresan en la luz del estómago. Para preservar la electro-neutralidad, cada ion Cl^- que se moviliza hacia la luz del estómago a través de la membrana apical está acompañado por un ion K^+ que se desplaza hacia afuera por medio de un canal separado de K^+ . De este modo, el exceso de iones K^+ bombeado hacia adentro por la $\text{ATPasa H}^+/\text{K}^+$ regresa a la luz del estómago, y se mantiene, de este modo, la concentración intracelular normal de K^+ . El resultado de este proceso es la secreción de cantidades iguales de iones H^+ y Cl^- (HCl) a la luz del estómago, mientras que el pH del citosol permanece neutro y el exceso de iones OH^- , como HCO_3^- , se transportan a la sangre.

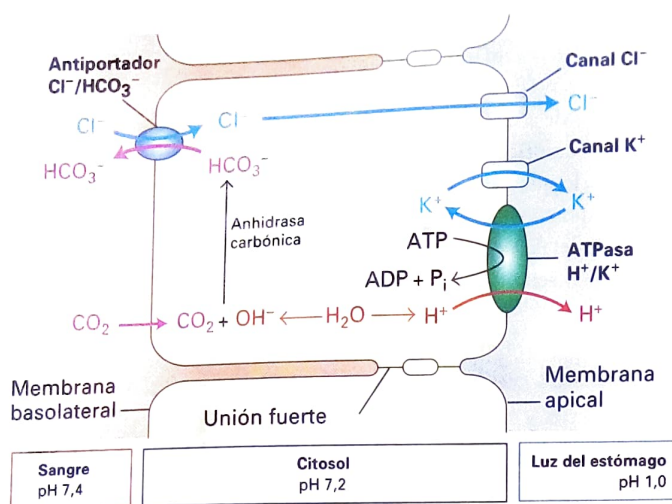


Figura 11-31 Acidificación de la luz del estómago por las células parietales de la cubierta gástrica. La membrana apical de las células parietales contiene una ATPasa H^+/K^+ (una bomba clase P), así como canales proteicos Cl^- y K^+ . Nótese el transporte cíclico de K^+ a través de la membrana apical: los iones K^+ son bombeados hacia el interior por la ATPasa H^+/K^+ y salen a través de un canal K^+ . La membrana basolateral contiene un antiportador aniónico que intercambia iones HCO_3^- y Cl^- . La operación combinada de estas cuatro proteínas diferentes de transporte y de la anhidrasa carbónica acidifica la luz del estómago y, a la vez, mantiene la neutralidad de pH del citosol.

La resorción ósea requiere la función coordinada de una bomba protónica clase V y un canal proteico específico de cloro

El crecimiento neto del hueso, en los mamíferos, se detiene exactamente después de la pubertad, pero durante toda la edad adulta se produce un proceso finamente modulado y altamente dinámico de desensamblaje (reabsorción) y reensamblaje (formación ósea). Este remodelamiento óseo continuo permite la reparación de los huesos dañados y puede liberar calcio, fosfato y otros iones del hueso mineralizado a la sangre, para ser empleados en cualquier lugar del organismo.

Los osteoclastos, las células que disuelven huesos, constituyen un tipo de macrófagos mejor conocidos por su función de proteger al organismo de las infecciones. Los osteoclastos son células polarizadas que forman uniones muy fuertes entre éstos y los huesos, lo que crea un espacio extracelular cerrado (Fig. 11-32). Después, un osteoclasto adherido secreta a este espacio una mezcla corrosiva de HCl y proteasas que disuelven los componentes inorgánicos del hueso en Ca^{2+} y fosfato, y digieren sus componentes proteicos. El mecanismo de secreción de HCl es similar al empleado por el estómago para generar jugo digestivo (véase la Fig. 11-31). Como sucede con la secreción de HCl gástrico, la anhidrasa carbónica y la proteína antiportadora aniónica son importantes para la función de los osteoclastos. Los osteoclastos utilizan una bomba protónica clase V para exportar iones H^+ al espacio que enfrenta el hueso de un modo diferente del que lo hace una bomba clase P impulsada por ATP H^+/K^+ en las células del epitelio gástrico.

La rara enfermedad hereditaria *osteopetrosis*, caracterizada por el aumento de la densidad ósea, se debe a una reabsorción ósea anormalmente baja. Muchos pacientes tienen una mutación inactivan-

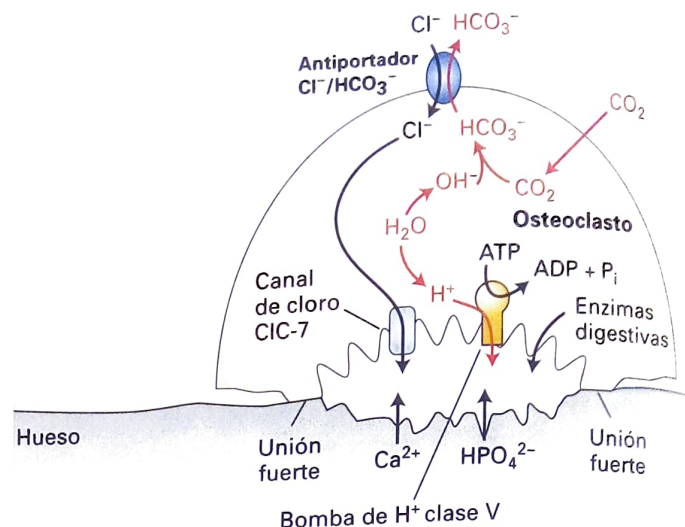


Figura 11-32 La disolución del hueso por los osteoclastos polarizados requiere una bomba protónica clase V y el canal de cloro CIC-7. La membrana plasmática de los osteoclastos está dividida en dos dominios separados por unión estrecha entre un anillo de membrana y la superficie ósea. El dominio de membrana que enfrenta el hueso contiene bombas de protones clase V y canales de Cl^- CIC-7. El dominio opuesto de la membrana contiene antiportadores aniónicos que intercambian iones HCO_3^- y Cl^- . La operación combinada de estas tres proteínas de transporte y de la anhidrasa carbónica acidifica el espacio encerrado y permite la resorción ósea; a su vez, mantiene el pH neutro del citosol. (Véase R. Planells-Cases y T. Jentsch, 2009, *Biochim. Biophys. Acta* 1792:173 para un análisis del CIC-7.)

te en el gen que codifica la CIC-7, la proteína del canal de cloro, localizada en el dominio de la membrana plasmática del osteoclasto que enfrenta el espacio cercano al hueso. Como sucede con los lisosomas (véase la Fig. 11-14), en ausencia de un canal de cloro, la bomba protónica no puede acidificar el espacio extracelular cerrado y, de este modo, la reabsorción ósea es defectuosa. ■

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 11.6

Transporte transcelular

- Los dominios de la membrana plasmática apical y basolateral de las células epiteliales contienen diferentes proteínas de transporte y llevan a cabo diversos procesos de transporte.
- En la célula epitelial intestinal, la operación coordinada de los importadores ligados al Na^+ en la membrana apical y las ATPasas Na^+/K^+ y los uniportadores de la membrana basolateral median el transporte transcelular de aminoácidos y glucosa, desde la luz del intestino hacia la sangre (véase la Fig. 11-30).
- La presión osmótica elevada, creada por el transporte transcelular de sal, glucosa y aminoácidos a través del epitelio intestinal, arrastra agua desde la luz del intestino hacia el organismo, un fenómeno que sirve como base para la terapia de rehidratación que emplea soluciones con sal y azúcares.
- La acción combinada de la anhidrasa carbónica y cuatro proteínas transportadores distintas permite que las células parietales que tapizan

el estómago secreten HCl hacia la luz y, a la vez, mantengan su pH citosólico cerca de la neutralidad (véase la Fig. 11-31).

• La reabsorción ósea requiere la fusión coordinada, en los osteoclastos, de una bomba protónica clase V y de la proteína del canal de cloro CIC-7 (Fig. 11-32).

Perspectivas para el futuro

En este capítulo, hemos explicado la acción de las proteínas específicas de transporte de membrana y su impacto en ciertos aspectos de la fisiología humana; este enfoque de la fisiología molecular tiene muchas aplicaciones médicas. Aun en la actualidad, los inhibidores o activadores específicos de los canales, bombas y transportadores constituyen la clase de fármacos simples más significativa. Por ejemplo, un inhibidor de la ATPasa H^+/K^+ gástrica que acidifica el estómago es el fármaco más ampliamente utilizado para el tratamiento de las úlceras gástricas y el síndrome de reflujo gástrico. Los inhibidores de los canales proteicos renales se emplean, con gran frecuencia, para controlar la hipertensión (presión arterial elevada); al bloquear la reabsorción de agua en la sangre desde la orina formada en los riñones, estos fármacos reducen el volumen sanguíneo y, así, la presión arterial. Los bloqueantes de los canales de calcio se utilizan ampliamente para controlar la intensidad de la contracción del corazón. Las sustancias que inhiben un canal de potasio, en particular en las células β de los islotes, incrementan la secreción de insulina (véase la Fig. 16-38), y son muy utilizados para tratar la diabetes que aparece en la edad adulta (tipo II).

Con la finalización del proyecto genoma humano, tenemos a nuestro alcance las secuencias de todas las proteínas de transporte de membrana de los seres humanos. Ya sabemos que las mutaciones en muchas de éstas provocan enfermedades —la fibrosis quística, debida a la mutación de la CFTR, y la osteopetrosis, provocada por mutaciones en el canal de cloro CIC-7, son ejemplos—. Más recientemente, se mostró que las mutaciones con pérdida de la función en cada subunidad de un canal de cloro diferente, CIC-K, producen pérdida de sal por medio del riñón y sordera. Esta explosión de conocimientos básicos, que asocian determinadas enfermedades genéticas con proteínas específicas de transporte, permitirá a los investigadores investigar nuevos tipos de compuestos que inhiben o activan exactamente una de estas proteínas de transporte de la membrana, y no a sus homólogas. Sin embargo, conocer la función de una proteína individual de transporte, en cada uno de los diversos tejidos en los cuales se expresa, constituye un desafío importante.

Otro desafío central es comprender de qué manera cada canal, transportador y bomba están regulados para satisfacer las necesidades de la célula. Al igual que otras proteínas celulares, muchas de estas proteínas experimentan fosforilación reversible, ubiquitinación y otras modificaciones covalentes que influyen en su actividad, pero en la gran mayoría de los casos, no comprendemos de qué modo esta regulación incide en la función celular. Muchos canales, transportadores y bombas normalmente se encuentran en las membranas intracelulares, no en la membrana plasmática, y se movilizan hacia ésta sólo cuando está presente una hormona en particular. La adición de insulina al músculo, por ejemplo, hace que el transportador de glucosa GLUT4 se desplace desde las membranas intracelulares hacia la membrana plasmática, lo

que aumenta la tasa de captación de glucosa. Como ya se mencionó, la adición de vasopresina a ciertas células renales permite, de modo similar, que una acuaporina se desplace hacia la membrana plasmática incrementando la tasa de transporte de agua. Pero a pesar de muchas investigaciones, aún no están claros los mecanismos celulares por los cuales las hormonas estimulan el movimiento de las proteínas de transporte hacia la membrana plasmática y desde ésta; tampoco se conoce la regulación de estos procesos.

Palabras clave

superfamilia ABC 485
transporte activo 476
antiporte 502
acuaporinas 480
bomba impulsada por ATP 476
cotransporte 502
gradiente electroquímico 475
transporte facilitado 476
bomba clase F 484
flipasa 493
canal con compuerta 476
proteínas GLUT 479
hipertónico 481
hipotónico 481
isotónico 481

potencial de membrana 475
ATPasa Na^+/K^+ 489
patch-clamping 500
bomba clase P 484
canal K^+ en reposo 497
potencial en reposo 495
retículo sarcoplasmático 486
difusión simple 474
simporte 502
unión fuerte 508
transportador 476
transporte transcelular 508
uniporte 478
bomba clase V 484

Revisión de los conceptos

1. El óxido nítrico (NO) es una molécula gaseosa con solubilidad en lípidos, similar a la de O_2 y CO_2 . Las células endoteliales que recubren las arterias emplean el NO para enviar señales a las células cercanas de músculo liso para que se relajen, lo que incrementa el flujo sanguíneo. ¿Qué mecanismo o mecanismos transportarían el NO desde el lugar en el que se produce, en el citoplasma de una célula endotelial, hacia el citoplasma de una célula de músculo liso en donde actúa?
2. El ácido acético (un ácido débil con una pK_a de 4,75) y el etanol (un alcohol) están compuestos, cada uno, por dos carbonos, hidrógeno y oxígeno, y ambos ingresan en las células por difusión pasiva. A pH 7, uno es mucho más permeable a la membrana que el otro. ¿Cuál es más permeable y por qué? Prediga de qué manera la permeabilidad de cada uno se altera cuando el pH se reduce a 1, un valor típico del estómago.
3. Los uniportadores y los canales iónicos sostienen la difusión facilitada a través de las biomembranas. Aunque ambos son ejemplos de la difusión facilitada, las tasas de movimiento iónico a través de un canal iónico son aproximadamente 10^4 – 10^5 veces mayores que la del movimiento de las moléculas a través de un uniportador. ¿Qué diferencias de mecanismos clave producen esta gran diferencia en la velocidad del transporte? ¿Qué contribución a la energía libre (ΔG) determina la dirección del transporte?
4. Nombre las tres clases de transportadores. Explique cuál o cuáles de estas clases son capaces de movilizar glucosa y cuáles movilizan bicarbonato (HCO_3^-) en contra de un gradiente electroquímico. En el caso del bicarbonato, pero no de la glucosa, la ΔG del proceso de transporte tiene dos términos. ¿Cuáles son estos dos términos y por qué el segundo

no se aplica a la glucosa? ¿Por qué los cotransportadores, con frecuencia, se mencionan como ejemplos de transporte activo secundario?

5. Un ion H^+ es más pequeño que una molécula de H_2O , y una molécula de glicerol —un alcohol de tres carbonos— es mucho más grande. Ambas se disuelven fácilmente en H_2O . ¿Por qué las acuaporinas no transportan H^+ mientras que algunas pueden transportar glicerol?

6. La GLUT1, presente en la membrana plasmática de los eritrocitos, es un ejemplo clásico de uniportador.

a. Projete un conjunto de experimentos para probar que la GLUT1 es, en realidad, un uniportador específico de glucosa más que un uniportador específico de galactosa o manosa.

b. La glucosa es un azúcar de seis carbonos, mientras que la ribosa es un azúcar de cinco carbonos. A pesar de su tamaño más pequeño, la ribosa no se transporta eficientemente a través de GLUT1. ¿Cómo puede explicar esto?

c. Un descenso en el azúcar sanguíneo de 5 mM a 2,8 mM o por debajo puede provocar confusión y pérdida de conocimiento. Calcule el efecto de este descenso en el transporte de glucosa en las células que expresan GLUT1.

d. ¿De qué manera las células del hígado y del músculo maximizan la captación de glucosa sin cambiar la $V_{\max}$?

e. Las células tumorales que expresan GLUT1, con frecuencia, tienen una $V_{\max}$ más elevada para el transporte de glucosa que las células sanas del mismo tipo. ¿De qué manera estas células incrementan la $V_{\max}$?

f. La grasa y las células musculares modulan la $V_{\max}$ para la captación de glucosa en respuesta a la señalización de la insulina. ¿Cómo?

7. Nombre las cuatro clases de bombas impulsadas por ATP que producen el transporte activo de iones y moléculas. Indique cuáles de estas clases transportan iones solamente y cuáles transportan principalmente moléculas orgánicas pequeñas. El descubrimiento inicial de una clase de estas bombas impulsadas por ATP no provino del estudio del transporte de un sustrato natural, sino de sustratos artificiales empleados como fármacos quimioterapéuticos para el cáncer. ¿Qué piensan los investigadores, ahora que constituyen ejemplos comunes de los sustratos naturales de esta clase particular de bombas impulsadas por ATP?

8. Explique por qué la reacción acoplada $ATP \rightarrow ADP + P_i$ en el mecanismo de las bombas iónicas clase P no implica directamente la hidrólisis del enlace fosfoanhidrido.

9. Describa un mecanismo de retroalimentación negativa para controlar la concentración creciente de Ca^{2+} citoplasmático en las células que requieren cambios rápidos en la concentración de Ca^{2+} para su funcionamiento normal. ¿De qué modo un fármaco que inhibe la actividad de calmodulina afectaría la concentración de Ca^{2+} regulada por este mecanismo? ¿Cuál sería el efecto sobre la función de, por ejemplo, una célula de músculo esquelético?

10. Ciertos inhibidores de la bomba de protones inhiben la secreción del ácido estomacal y se encuentran entre los fármacos más ampliamente vendidos en el mundo en la actualidad. ¿Qué bomba inhibe este tipo de sustancia y dónde se localiza esta bomba?

11. El potencial de membrana de las células animales, pero no de las vegetales, depende —en gran medida— de los canales de K^+ en reposo. ¿De qué manera contribuyen estos canales al potencial de reposo? ¿Por qué se considera que estos canales carecen de compuerta? ¿De qué modo estos canales logran la selectividad por K^+ frente a Na^+ , que es más pequeño que el K^+ ?

12. La fijación de membrana puede emplearse para medir las propiedades de conductancia de canales iónicos individuales. Describa de qué manera esta técnica puede utilizarse para determinar si el gen que co-

difica para un canal K^+ putativo de hecho codifica para un canal K^+ o un canal Na^+ .

13. Las plantas emplean el gradiente electroquímico de los protones a través de la membrana de la vacuola para impulsar la acumulación de sales y azúcares en el orgánulo. Esto crea un estado hipertónico. ¿Por qué esto no produce la hinchazón de la célula vegetal y su estallido? Aun en condiciones isotónicas, hay una lenta fuga de iones hacia el interior de las células animales. ¿De qué manera la $ATPase\ Na^+/K^+$ de la membrana plasmática capacita a las células animales para evitar la lisis osmótica en condiciones isotónicas?

14. En el caso del transportador bacteriano sodio/leucina, ¿cuál es la característica clave distintiva de los iones unidos de sodio que asegura que otros iones, en particular K^+ , no se unan?

15. Describa el proceso de simporte por el cual las células que recubren el intestino delgado importan glucosa. ¿Qué ion es el causante del transporte y cuáles son las dos características particulares que facilitan el movimiento energéticamente favorecido de este ion a través de la membrana plasmática?

16. El desplazamiento de glucosa de un lado del epitelio intestinal al otro es un ejemplo central de transporte transcelular. ¿De qué manera la $ATPase\ Na^+/K^+$ impulsa el proceso? ¿Por qué las uniones fuertes son esenciales para éste? ¿Por qué la localización de los transportadores, específicamente en la membrana apical y basolateral, es crucial para el transporte transcelular? Los suplementos de rehidratación, como las bebidas deportivas, incluyen un azúcar y una sal. ¿Por qué ambas son importantes para la rehidratación?

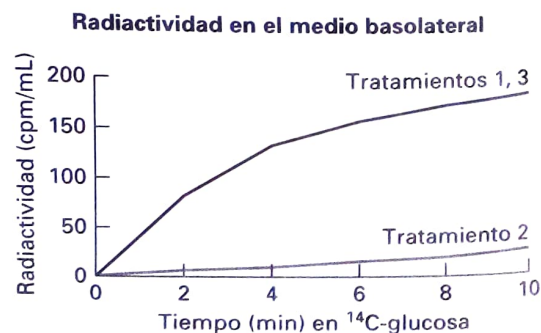
Análisis de los datos

Imagine que usted está investigando el transporte transepitelial de la glucosa radiactiva. Las células del epitelio intestinal se hacen crecer en cultivo para formar una lámina completa, de modo tal que el fluido que baña el dominio apical de las células (el medio apical) está completamente separado del que baña el dominio basolateral de las células (el medio basolateral). Se añade glucosa radiactiva (^{14}C -marcada) al medio apical y se controla la aparición de radiactividad en el medio basolateral, en términos de cuentas por minuto por mililitro (cpm/mL), una medida de la radiactividad por unidad de volumen.

Tratamiento 1: Tanto el medio apical como el basolateral contienen, cada uno, Na^+ 150 mM (curva 1).

Tratamiento 2: El medio apical contiene Na^+ 1 mM, y el medio basolateral, Na^+ 150 mM (curva 2).

Tratamiento 3: El medio apical contiene Na^+ 150 mM, y el medio basolateral, Na^+ 1 mM (curva 3).

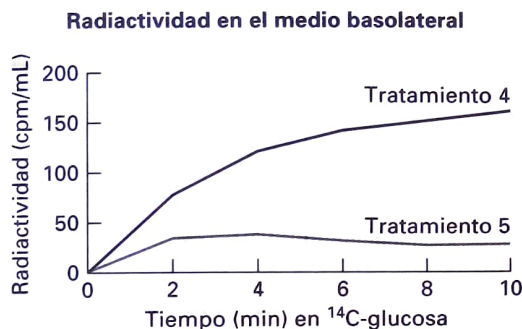


a. ¿Cuál es una explicación probable para los diferentes resultados obtenidos en los tratamientos 1 y 3 versus tratamiento 2?

b. En estudios adicionales, el fármaco ouabaína, que inhibe las ATPasas Na^+/K^+ , se incluye según se indica.

Tratamiento 4: El medio apical y basolateral contienen Na^+ 150 mM y el medio apical contiene ouabaína (curva 4).

Tratamiento 5: El medio apical y el basolateral contienen Na^+ 150 mM, y el medio basolateral contiene ouabaína (curva 5).



b. ¿Cuál es una explicación probable para los diferentes resultados obtenidos en el tratamiento 4 versus el tratamiento 5?

c. Ciertos compuestos naturales y fármacos probados para el tratamiento de la diabetes disminuyen el transporte de glucosa en las células del epitelio intestinal o renal y, por lo tanto, los niveles de azúcar en la sangre. La adición de un fármaco de este tipo al medio apical hace que el transporte sea similar al del Tratamiento 5, mientras que su adición al medio basolateral hace que el transporte sea similar al del Tratamiento 4. ¿Cuál es la diana más probable de este fármaco y cuál es el efecto sobre su diana?

Bibliografía

Transporte facilitado de glucosa y agua

Engel, A., Y. Fujiyoshi, and P. Agre. 2000. The importance of aquaporin water channel protein structures. *EMBO J.* 19:800-806.

Hedfalk, K., et al. 2006. Aquaporin gating. *Curr. Opin. Structural Biology* 16:1-10.

Hruz, P. W., and M. M. Mueckler. 2001. Structural analysis of the GLUT1 facilitative glucose transporter (review). *Mol. Memb. Biol.* 18:183-193.

King, L. S., D. Kozono, and P. Agre. 2004. From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5:687-698.

Thorens, B., and M. Mueckler. Glucose transporters in the 21st century. *Am. J. Physiol.-Endoc. M.* 298:E141-E145, 2010.

Verkman, A. S. 2009. Knock-out models reveal new aquaporin functions. *Handb. Exp. Pharmacol.* 190:359-381.

Wang, Y., K. Schulten, and E. Tajkhorshid. 2005. What makes an aquaporin a glycerol channel? A comparative study of AqpZ and GlpF structure. *Structure* 13:1107-1118.

Bombas impulsadas por ATP y ambiente iónico intracelular

Aller, S., et al. 2009. Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science* 323: 1718-1722.

Gottesman, M. M., and V. Ling. 2006. The molecular basis of multidrug re-

sistance in cancer: the early years of P-glycoprotein research. *FEBS Lett.* 580:998-1009.

Guerini, D., L. Coletto, and E. Carafoli. 2005. Exporting calcium from cells. *Cell Calcium* 38:281-289.

Guttmann, D., et al. 2009. Understanding polyspecificity of multidrug ABC transporters: closing in on the gaps in ABCB1. *Trends Biochem. Sci.* 35:36-42.

Hall, M., et al. 2009. Is resistance useless? Multidrug resistance and collateral sensitivity. *Trends Pharmacol. Sci.* 30:546-556.

Jencks, W. P. 1995. The mechanism of coupling chemical and physical reactions by the calcium ATPase of sarcoplasmic reticulum and other coupled vectorial systems. *Biosci. Rept.* 15:283-287.

Locher, K. P., A. Lee, and D. C. Rees. 2002. The E. coli BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism. *Science* 296:1091.

Ogawa, H., et al. 2009. Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na^+/K^+ -ATPase) with bound potassium and ouabain. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 106:13742-13747.

Raggers, R. J., et al. 2000. Lipid traffic: the ABC of transbilayer movement. *Traffic* 1:226-234.

Riordan, J. 2005. Assembly of functional CFTR chloride channels. *Ann. Rev. Physiol.* 67:701-718.

Shinoda, T., et al. 2009. Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution. *Nature* 459:446-450.

Toel, M., R. Saum, and M. Forgac. 2010. Regulation and isoform function of the V-ATPases. *Biochemistry* 49:4715-4723.

Toyoshima, C. 2009. How Ca^{2+} -ATPase pumps ions across the sarcoplasmic reticulum membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 1793: 941-946.

Verkman, A. S., G. L. Lukacs, and L. J. Galletta. 2006. CFTR chloride channel drug discovery—inhibitors as antidiarrheals and activators for therapy of cystic fibrosis. *Curr. Pharm. Des.* 12:2235-2247.

Canales iónicos sin compuerta y potencial de membrana en reposo

Dutzler, R., et al. 2002. X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature* 415:287-294.

Hibino, H., et al. 2010. Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. *Physiol. Rev.* 90:291-366.

Hille, B. 2001. *Ion Channels of Excitable Membranes*, 3d ed. Sinauer Associates.

Jentsch, T. J. 2008. ClC chloride channels and transporters: from genes to protein structure, pathology and physiology. *Crit. Rev. Biochem. Mol.* 43:3-36.

Jouhaux, E., and R. Mackinnon. 2005. Principles of selective ion transport in channels and pumps. *Science* 310:1461-1465.

MacKinnon, R. 2004. Potassium channels and the atomic basis of selective ion conduction. Nobel Lecture reprinted in *Biosci. Rep.* 24:75-100.

Montello, C., L. Birnbaumer, and V. Flockers. 2002. The TRP channels, a remarkably functional family. *Cell* 108:595-598.

Neher, E. 1992. Ion channels for communication between and within cells. Nobel Lecture reprinted in *Neuron* 8:605-612 and *Science* 256:498-502.

Neher, E., and B. Sakmann. 1992. The patch clamp technique. *Sci. Am.* 266(3):28-35.

Planells-Cases, R., and T. J. Jentsch. 2009. Chloride channelopathies. *Biochim. Biophys. Acta* 1792:173-189.

Roux, B. 2005. Ion conduction and selectivity in K^+ channels. 2005. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 34:153-171.

Zhou, Y., et al. 2001. Chemistry of ion coordination and hydration revealed by a K^+ channel-Fab complex at 2 Å resolution. *Nature* 414:43-48.

Cotransporte por simportadores y antiportadores

- Alper, S. L. 2009. Molecular physiology and genetics of Na⁺-independent SLC4 anion exchangers. *J. Exp. Biol.* **212**:1672-1683.
- Barkla, B. J., R. Vera-Estrella, and O. Pantoja. 1999. Towards the production of salt-tolerant crops. *Adv. Exp. Med. Biol.* **464**:77-89.
- Diallinas, G. 2008. An almost- complete movie: structural snapshots of transporter proteins reveal how they transport species across membranes. *Science* **322**:1644-1645.
- Gao, X., et al. 2009. Structure and mechanism of an amino acid antiporter. *Science* **324**:1565-1568.
- Gouaux, E. 2009. Review: The molecular logic of sodium-coupled neurotransmitter transporters. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **364**:149-154.
- Krishnamurthy, H., C. L. Piscitelli, and E. Gouaux. 2009. Unlocking the molecular secrets of sodium-coupled transporters. *Nature* **459**:347-355.
- Orlowski, J., and S. Grinstein. 2007. Emerging roles of alkali cation/proton exchangers in organellar homeostasis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**:483-492.
- Shabala, S., and T. A. Cuin. 2008. Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiol. Plant* **133**:651-669.
- Wakabayashi, S., M. Shigekawa, and J. Pouyssegur. 1997. Molecular physiology of vertebrate Na⁺/H⁺ exchangers. *Physiol. Rev.* **77**:51-74.

Wright, E. M. 2004. The sodium/glucose cotransport family SLC5. *Pflügers Arch.* **447**:510-518.

Wright, E. M., and D. D. Loo. 2000. Coupling between Na⁺, sugar, and water transport across the intestine. *Ann. NY Acad. Sci.* **915**:54-66.

Transporte transcelular

- Anderson, J. M., and C. M. Van Itallie. 2009. Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* **1**:a002584.
- Elkouby-Naor, L., and T. Ben-Yosef. 2010. Functions of claudin tight junction proteins and their complex interactions in various physiological systems. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **279**:1-32.
- Hubner, C. A., and T. J. Jentsch. 2008. Channelopathies of transepithelial transport and vesicular function. *Adv. Genet.* **63**:113-152.
- Rao, M. 2004. Oral rehydration therapy: new explanations for an old remedy. *Ann. Rev. Physiol.* **66**:385-417.
- Schafer, J. A. 2004. Renal water reabsorption: a physiologic retrospective in a molecular era. *Kidney Int. Suppl.* **91**:S20-27.
- Schultz, S. G. 2001. Epithelial water absorption: osmosis or cotransport? *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* **98**:3628-3630.

Tropezando con el transporte activo

J. Skou, 1957, *Biochem. Biophys. Acta* 23:394

EXPERIMENTO CLÁSICO 11.1

A mediados de 1950, Jens Skou era un joven médico que investigaba los efectos de los anestésicos locales en las bicapas lipídicas aisladas. Necesitaba una enzima asociada a membranas fácil de ensayar para emplear como marcador en sus estudios. Descubrió una enzima crítica para el mantenimiento del potencial de membrana, la ATPasa Na^+/K^+ , una bomba molecular que cataliza el transporte activo.

Antecedentes

Durante la década de 1950, muchos investigadores en todo el mundo se encontraban investigando activamente la fisiología de la membrana celular, que desempeña una función en una diversidad de procesos biológicos. Ya se sabía con certeza que la concentración de muchos iones es distinta dentro de la célula y fuera de ésta. Por ejemplo, la célula mantiene una baja concentración intracelular de sodio (Na^+) y una elevada concentración intracelular de potasio (K^+), con respecto a la que se encuentra en el exterior celular. De algún modo, la membrana puede regular las concentraciones salinas intracelulares. Además, se ha observado el movimiento de iones a través de las membranas celulares, lo que sugiere que existe cierto tipo de sistema de transporte. Para mantener las concentraciones intracelulares normales de Na^+ y K^+ , el sistema de transporte no puede descansar en la difusión pasiva porque ambos iones deben movilizarse a través de la membrana en contra de sus gradientes de concentración. Este proceso, que requiere energía, se denominó transporte activo.

En el momento de los experimentos de Skou, el mecanismo del transporte activo aún no estaba claro. Sorprendentemente, Skou no tenía intención de ayudar a esclarecerlo. Encontró la ATPasa Na^+/K^+ por accidente, en su búsqueda de una actividad enzimática abundante fácilmente medible, asociada con membranas lipídicas. Un estudio reciente había mostrado que las membranas derivadas de los axones de calamar contenían una enzima asociada a la membrana, que podía

hidrolizar ATP. Pensando en que esta sería una enzima ideal para sus propósitos, Skou se propuso aislar esta ATPasa de una fuente más accesible: las neuronas de la pata de cangrejo. Fue durante su caracterización de esta enzima cuando descubrió la función de la proteína.

El experimento

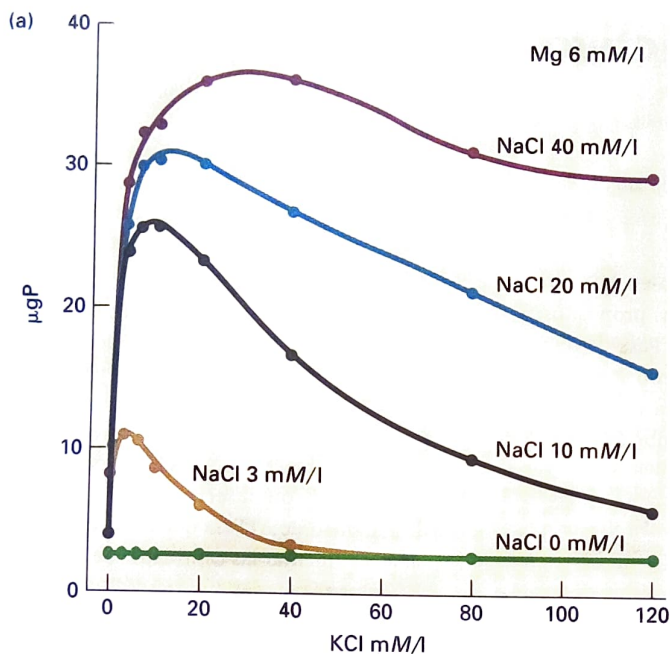
Como el objetivo original de su estudio consistía en caracterizar la ATPasa para utilizarla en estudios posteriores, Skou deseaba saber en qué condiciones experimentales su actividad era sólida y reproducible. Como suele ocurrir con frecuencia con la caracterización de una nueva enzima, se requiere una cuidadosa titulación de los distintos componentes de la reacción. Antes de hacerlo, uno debe asegurarse de que el sistema esté libre de fuentes de contaminación externas.

Para estudiar la influencia de los distintos cationes, incluidos los tres que resultan críticos para la reacción $-\text{Na}^+$, K^+ y Mg^{2+} -, Skou debió asegurarse de que no hubiera iones contaminantes en la reacción provenientes de otra fuente. Por lo tanto, todos los tampones empleados en la purificación de la enzima se prepararon a partir de sales que carecían de estos cationes. Una fuente adicional de cationes contaminantes era el sustrato ATP, que contiene tres grupos fosfato, que aporta una carga global negativa. Puesto que las soluciones de ATP almacenadas, con frecuencia, incluían un catión para equilibrar la carga, Skou convirtió el ATP utilizado en sus reacciones en la forma ácida, de modo que al equilibrar los cationes no se afectaran sus experimentos. Una vez que obtuvo un ambiente bien controlado, podía caracterizar la actividad enzimática. Estas precauciones fueron fundamentales para su descubrimiento.

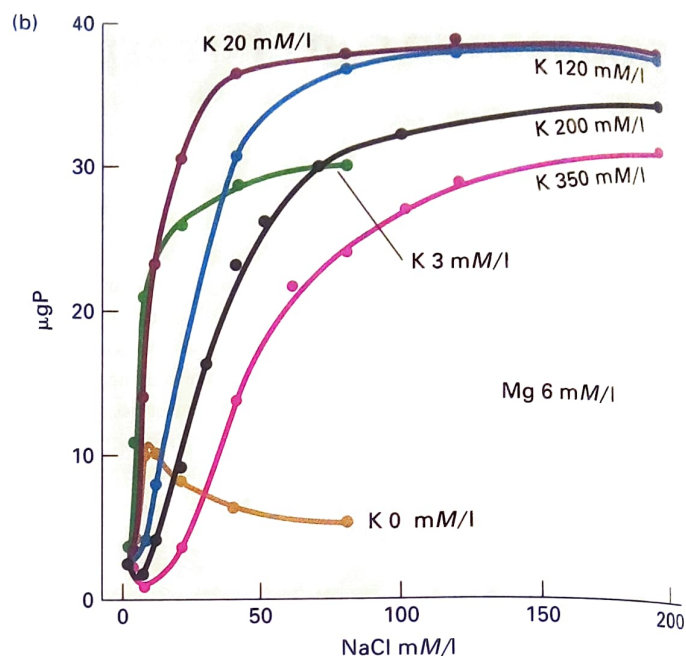
Skou mostró, en primer lugar, que su enzima podía, de hecho, catalizar la escisión de ATP en ADP y fosfato inorgánico. Luego, pasó a observar las condiciones óptimas para esta actividad; para ello, varió el pH de la reacción, así como las concentraciones de

sales y otros cofactores que generaban cationes en la reacción. Pudo determinar fácilmente un pH óptimo y una concentración óptima de Mg^{2+} , pero optimizar el Na^+ y el K^+ resultó más difícil. Independientemente de la cantidad de K^+ añadido a la reacción, la enzima era inactiva sin Na^+ . De modo similar, sin K^+ , Skou observó solo un bajo nivel de actividad de ATPasa que no se incrementaba al aumentar las cantidades de Na^+ .

Estos resultados sugirieron que la enzima requería tanto Na^+ como K^+ para una actividad óptima. Para demostrar que esto era así, Skou llevó a cabo una serie de experimentos en los que midió la actividad enzimática a medida que variaba tanto las concentraciones de Na^+ como de K^+ en la reacción (Fig. 1). Aunque ambos cationes eran claramente necesarios para una actividad significativa, algo notable ocurría a altas concentraciones de cada catión. A la concentración óptima de Na^+ y K^+ , la actividad de la ATPasa alcanzaba un máximo. Alcanzado este máximo, el incremento adicional de la concentración no afectaba la actividad de la ATPasa. El Na^+ se comportaba, así, como un sustrato enzimático clásico, de modo tal que al incrementar la cantidad, se alcanzaba una actividad máxima hasta una concentración de saturación a la cual la actividad alcanzaba una meseta. El K^+ , por otra parte, se comportaba de modo distinto. Cuando la concentración de K^+ se incrementaba más allá de lo óptimo, la actividad de la ATPasa declinaba. De este modo, mientras se requería K^+ para la actividad óptima a elevadas concentraciones, se inhibía la enzima. Skou consideró que la enzima debía tener sitios de unión separados para Na^+ y K^+ . Para la actividad óptima de la ATPasa, ambos debían estar llenos. Sin embargo, a elevadas concentraciones de K^+ , éste competiría por el sitio de unión Na^+ y conduciría a la inhibición enzimática. Formuló la hipótesis de que esta enzima estaba implicada en el transporte activo, es decir, el bombeo de Na^+ hacia el exterior de la célula acoplado a la importación de K^+ al interior. Los estudios posteriores probaron que esta enzima era, de hecho, la bomba que cataliza-



Demostración de la dependencia de la actividad de la ATPasa Na^+/K^+ en la concentración de cada ion. La gráfica de la izquierda muestra que al incrementar el K^+ , se conduce a una inhibición de la actividad de la ATPasa. La gráfica de la derecha permite observar que al incrementarse el Na^+ , la actividad de la



enzima aumenta hasta un máximo y luego se nivela. Esta gráfica demuestra también la dependencia de la actividad en los bajos niveles de K^+ . (Adaptado de J. Skou, 1957, *Biochem. Biophys. Acta* 23:394.)

ba el transporte activo. Este hallazgo fue tan estimulante que Skou dedicó sus investigaciones posteriores al estudio de esta enzima que nunca empleó como marcador, como inicialmente se propuso.

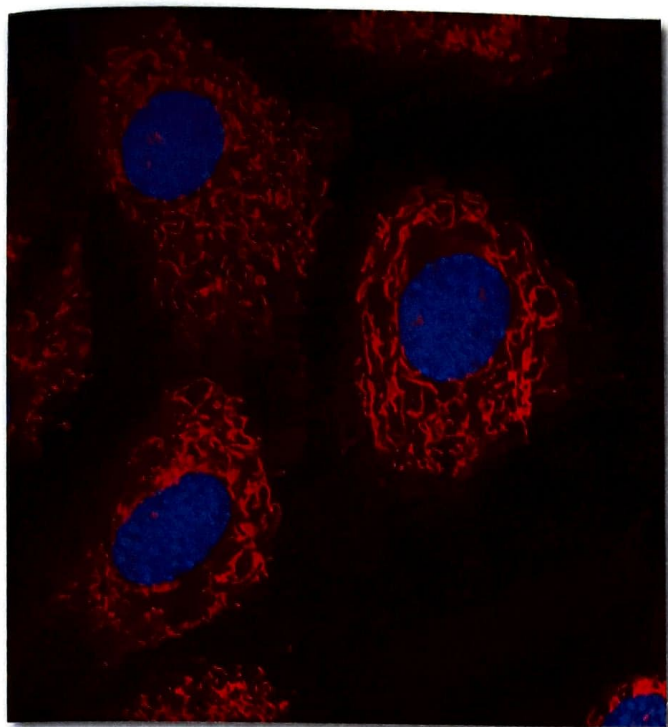
Discusión

El hallazgo de Skou de que una ATPasa de membrana empleaba tanto Na^+ como K^+ como sustratos fue el primer paso de la comprensión

del transporte activo a nivel molecular. ¿De qué manera Skou supo que debía probar tanto el Na^+ como el K^+ ? En su conferencia Nobel de 1997, explicó que en sus primeros intentos para caracterizar la ATPasa no tomó precauciones para evitar el empleo de tampones y las soluciones de almacenamiento de ATP que contenían Na^+ y K^+ . Al evaluar los resultados curiosos y no reproducibles que obtenía, se dio cuenta de que las sales contaminantes podían estar ejerciendo influencia en la reacción. Cuando repitió los experimentos, esta vez evitando la contaminación

por Na^+ y K^+ en todas las etapas, obtuvo resultados claros y reproducibles.

El descubrimiento de la ATPasa Na^+/K^+ produjo un impacto enorme en la biología de la membrana y permitió una mejor comprensión del potencial de la membrana. La generación y la interrupción del potencial de la membrana forma la base de muchos procesos biológicos que incluyen la neurotransmisión, el acoplamiento de energía química y eléctrica. Por su descubrimiento fundamental, Skou recibió el premio Nobel de Química en 1997.



Microfotografía inmunofluorescente que muestra la red entrelazada de mitocondrias (rojo) en células humanas cultivadas HeLa. Los núcleos de estas células están teñidos de púrpura (Dr. Gopal Murti/Photo Researchers).

Energética celular

Desde el crecimiento y la división de una célula hasta el latido de un corazón o la actividad eléctrica de una neurona que subyace a la acción de pensar, la vida requiere energía. La energía se define como la capacidad de realizar trabajo y a nivel celular ese trabajo incluye la conducción y la regulación de una multitud de reacciones químicas y procesos de transporte, crecimiento y división, la generación y el mantenimiento de una estructura altamente organizada, así como la interacción con otras células. Este capítulo describe los mecanismos moleculares por los cuales las células utilizan la energía solar o los nutrientes químicos como fuentes de energía, con una atención especial en cómo las células convierten estas fuentes externas de energía en un transportador de energía química, intracelular y lógicamente universal: la **adenosina trifosfato** o **ATP** (Fig. 12-1). El ATP se encuentra en todos los tipos de organismos y está presumiblemente presente en las formas de vida más primitivas, generándose a partir de la adición química de un fosfato inorgánico (HPO_4^{2-} , a menudo abreviado como P_i) a un difosfato de adenosina (o ADP), proceso al cual se denomina fosfori-

lación. Las células utilizan la energía liberada durante la hidrólisis del enlace fosfoanhídrido terminal en el ATP (véase la Fig. 2-31), a fin de impulsar muchos otros procesos desfavorables desde el punto de vista energético. Los ejemplos incluyen la síntesis de proteínas a partir de los aminoácidos y los ácidos nucleicos hasta los nucleótidos (Cap. 4), el transporte de moléculas en contra de un gradiente de concentración mediante bombas impulsadas por ATP (Cap. 11), la contracción del músculo (Cap. 17) y el batido de los cilios (Capítulo 18). Un tema clave de la energética celular es el uso de las proteínas, o “acoplar” la energía liberada a partir de un proceso (p. ej., hidrólisis de ATP) para conducir otro proceso (p. ej., el movimiento de las moléculas a través de las membranas), que de otro modo sería termodinámicamente desfavorable.

La energía para impulsar la síntesis de ATP a partir de ADP ($\Delta G^\circ' = 7,3 \text{ kcal/mol}$) deriva principalmente de dos fuentes: la energía en los enlaces químicos de los nutrientes y la energía de la luz solar (Fig. 12-1). Los dos principales procesos responsables de convertir

CONTENIDO

12.1	Primer paso de la captura de energía de la glucosa: glucólisis	519
12.2	Mitocondrias y ciclo del ácido cítrico	524
12.3	Cadena de transporte de electrones y generación de la fuerza protón-motriz	532
12.4	Aprovechamiento de la fuerza protón-motriz para sintetizar ATP	544

12.5	Fotosíntesis y pigmentos que absorben la luz	552
12.6	Análisis molecular de los fotosistemas	559
12.7	Metabolismo del CO_2 durante la fotosíntesis	567

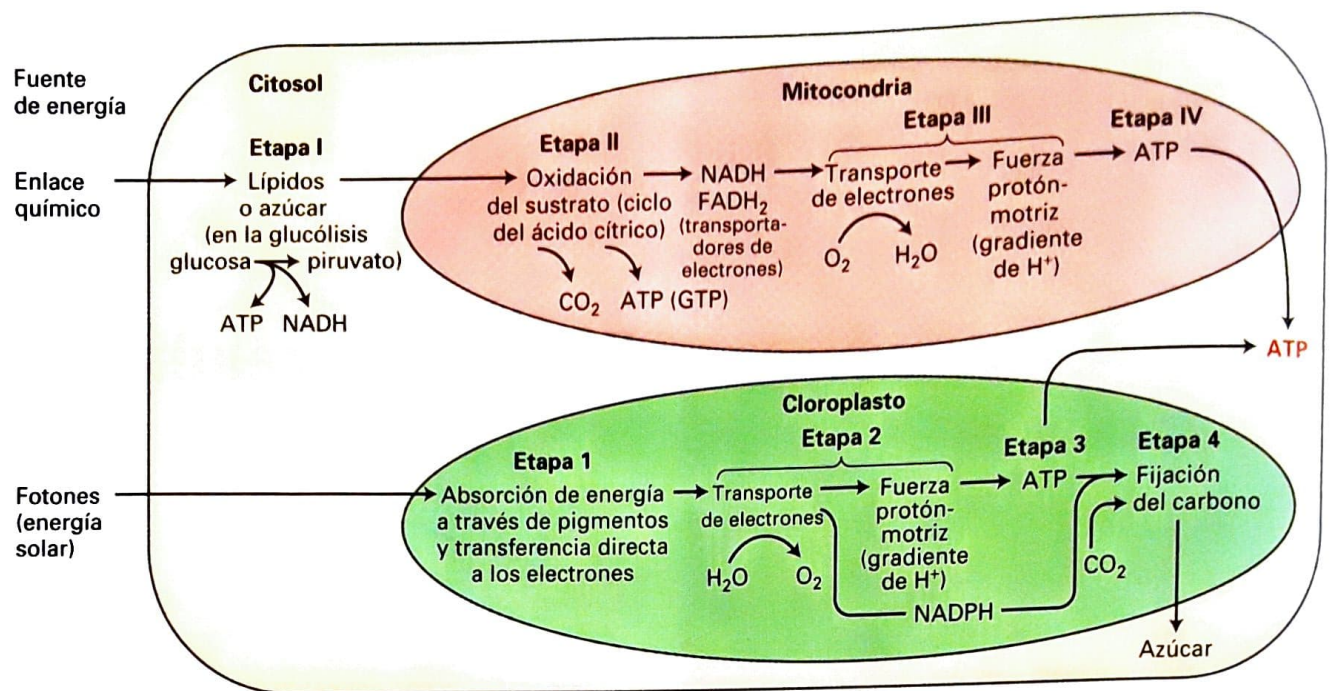


FIGURA 12-1 Panorama general de la oxidación aeróbica y la fotosíntesis. Las células eucariontes utilizan mecanismos fundamentales para convertir fuentes externas de energía en ATP. (Arriba) En la oxidación aeróbica, las moléculas de "combustible" (azúcares principales y ácidos grasos) sufren procesamiento preliminar en el citosol, por ejemplo, la degradación de la glucosa a piruvato (**etapa I**) y luego son transferidas a la mitocondria, donde son convertidas por oxidación con O_2 a dióxido de carbono y agua (**etapas II y III**) generándose ATP (**etapa IV**). (Abajo) En la fotosíntesis, que se produce en los cloroplastos, la energía radiante de la luz es absorbida por pigmentos especializados (**etapa 1**); la energía absorbida se utiliza tanto para oxidar

agua a O_2 , como para establecer las condiciones (**etapa 2**) necesarias a fin de generar ATP (**etapa 3**) e hidratos de carbono a partir de CO_2 (fijación del carbono, **etapa 4**). Ambos mecanismos involucran la producción de transportadores de electrones de alta energía (NADH, NADPH, $FADH_2$) y movimientos de electrones a favor de un gradiente de potencial eléctrico en una cadena de transporte electrónico a través de membranas especializadas. La energía de estos electrones es liberada y capturada como un gradiente electroquímico de protones (fuerza protón-motriz) que luego es utilizada para impulsar la síntesis de ATP. Las bacterias utilizan procesos comparables.

estas fuentes de energía en ATP son la **oxidación aeróbica** (también conocida como **respiración aeróbica**), que se produce en la mitocondria en casi todas las células eucariontes (Fig. 12-1, arriba) y la **fotosíntesis**, que se produce en los cloroplastos únicamente en las células de las hojas de las plantas (Fig. 12-1, abajo) y en ciertos organismos, como las algas y las cianobacterias. Dos procesos adicionales, la glucólisis y el ciclo del ácido cítrico (Fig. 12-1, arriba), también son fuentes directas o indirectas importantes de ATP tanto en las células animales como en las vegetales.

En la oxidación aeróbica, los productos de degradación de los azúcares (hidratos de carbono) y de los ácidos grasos (hidrocarburos) —ambos derivados en los animales de la digestión de alimentos—, son convertidos por oxidación con O_2 a dióxido de carbono y agua. La energía liberada de esta reacción global es transformada en la energía química de los enlaces fosfoanhídridos en ATP. Esto es análogo a quemar madera (hidratos de carbono) o combustible (hidrocarburos), para generar calor en hornos o movimiento en motores de automóviles: ambos consumen O_2 y generan dióxido de carbono y agua. La diferencia clave es que las células descomponen la reacción en muchos pasos, con la cantidad de energía liberada en cualquiera de los pasos dados casi coincidentemente con la cantidad de energía que se puede almacenar (p. ej., como ATP), o que es necesaria para el siguiente paso intermediario. Si no existiera tal correspondencia estrecha, la energía liberada en exceso se perdería como calor (que sería muy ineficiente) o no se liberaría la suficiente energía para generar moléculas de almacenamiento de energía como el ATP o conducir el siguiente paso en el proceso (lo cual sería ineficaz).

En la fotosíntesis, la energía radiante de la luz es absorbida por los pigmentos como clorofila y utilizada para sintetizar ATP e hidratos de carbono, fuente principal de sacarosa y almidón. A diferencia de la oxidación aeróbica, que utiliza hidratos de carbono y O_2 para generar CO_2 , la fotosíntesis utiliza CO_2 como un sustrato y genera O_2 e hidratos de carbono como productos.

Esta relación recíproca entre la oxidación aeróbica que se produce en las mitocondrias y la fotosíntesis en los cloroplastos subyace a una relación simbiótica profunda entre los organismos fotosintéticos y los no fotosintéticos. El oxígeno generado durante la fotosíntesis es la fuente de virtualmente todos los oxígenos en el aire, y los hidratos de carbono producidos son la fuente fundamental de energía para virtualmente todos los organismos no fotosintéticos sobre la tierra (una excepción son las bacterias que viven en las profundidades de los respiraderos oceánicos —y los organismos que se alimentan de ellas—, que obtienen la energía al convertir el CO_2 en hidratos de carbonos mediante la oxidación de compuestos inorgánicos reducidos, generados geológicamente al ser liberados por los respiraderos).

A primera vista, podría parecer que el mecanismo molecular de la fotosíntesis y de la oxidación aeróbica tienen algo en común, además del hecho de que ambos producen ATP. Sin embargo, un descubrimiento revolucionario en la biología celular estableció que las bacterias, las mitocondrias y los cloroplastos utilizan el mismo mecanismo, conocido como **quimiosmosis**, a fin de generar ATP a partir de ADP y P_i . En la quimiosmosis (también conocida como acoplamiento quimiosmótico), primero se genera un gradiente electroquímico a través de la membrana, conducido por la energía liberada a medida que los

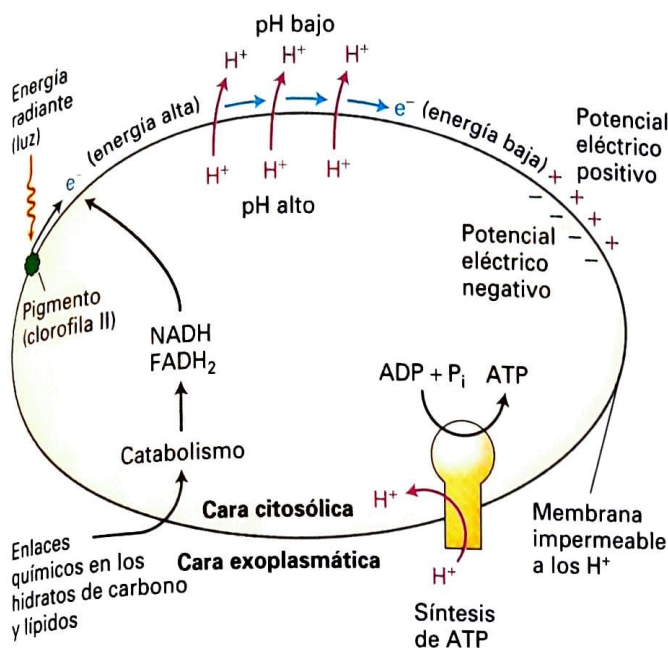


FIGURA 12-2 La fuerza protón-motriz impulsa la síntesis de ATP. Los gradientes de concentración de protones transmembrana y eléctricos (voltaje), colectivamente denominados *fuerza protón-motriz*, se generan durante la oxidación aeróbica y la fotosíntesis en los eucariontes y los procariontes (bacterias). Los electrones de alta energía generados por la absorción de luz por los pigmentos (p. ej., clorofila) o mantenidos en la forma reducida de los transportadores de electrones (p. ej., NADH, FADH₂) sintetizados durante el catabolismo de los azúcares y lípidos, pasan descendiendo a través de una cadena de transporte de electrones (flechas azules), liberando energía a través de todo el proceso. La energía liberada se utiliza para bombear protones a través de la membrana (flechas rojas), generando la fuerza protón-motriz. En el acoplamiento quimiosmótico, la energía liberada cuando los protones descienden a favor del gradiente a través de la ATP sintasa conduce a la síntesis de ATP. La fuerza protón-motriz también impulsa otros procesos, como el transporte de metabolitos a través de la membrana en contra de su gradiente de concentración y la rotación de flagelos bacterianos.

electrones descienden recorriendo su gradiente de potencial eléctrico por la **cadena de transporte de electrones**. La energía almacenada en este gradiente electroquímico de protones, llamado la **fuerza protón-motriz**, se utiliza después para impulsar la síntesis de ATP (Fig. 12-2) u otros procesos que requieren energía. A medida que los protones se mueven descendiendo a través de su gradiente electroquímico mediante la síntesis de ATP, se sintetiza ATP a partir de ADP y P_i, proceso que es inverso a la bomba de iones impulsada por ATP, analizada en el capítulo anterior. En este capítulo, describiremos los mecanismos moleculares de los dos procesos que comparten este mecanismo central, haciendo énfasis primero en la oxidación aeróbica y luego en la fotosíntesis.

12.1 Primer paso de la captura de energía de la glucosa: glucólisis

En un motor de automóvil, el combustible hidrocarbonado es convertido oxidativa y explosivamente en un proceso de dos pasos a trabajo mecánico (es decir, moviendo un pistón) además de producir

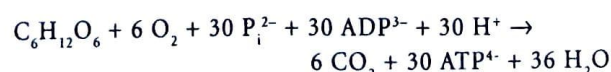
CO₂ y agua. El proceso es relativamente ineficiente en cuanto a que cantidades sustanciales de energía química almacenada en el combustible son desperdiciadas a medida que son convertidas a calor inutilizable, y cantidades sustanciales de combustible son solo parcialmente oxidadas y luego liberadas como elementos carbonosos, a veces tóxicos. En la competencia por sobrevivir, un organismo no puede permitirse desperdiciar sus recursos energéticos (a veces limitados) en un proceso equivalentemente ineficaz; por ende, ha evolucionado un mecanismo más eficaz para la conversión de combustible en trabajo. Ese mecanismo, conocido como oxidación aeróbica, proporciona las siguientes ventajas:

- Al dividir el proceso de conversión de energía en múltiples pasos que generan diversos intermediarios que portan energía, la energía del enlace químico es canalizada de modo eficiente en la síntesis de ATP, con menos energía perdida como calor.
- Diversos combustibles (azúcares y ácidos grasos) son reducidos a intermediarios comunes que pueden luego compartir las subsiguientes vías para la combustión y síntesis de ATP.
- Debido a que la energía total almacenada en los enlaces de las moléculas de combustible inicial es sustancialmente mayor a la necesaria para conducir la síntesis de una única molécula de ATP (~ 7,3 kcal/mol), se producen muchas moléculas de ATP.

Una característica importante de la producción de ATP a partir de la descomposición de los nutrientes a CO₂ y agua (véase la Fig. 12-1, *parte superior*) es el conjunto de reacciones, denominadas como **respiración**, que involucran una serie de reacciones de reducción y oxidación llamadas *cadena de transporte de electrones*. La combinación de estas reacciones con la fosforilación de ADP para formar ATP se denomina **fosforilación oxidativa** y se produce en la mitocondria en casi todas las células eucariontes. Cuando el oxígeno está disponible y se utiliza como el receptor final de la vía de transporte de electrones, el proceso respiratorio que convierte la energía de los nutrientes en ATP se denomina **respiración aeróbica** u **oxidación aeróbica**. La respiración aeróbica es un camino en especial eficiente para maximizar la conversión de la energía de los nutrientes en ATP, debido a que el oxígeno es un oxidante relativamente fuerte. Si alguna molécula además del oxígeno, por ejemplo el oxidante débil sulfato (SO₄²⁻) o el nitrato (NO₃⁻), es el receptor final de los electrones en la cadena de transporte de electrones, el proceso se denomina **respiración anaerobia**. La respiración anaerobia es típica de algunos microorganismos procariontes. A pesar de que hay excepciones, la mayoría de los organismos eucariontes multicelulares (metazoos) usan respiración aeróbica para generar la mayoría de sus ATP.

En nuestro análisis, estaremos trazando el destino de dos combustibles celulares principales: azúcares (en especial glucosa) y ácidos grasos. En ciertas condiciones, los aminoácidos también alimentan estas vías metabólicas. Primero se considerará la oxidación de la glucosa y luego la de los ácidos grasos.

La oxidación aeróbica completa de una molécula de glucosa produce 6 moléculas de CO₂ y la energía liberada se acopla a la síntesis de tanto como 30 moléculas de ATP. La reacción global es:



La oxidación de la glucosa en los eucariontes se produce en cuatro etapas (véase la Fig. 12-1, *arriba*):

Etapla I: Glucólisis En el citosol, una molécula de glucosa de 6 carbonos es convertida a través de una serie de reacciones a dos moléculas de piruvatos de 3 carbonos; se producen dos ATP netos por cada molécula de glucosa.

Etapla II: Ciclo de ácido cítrico En la mitocondria, la oxidación del piruvato a CO_2 produce transportadores de alta energía NADH y FADH_2 , que almacenan la energía para su uso posterior.

Etapla III: Cadena de transporte de electrones Los electrones de alta energía fluyen descendiendo en su gradiente de potencial eléctrico desde el NADH y el FADH_2 hasta el O_2 , a través de proteínas de membrana que transforman la energía liberada en una fuerza protón-motriz (gradiente de H^+).

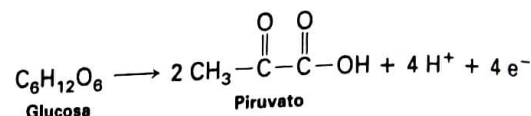
Etapla IV: Síntesis de ATP La fuerza protón-motriz impulsa la síntesis de ATP, a medida que los protones fluyen a favor de sus gradientes de concentración y voltaje a través de la enzima que sintetiza ATP. Para cada molécula de glucosa original, se estima que se producen 28 ATP adicionales por este mecanismo de fosforilación oxidativa.

En esta sección, se analiza el estadio I: las vías bioquímicas que degradan la glucosa a piruvato en el citosol. También se analiza cómo se regulan estas vías y se compara el metabolismo de la glucosa en condiciones aerobias y anaerobias. El destino final del piruvato, una vez que entra a la mitocondria, se analiza en la Sección 12.2.

Durante la glucólisis (etapa I), las enzimas citosólicas convierten glucosa en piruvato

La **glucólisis**, primera etapa de la oxidación de la glucosa, se produce en el citosol tanto en los eucariontes como en los procariontes; no requiere oxígeno molecular (O_2) y por lo tanto, es un proceso anaerobio. La glucólisis es un ejemplo del **catabolismo**, la degradación biológica de sustancias complejas en una más simple. Un grupo de 10 enzimas citosólicas solubles en agua catalizan las reacciones que constituyen la vía glucolítica (*gluco*, “dulce”; *lisis*, “rotura”), en la cual una molécula de glucosa es convertida a dos moléculas de piruvato (Fig. 12-3). Toda la reacción de intermediarios producidos por estas enzimas es soluble en agua; los compuestos fosforilados se denominan **intermediarios metabólicos**. Además de la conversión química de una molécula de glucosa en dos piruvatos, la vía glucolítica genera cuatro moléculas de ATP mediante fosforilación de cuatro ADP (reacciones 7 a 10). El ATP se forma directamente a través de la unión, catalizada por enzima, de ADP y P_i que proviene de intermediarios metabólicos fosforilados; proceso al cual se denomina **fosforilación a nivel de sustrato** (para distinguirla de la **fosforilación oxidativa** que genera ATP en las etapas III y IV). La fosforilación al nivel de sustrato en la glucólisis no involucra el uso de una fuerza protón-motriz; esta requiere la adición previa (en las reacciones 1 a 3) de dos fosfatos procedentes de dos ATP. Estos se pueden pensar como reacciones de “cebado de bombas”, que introducen una pequeña cantidad de energía por adelantado con el fin de recuperar más energía corriente abajo. Así, la glucólisis produce solo dos moléculas netas de ATP por molécula de glucosa.

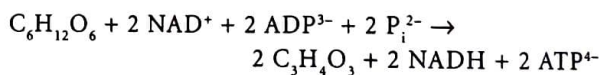
La ecuación química balanceada para la conversión de glucosa a piruvato demuestra que también se liberan cuatro átomos de hidrógeno (cuatro protones y cuatro electrones):



(Por conveniencia, aquí mostramos piruvato en su forma no ionizada, ácido pirúvico, aunque a pH fisiológico podría estar en gran parte disociado). Los cuatro electrones y dos de los cuatro protones son transferidos (Fig. 12-3, reacción 6) a dos moléculas de la forma oxidada de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) para producir la forma reducida de la coenzima, NADH (véase la Fig. 2-33):



Más adelante se verá que la energía que llevan los electrones en el NADH y el transportador de electrones análogo FADH_2 , la forma reducida de la coenzima **flavina adenina dinucleótido (FAD)**, se puede utilizar para sintetizar ATP adicional a través de la cadena transportadora de electrones. La ecuación química global para esta primera etapa del metabolismo de la glucosa es:

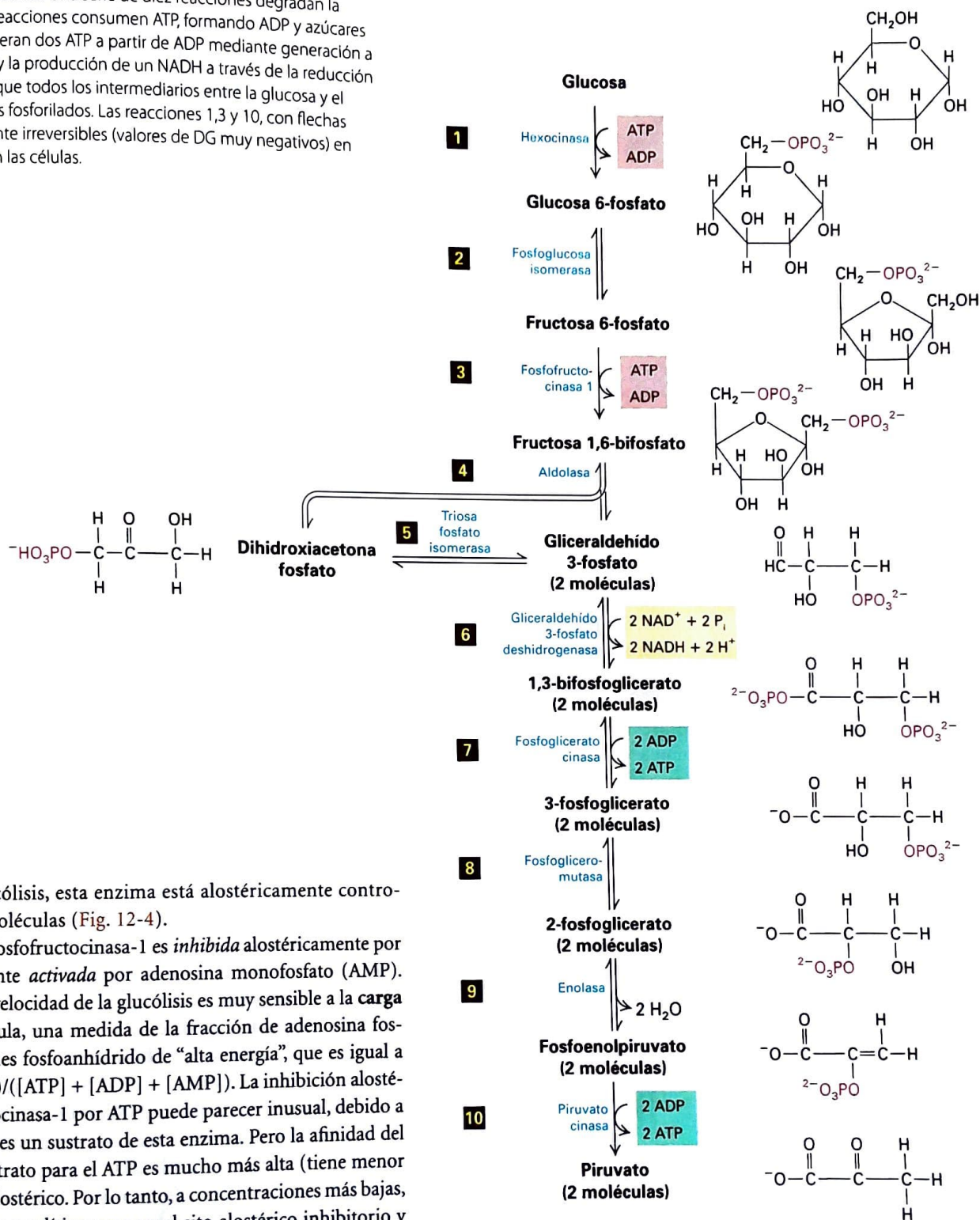


Después de la glucólisis, solo una fracción de la energía disponible en la glucosa se ha extraído y convertido a ATP y NADH. El resto permanece atrapado en los enlaces covalentes de dos moléculas de piruvato. La capacidad para convertir de manera eficiente la energía remanente en el piruvato a ATP depende de la presencia de oxígeno molecular. Como se verá, la conversión de la energía es sustancialmente más eficiente en condiciones aerobias que en condiciones anaerobias.

La velocidad de la glucólisis se ajusta para satisfacer las necesidades de ATP de la célula

Para mantener concentraciones adecuadas de ATP, las células deben controlar la velocidad de catabolismo de la glucosa. El funcionamiento de la vía glucolítica (etapa I), así como del ciclo del ácido cítrico (etapa II), está continuamente regulado sobre todo por mecanismos alostéricos (véase el Cap. 3 para principios generales de control alostérico). Tres enzimas alostéricas involucradas en la glucólisis cumplen una función clave en la regulación de la vía glucolítica completa. La **hexocinasa** (Fig. 12-3, paso 1) es inhibida por su producto de reacción, la glucosa 6 fosfato. La **piruvato cinasa** (paso 10) es inhibida por ATP, de manera tal que la glucólisis desciende si hay mucho ATP presente. La tercera enzima, la **fosfofructocinasa-1** (paso 3), es la principal enzima limitante de la velocidad de la vía glucolítica. Emblemática de su función crítica en la regulación de la

FIGURA 12-3 Vía glucolítica. Una serie de diez reacciones degradan la glucosa a piruvato. Dos reacciones consumen ATP, formando ADP y azúcares fosforilados (rojo); se generan dos ATP a partir de ADP mediante generación a nivel de sustrato (verde) y la producción de un NADH a través de la reducción de NAD^+ (amarillo). Nótese que todos los intermediarios entre la glucosa y el piruvato son compuestos fosforilados. Las reacciones 1, 3 y 10, con flechas simples, son esencialmente irreversibles (valores de ΔG muy negativos) en condiciones normales en las células.



velocidad de la glucólisis, esta enzima está alostéricamente controlada por diversas moléculas (Fig. 12-4).

Por ejemplo, la fosfofructocinasa-1 es *inhibida* alostéricamente por ATP y alostéricamente *activada* por adenosina monofosfato (AMP). Como resultado, la velocidad de la glucólisis es muy sensible a la **carga de energía** de la célula, una medida de la fracción de adenosina fosfato que tiene uniones fosfoanhídrido de "alta energía", que es igual a $([\text{ATP}] + 0,5 [\text{ADP}]) / ([\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}])$. La inhibición alostérica de la fosfofructocinasa-1 por ATP puede parecer inusual, debido a que el ATP también es un sustrato de esta enzima. Pero la afinidad del sitio de unión al sustrato para el ATP es mucho más alta (tiene menor K_m) que la del sitio alostérico. Por lo tanto, a concentraciones más bajas, el ATP se une al sitio catalítico pero no al sitio alostérico inhibitorio y la catálisis enzimática procede a una velocidad cercana a la máxima. A concentraciones altas, el ATP también se une al sitio alostérico, induciendo un cambio conformacional que reduce la afinidad de la enzima para el otro sustrato (la fructosa 6-fosfato) y, por lo tanto, reduce la velocidad de esta reacción y la velocidad global de la glucólisis.

Otro activador alostérico importante de la fosfofructocinasa-1 es la **fructosa 2,6-bisfosfato**. Este metabolito se forma a partir de la fructosa 6-fosfato por una enzima que se denomina fosfofructocinasa-2. La fructosa 6-fosfato acelera la formación de **fructosa 2,6-bisfosfato**, que a su vez activa a la fosfofructocinasa-1. Este tipo de control por retroalimentación se conoce como **activación de anterocontrol (feed-forward activation)**, en la cual la abundancia de un metabolito (aquí, la fructosa

6-fosfato) acelera su metabolismo subsiguiente. La fructosa 2,6-bisfosfato activa alostéricamente a la fosfofructocinasa-1 en las células hepáticas al disminuir el efecto inhibitorio del ATP e incrementar la afinidad de la fosfofructocinasa-1 por uno de sus sustratos, la fructosa 6-fosfato.

Las tres enzimas glucolíticas que son reguladas por reacciones catalizadas alostéricamente con valores muy negativos de ΔG° constituyen reacciones esencialmente irreversibles en condiciones ordinarias. Por ende, estas enzimas son particularmente adecuadas para

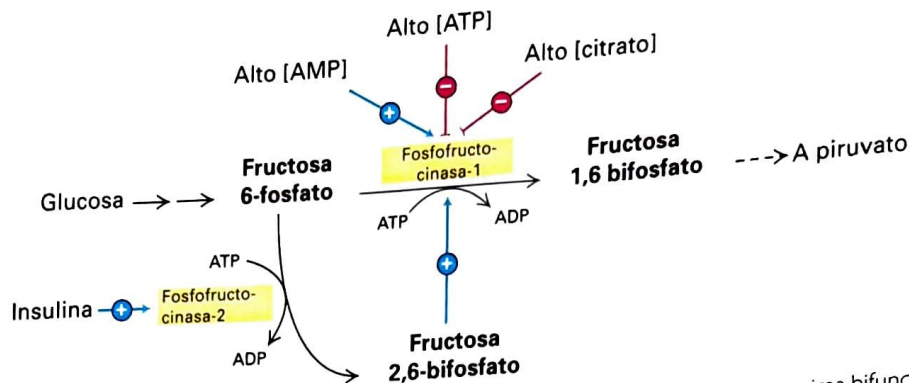


FIGURA 12-4 Regulación alostérica del metabolismo de la glucosa.

La enzima reguladora clave en la glucólisis, la fosfofructocinasa-1, es activada alostéricamente por AMP y fructosa 2,6-bisfosfato, que se encuentran a concentraciones altas cuando los almacenamientos de energía de la célula son bajos. La enzima es inhibida por ATP y citrato, los cuales son elevados cuando la célula está oxidando activamente glucosa a CO_2 (es decir, cuando los almacenamientos de energía son elevados). Más adelante se verá que el citrato es generado durante la etapa II de la oxidación de glucosa. La

fosfofructocinasa-2 (PFK2) es una enzima bifuncional: su actividad cinasa forma fructosa 2,6-bisfosfato a partir de fructosa 6-fosfato y su actividad cinasa cataliza la reacción inversa. La insulina, que es liberada por el páncreas cuando los niveles de glucosa son altos, estimula la actividad cinasa y por ende estimula la glucólisis. A baja concentración sanguínea de glucosa, el glucagón es liberado desde el páncreas y promueve la actividad fosfatasa PFK2 en el hígado, disminuyendo indirectamente la glucólisis.

la regulación de la vía glucolítica completa. Se ejerce control adicional por la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, la cual cataliza la reducción de NAD^+ a NADH (véase la Fig. 12-3, paso 6). Como veremos, el NADH es un transportador de electrones de alta energía usado posteriormente durante la fosforilación oxidativa en la mitocondria. Si el NADH citosólico se acumula debido a una desaceleración de la oxidación mitocondrial, el paso 6 se torna termodinámicamente menos favorable.

El metabolismo de la glucosa se controla de manera diferente en diversos tejidos de mamífero para satisfacer las necesidades metabólicas del organismo en su totalidad. Durante periodos de privación de hidratos de carbonos, por ejemplo, es necesario que el hígado libere glucosa al torrente sanguíneo. Para realizar esto el hígado convierte el polímero de glucógeno, una forma de almacenamiento de la glucosa (Cap. 2), directamente a glucosa 6-fosfato (sin involucrar a la hexocinasa, paso 1). En estas condiciones, existe una reducción de la concentración de la fructosa 2,6-bisfosfato y una actividad disminuida de la fosfofructocinasa-1 (Fig. 12-4). Como resultado, la glucosa 6-fosfato que deriva del glucógeno no es metabolizada a piruvato; en cambio, es convertida a glucosa mediante una fosfatasa y liberada a la circulación sanguínea para nutrir el cerebro y los glóbulos rojos, que dependen principalmente de la glucosa para su energía. En todos los casos, la actividad de estas enzimas reguladas está controlada por la concentración de pequeñas moléculas (metabolitos), en general por interacciones alostéricas o por reacciones de fosforilación y desfosforilación mediada por hormona (el Cap. 15 brinda un análisis detallado del control hormonal del metabolismo de la glucosa en el hígado y el músculo).

La glucosa se fermenta cuando el oxígeno escasea

Muchos eucariontes, incluyendo los seres humanos, son *aerobios obligados*: crecen solo en presencia de oxígeno molecular y pueden metabolizar la glucosa (o azúcares relativos) completamente a CO_2 , con la

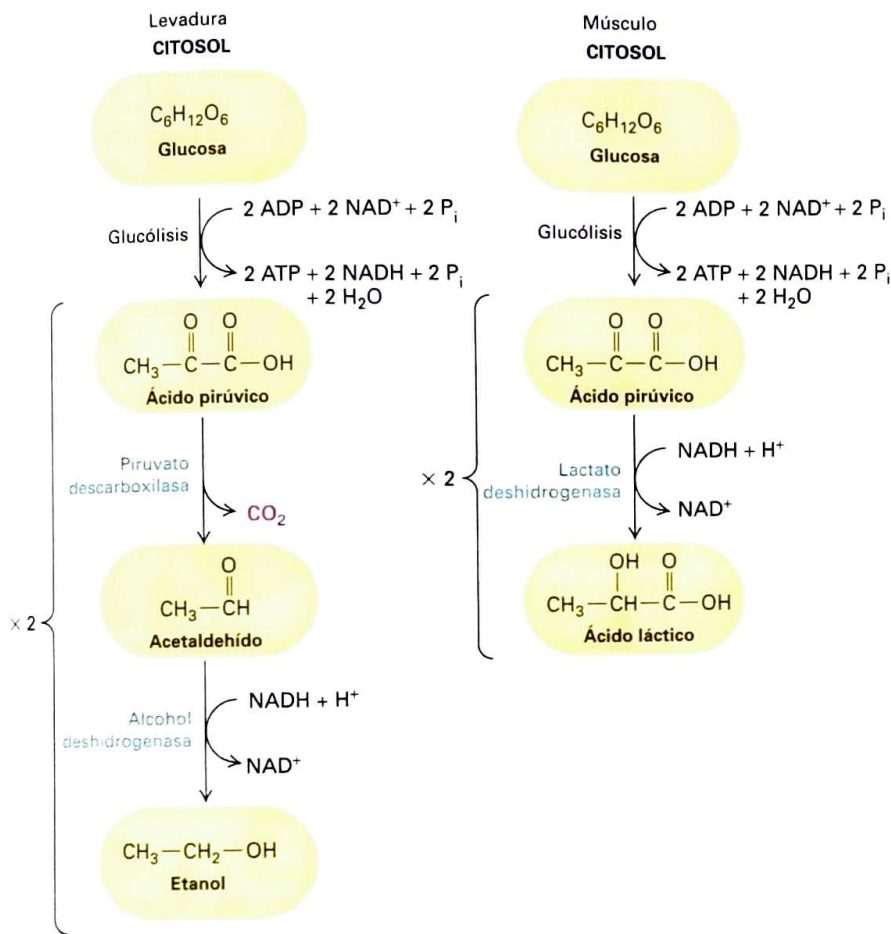
producción concomitante de una gran cantidad de ATP. La mayoría de los eucariontes, sin embargo, pueden generar algo de ATP mediante metabolismo aerobio. Unos pocos eucariontes son anaerobios facultativos: crecen tanto en presencia como en ausencia de oxígeno. Por ejemplo, los anélidos, los moluscos y algunas levaduras pueden sobrevivir sin oxígeno, produciendo el ATP por fermentación.

En ausencia de oxígeno, las levaduras convierten el piruvato producido por glucólisis a una molécula de etanol y una de CO_2 ; en estas reacciones dos moléculas de NADH se oxidan a NAD^+ por cada dos piruvatos que se convierten a etanol, regenerando así el suministro de NAD^+ que es necesario para que continúe la glucólisis (Fig. 12-5a, izquierda). Este catabolismo de la glucosa, denominado **fermentación**, es la base de la producción de cerveza y vino.

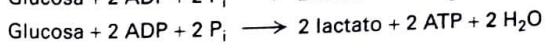
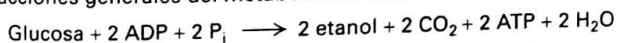
La fermentación también se produce en células animales, aunque el producto es el ácido láctico, no el alcohol. Durante la contracción prolongada de las células de músculo esquelético de mamíferos —por ejemplo, durante el ejercicio— el oxígeno dentro del tejido muscular se torna escaso. En consecuencia, el catabolismo de la glucosa se limita a la glucólisis y las células musculares convierten piruvato a dos moléculas de ácido láctico mediante una reacción de reducción que también oxida dos NADH a dos NAD^+ (Fig. 12-5a, derecha). Aunque el ácido láctico es liberado desde el músculo a la sangre, si las contracciones son lo suficientemente rápidas y fuertes, el ácido láctico se puede acumular de manera transitoria en el tejido y contribuir al dolor muscular y articular durante el ejercicio. Una vez secretado a la sangre, parte del ácido láctico entra al hígado, donde nuevamente es oxidado a piruvato y posteriormente metabolizado a CO_2 de manera aeróbica o es convertido de nuevo a glucosa. El corazón metaboliza mucho lactato a CO_2 , puesto que este órgano está altamente irrigado por sangre y puede continuar con el metabolismo aerobio en los momentos de ejercicio, cuando los músculos esqueléticos con oxígeno escaso secretan lactato. Las bacterias del ácido láctico (los organismos que echan a perder la leche) y otros procariontes, también generan ATP mediante fermentación de la glucosa a ácido láctico.

(a)

METABOLISMO ANAEROBIO (FERMENTACIÓN)

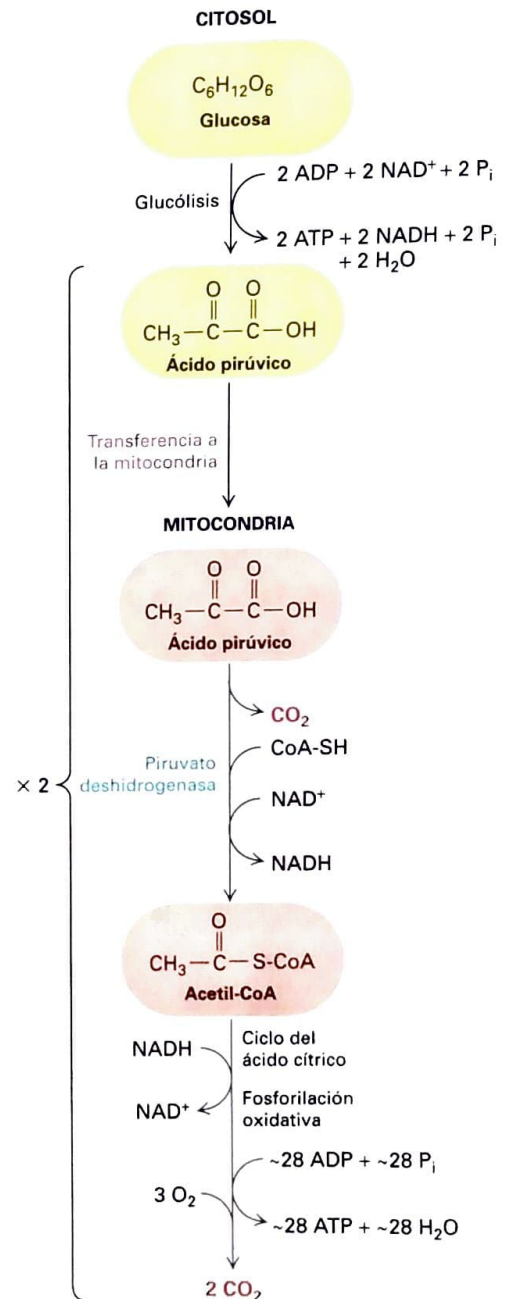


Reacciones generales del metabolismo anaerobio:



(b)

METABOLISMO AEROBIO



Reacción general del metabolismo aerobio:

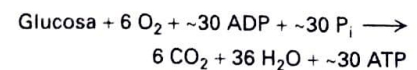


FIGURA 12-5 Metabolismo anaerobio versus metabolismo de la glucosa. El destino final del piruvato formado durante la glucólisis depende de la presencia o la ausencia de oxígeno. (a) En ausencia de oxígeno, el piruvato es degradado solo parcialmente y no se sintetiza ATP. Sin embargo, se transfieren dos electrones de cada molécula de NADH producida durante la glucólisis hasta una molécula aceptadora para formar NAD $^+$, que es necesario para la glucólisis continuada. En las levaduras (izquierda), el acetaldehído es el aceptador electrónico y el etanol es el producto. Este proceso se denomina *fermentación alcohólica*. Cuando el oxígeno escasea en las células musculares

(derecha), el NADH reduce el piruvato para formar ácido láctico, generando NAD $^+$, un proceso que se denomina *fermentación del ácido láctico*. (b) En presencia de oxígeno, el piruvato es transportado al interior de la mitocondria, donde primero es convertido por la piruvato deshidrogenasa a una molécula de CO_2 y a una de ácido acético, esta última conectada con la coenzima A (CoA-SH) para formar acetil-CoA, concomitantemente con la reducción de una molécula de NAD $^+$ a NADH. El metabolismo adicional del acetil-CoA y el NADH genera aproximadamente un adicional de 28 moléculas de ATP por molécula de glucosa oxidada.

La fermentación es una forma menos eficiente para generar ATP que la oxidación aeróbica y por lo tanto, en las células animales solo se produce cuando escasea el oxígeno. En presencia de oxígeno el piruvato formado por la glucólisis es transportado a las mitocondrias, donde es oxidado por el O_2 a CO_2 y H_2O a través de una serie de reacciones que se esquematizan en la Figura 12-5b. Este metabolismo aerobio de la glucosa, que se produce en las etapas II-IV del proceso descrito en la Figura 12-1, genera aproximadamente unas 28 moléculas de ATP adicionales por molécula de glucosa original, superando ampliamente el ATP producido a partir del metabolismo anaerobio de la glucosa (fermentación).

Para comprender cómo se genera ATP de forma tan eficaz a través del metabolismo aerobio, primero se debe considerar la estructura y función del orgánulo responsable: la mitocondria. En la siguiente sección se tratan las mitocondrias y las reacciones que se producen en ellas.

CONCEPTOS CLAVES de la Sección 12.1

Primer paso de la captura de energía de la glucosa: glucólisis

- En un proceso conocido como oxidación aeróbica, las células convierten la energía liberada por la oxidación (“quema”) de la glucosa o los ácidos grasos en enlaces fosfoanhídridos terminales del ATP.
- La oxidación aeróbica total de cada molécula de glucosa produce seis moléculas de CO_2 y aproximadamente 30 moléculas de ATP. El proceso completo, el cual comienza en el citosol y termina en la mitocondria, puede dividirse en cuatro etapas: (I) degradación de la glucosa a piruvato en el citosol (glucólisis); (II) oxidación de piruvato a CO_2 en la mitocondria acoplada a la generación de transportadores de electrones de alta energía NADH y $FADH_2$ (a través del ciclo del ácido cítrico); (III) transporte de electrones para generar una fuerza protón-motriz junto con conversión de oxígeno molecular a agua; y (IV) síntesis de ATP (véase la Fig. 12-1). A partir de cada molécula de glucosa se generan dos ATP por glucólisis (etapa I) y aproximadamente 28 a partir de las etapas II-IV.
- En la glucólisis (etapa I), las enzimas citosólicas convierten la glucosa a dos moléculas de piruvato para generar dos moléculas de NADH y dos de ATP (véase la Fig. 12-3).
- La velocidad de oxidación de la glucosa a través de la glucólisis está regulada por la inhibición o estimulación de diversas enzimas, dependientes de la necesidad de la célula de ATP. La glucosa se almacena (como glucógeno o grasa) cuando el ATP es abundante (véase la Fig. 12-4).
- En ausencia de oxígeno (condiciones anaerobias), las células pueden metabolizar piruvato a ácido láctico o (en el caso de la levadura) a etanol o CO_2 , en el proceso de convertir NADH de vuelta a NAD^+ , el cual es necesario para la glucólisis continuada. En presencia de oxígeno (condiciones aerobias) el piruvato es transportado a la mitocondria, donde es metabolizado a CO_2 en el proceso de generar abundante ATP (véase la Fig. 12-5).

12.2 Mitocondrias y ciclo del ácido cítrico

Las cianobacterias fotosintéticas productoras de oxígeno aparecieron hace alrededor de 2 700 millones de años. La acumulación posterior de suficiente oxígeno (O_2) en la atmósfera de la tierra durante los siguientes aproximadamente mil millones de años, abrió el camino para que los organismos evolucionaran hacia una vía de oxidación aeróbica muy eficaz, la cual a su vez permitió (especialmente durante la llamada explosión del cámbrico) la evolución de formas corporales grandes y complejas, así como de las actividades metabólicas asociadas. En las células eucariontes la oxidación aeróbica es llevada a cabo por las mitocondrias (etapas II-IV). En efecto, las mitocondrias son fábricas que generan ATP aprovechando al máximo este oxígeno abundante. Primero se describen sus estructuras y luego las reacciones que utilizan para degradar piruvato a fin de sintetizar ATP.

Las mitocondrias son orgánulos dinámicos con dos membranas estructural y funcionalmente diferentes

Las mitocondrias (Fig. 12-6) están entre los orgánulos más grandes de la célula. Una mitocondria es aproximadamente del tamaño de una bacteria de *E. coli*, lo cual no es sorprendente debido a que se cree que las bacterias fueron los precursores evolutivos de las mitocondrias (véase a continuación el análisis de la hipótesis endosimbiótica). La mayoría de las células eucariontes contienen muchas mitocondrias, que pueden ocupar en forma colectiva tanto como el 25% del volumen del citoplasma. Las cantidades de mitocondrias en una célula, de cientos a miles en las células animales, están reguladas con objeto de satisfacer los requerimientos de la célula para el ATP (p. ej., las células del estómago, que utilizan mucho ATP para la secreción de ácido, tienen muchas mitocondrias).

Los detalles de la estructura mitocondrial se pueden observar con microscopía electrónica (véase la Fig. 9-33). Cada mitocondria tiene dos membranas concéntricas distintas: la membrana interna y la externa. La membrana externa define el perímetro exterior liso de la mitocondria. La membrana interna se encuentra inmediatamente por debajo de la membrana externa y tiene numerosas invaginaciones, llamadas *crestas*, que se extienden a partir del perímetro de la membrana interna hacia el centro de la mitocondria. La curvatura de la membrana alta en los extremos de las crestas se puede deber a la presencia de una concentración elevada de dímeros de una proteína de membrana integral que sintetiza ATP (el complejo F_0F_1 , analizado en la Sección 12.3). Las membranas interna y externa definen topológicamente dos compartimientos submitocondriales: el *espacio intermembrana*, entre las membranas externa e interna y la *matriz*, o compartimiento central, que forma el lumen dentro de la membrana interna. Las crestas expanden en gran medida la superficie de la membrana mitocondrial interna e incrementan la capacidad para sintetizar ATP. En las mitocondrias hepáticas típicas, por ejemplo, la superficie de la membrana interna, incluyendo las crestas, es alrededor de cinco veces la de la membrana externa. En efecto, la superficie total de todas las membranas mitocondriales internas en el hígado es alrededor de 17 veces la de la membrana plasmática. Las mitocondrias en el corazón y los músculos esqueléticos contienen tres veces más crestas que las halladas en las mitocondrias

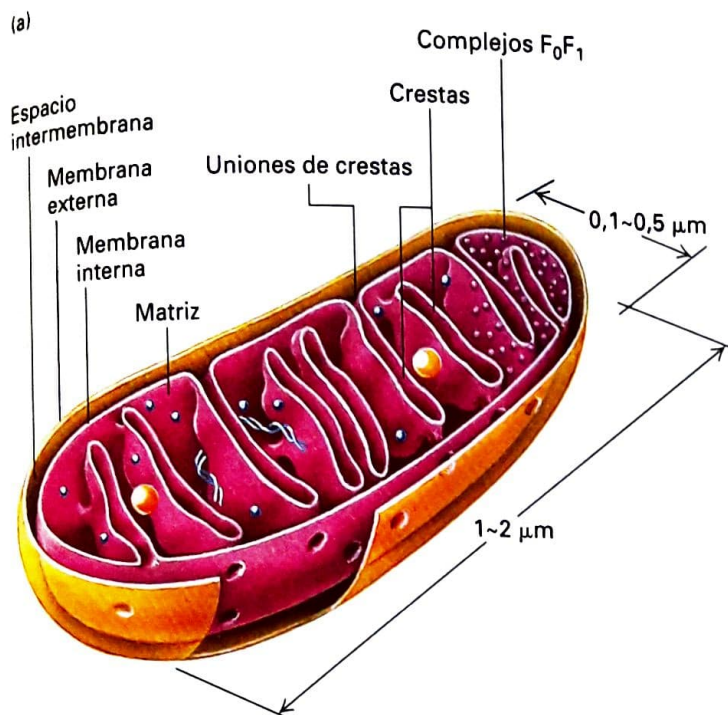
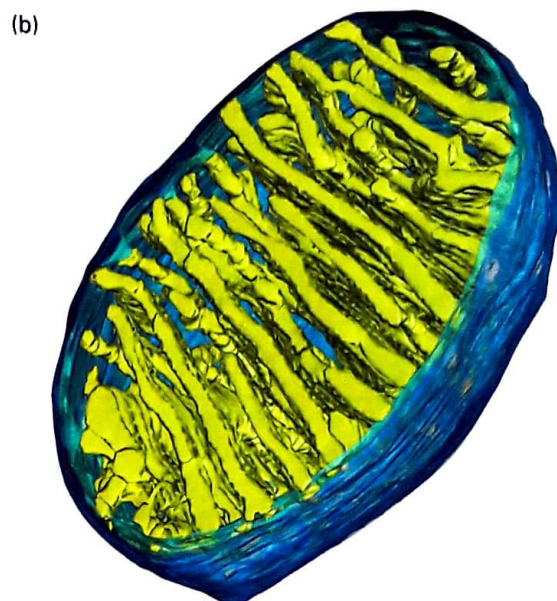


FIGURA 12-6 Estructura interna de una mitocondria. (a) Diagrama esquemático que muestra las principales membranas y compartimientos. La membrana externa lisa forma los límites exteriores de la mitocondria. La membrana interna es diferente de la externa y está altamente invaginada para formar láminas y túbulos llamados crestas. Las estructuras tubulares uniformes relativamente pequeñas que conectan las crestas a las porciones de la membrana interna que están yuxtapuestas a la membrana externa, se denominan **uniones de la cresta**. El espacio intermembrana se continúa con el lumen de cada cresta. Los complejos F_0F_1 (esferas pequeñas rojas), los cuales sintetizan ATP, son partículas intramembrana que sobresalen desde las crestas y la membrana interna hacia la matriz. La matriz contiene el DNA



mitocondrial (hebra azul), ribosomas (esferas pequeñas azules) y gránulos (esferas grandes amarillas). (b) Modelo generado por computadora de una sección de mitocondria de cerebro de pollo. Este modelo se basa en una imagen de microscopía electrónica tridimensional calculada a partir de una serie de dos microfotografías electrónicas bidimensionales, registradas a intervalos regulares. Esta técnica es análoga a la tomografía tridimensional de rayos x o al escaneo CAT utilizados en imágenes médicas. Nótese las crestas fuertemente empaquetadas (amarillo-verdoso), la membrana interna (celeste) y la membrana externa (azul). (Parte (b) cortesía de T. Frey y C. Mannella, 2000. *Trends Biochem. Sci* 25:319).

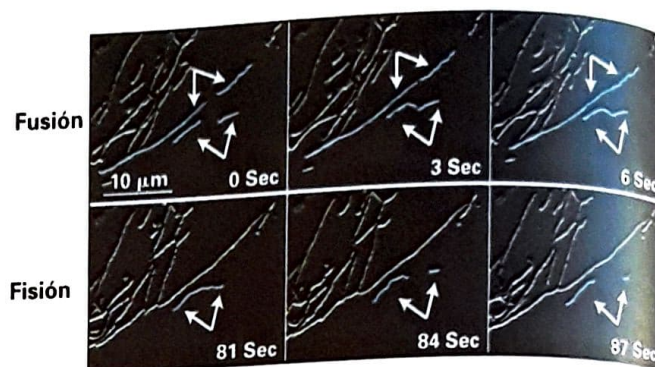
típicas hepáticas, lo que quizás refleja la mayor demanda de ATP por parte de las células musculares.

El análisis de las mitocondrias marcadas con fluorescencia en las células vivas ha demostrado que las mitocondrias son altamente dinámicas. Ellas sufren fusiones y fisiones frecuentes que generan redes tubulares, a veces ramificadas (Fig. 12-7), lo cual puede explicar la amplia variedad de morfologías mitocondriales vistas en tipos diferentes de células. Cuando las mitocondrias individuales se fusionan, cada una de las membranas se fusiona (la interna con la interna y la externa con la externa) y cada uno de los compartimientos distintivos se entremezclan (matriz con matriz, espacio intermembrana con espacio intermembrana). Las fusiones y las fisiones aparentemente cumplen un papel funcional, debido a que interrupciones genéticas en diversos genes de la superfamilia de las GTPasa que son necesarios para estos procesos dinámicos pueden interrumpir la función mitocondrial (como por ejemplo el mantenimiento del potencial eléctrico de la membrana interna adecuado) y causar enfermedades humanas. Un ejemplo es la enfermedad neuromuscular hereditaria de Charcot-Marie-Tooth sub-

tipo 2A, en la cual los defectos en la función nerviosa periférica llevan al debilitamiento periférico progresivo, principalmente de manos y pies. Los procesos de fusión y fisión en curso parecen proteger el DNA mitocondrial de las mutaciones acumulativas y pueden permitir el aislamiento de los segmentos dañados y disfuncionales de la mitocondria, que posiblemente están específicamente dirigidos a la destrucción en la célula mediante un proceso llamado autofagia (véase el Cap. 14).

El fraccionamiento y la purificación de las membranas y los compartimientos mitocondriales han tornado posible la determinación de su composición proteica, lipídica y del DNA, y han permitido la localización de las reacciones catalizadas por enzima en una membrana o compartimiento específico. Se requieren alrededor de 1 000 tipos diferentes de polipéptidos para constituir y mantener las mitocondrias, así como para permitirles que funcionen. Los análisis bioquímicos detallados han establecido que existen al menos 1 098 proteínas en las mitocondrias de mamífero y tal vez tantas como 1 500. Solo un número pequeño de estas (13 en los seres humanos) están codificadas por genes de DNA mitocondrial y se sintetizan en

FIGURA 12-7 Las mitocondrias sufren fusión y fisión rápida en las células vivas. Mitocondrias marcadas con una proteína fluorescente en un fibroblasto embrionario murino normal vivo fueron observadas usando microscopía de fluorescencia a intervalos. Diversas mitocondrias que sufren fusión (*arriba*) o fisión (*abajo*) son artificialmente resaltadas en azul y con flechas. (Modificado a partir de D. C. Chan, 2006, *Cell* 125[7]:1241-1252)



el interior del espacio de la matriz mitocondrial. El resto de las proteínas son codificadas por genes nucleares (Cap. 6), sintetizadas en el citosol y luego importadas al interior de las mitocondrias (Cap. 13). El funcionamiento defectuoso de las proteínas mitocondriales asociadas conduce a alrededor de 150 enfermedades humanas. Las más comunes de estas son las enfermedades de la cadena de transporte de electrones, que constituyen el resultado de mutaciones en cualquiera de uno de los 92 genes que codifican proteínas y presentan una variedad muy amplia de anomalías clínicas que afectan los músculos, el corazón, el sistema nervioso y el hígado, entre otros sistemas fisiológicos. Otras enfermedades asociadas a la mitocondria incluyen al síndrome de Miller, que resulta en múltiples malformaciones anatómicas y en defectos del tejido conectivo.

La proteína más abundante en la membrana externa es la **porina** mitocondrial, una proteína canal transmembrana similar en estructura a las porinas bacterianas (véase la Fig. 10-18). Los iones y la mayoría de las moléculas pequeñas (hasta 5 000 Da) pueden pasar rápidamente a través de estas proteínas canal cuando se abren. Aunque puede existir regulación metabólica de la apertura de las porinas mitocondriales y por ende del flujo de los metabolitos a través de la membrana, la membrana interna y sus crestas son las principales barreras de permeabilidad entre el citosol y la matriz mitocondrial, limitando la velocidad de oxidación mitocondrial y la generación de ATP.

Las proteínas constituyen el 76% de la masa total de la membrana mitocondrial interna, una fracción más alta que la de cualquier otra membrana celular. Muchas de estas proteínas son participantes fundamentales en la fosforilación oxidativa. Ellas incluyen la ATP sintasa, las proteínas responsables del transporte de electrones y una amplia variedad de proteínas de transporte que permiten el movimiento de metabolitos entre el citosol y la matriz mitocondrial. El genoma humano codifica 48 miembros de una familia de proteínas de transporte mitocondrial. Una de estas se denomina transportador de ADP/ATP, un antiportador que mueve los ATP recién sintetizados fuera de la matriz y hacia el interior del espacio intermembrana (y por ende al citosol) en intercambio con el ADP que se origina en el citosol. Sin este antiportador, la energía atrapada en los enlaces químicos en el ATP mitocondrial podría no estar disponible en el resto de la célula.

Nótese que las plantas tienen mitocondrias y también realizan oxidación aeróbica. En las plantas, los hidratos de carbono almace-

nados (principalmente en la forma de almidón) son hidrolizados a glucosa. La glucólisis luego produce piruvato que es transportado al interior de las mitocondrias, como en las células animales. La oxidación mitocondrial de piruvato y la formación concomitante de ATP se producen en las células fotosintéticas durante períodos de oscuridad cuando no es posible la fotosíntesis, así como en las raíces y otros tejidos no fotosintéticos en todo momento.

La membrana mitocondrial interna, las crestas y la matriz son los sitios de la mayoría de las reacciones que involucran la oxidación de piruvato y ácidos grasos a CO_2 y H_2O y la síntesis acoplada de ATP a partir de ADP y P_i , con cada reacción que se produce en una membrana discreta o espacio en la mitocondria (Fig. 12-8).

Siguiendo la descripción detallada de la oxidación de la glucosa y la generación de ATP, a continuación se explora lo que sucede con el piruvato generado durante la glucólisis (etapa I) después de que es transportado a la matriz mitocondrial. Las últimas tres de las cuatro etapas de la oxidación de la glucosa son:

- **Etapa II.** La etapa II se puede subdividir en dos partes diferentes: (1) la conversión de piruvato a acetil-CoA, seguida por la (2) oxidación del acetil-CoA a CO_2 en el ciclo del ácido cítrico. Estas oxidaciones están acopladas a la reducción de NAD^+ a NADH y de FAD a FADH_2 (la oxidación de ácido graso sigue una ruta similar, con la conversión del acetil-CoA graso a acetil-CoA). La mayoría de las reacciones se producen en (o sobre) la membrana del lado de la matriz.
- **Etapa III.** La transferencia de electrones desde el NADH y FADH_2 al O_2 a través de una cadena de transporte de electrones dentro de la membrana interna, lo cual genera una fuerza protón-motriz a través de la membrana.
- **Etapa IV.** Captura de la energía de la fuerza protón-motriz para la síntesis de ATP en la membrana mitocondrial interna. Las etapas III y IV se denominan colectivamente como fosforilación oxidativa.

En la primera parte de la etapa II, el piruvato es convertido a acetil-CoA y a electrones de alta energía

Dentro de la matriz mitocondrial, el piruvato reacciona con la coenzima A formando CO_2 , acetil-CoA y NADH (Fig. 12-8, Etapa II izquierda).

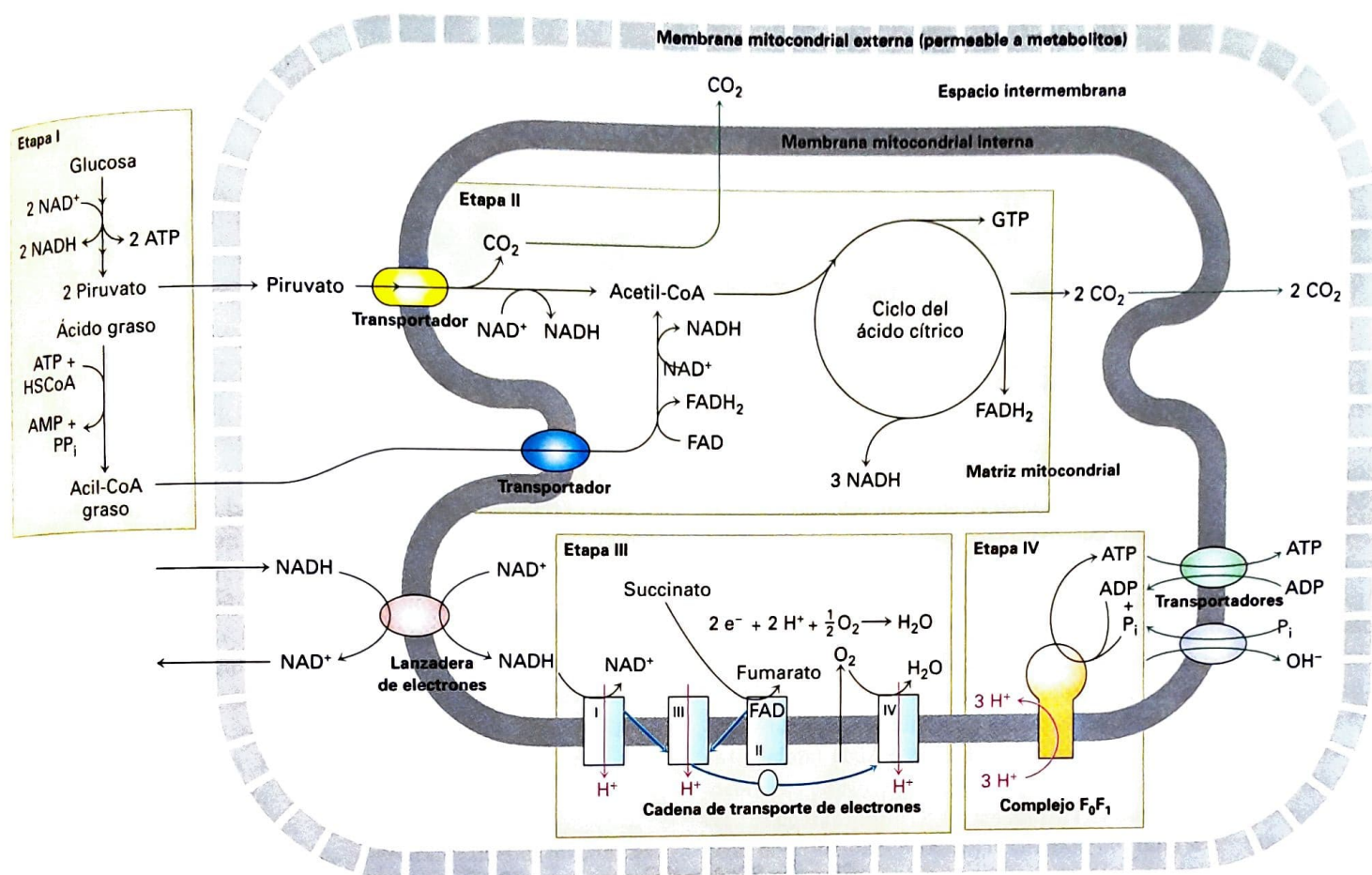


FIGURA 12-8 Resumen de la oxidación aeróbica de la glucosa y de los ácidos grasos. Etapa I: en el citosol, la glucosa es convertida a piruvato (glucólisis) y los ácidos grasos a acil-CoA graso. El piruvato y el acil-CoA graso luego se mueven al interior de la mitocondria. Las porinas mitocondriales hacen la membrana externa permeable a estos metabolitos, pero son necesarias las proteínas de transporte específicas (óvalos coloreados) en la membrana interna para importar piruvato (amarillo) y ácidos grasos (azul) a la matriz. Los grupos acilos grasos son transportados desde el acil-CoA graso a un transportador intermediario, transportados a través de la membrana interna (óvalos azules), y luego readheridos al CoA sobre el lado de la matriz. **Etapa II:** en la matriz mitocondrial, el piruvato y el acil-CoA graso son convertidos a acetil-CoA y luego oxidados, liberando CO_2 . El piruvato es convertido a acetil-CoA con la formación de NADH y CO_2 ; dos carbonos del acil-CoA graso son convertidos a acetil-CoA con la formación de FADH_2 y NADH . La oxidación de acetil-CoA en el ciclo del ácido cítrico genera NADH y FADH_2 , GTP y CO_2 . **Etapa III:** el transporte

de electrones reduce el oxígeno a agua y genera una fuerza protón-motriz. Los electrones (azul) de las coenzimas reducidas son transferidos via los complejos de transporte de electrones (recuadros azules) hasta el O_2 , concomitantemente con el transporte de iones H^+ (rojo) desde la matriz hasta el espacio intermembrana, generando la fuerza protón-motriz. Los electrones del NADH fluyen directamente desde el complejo I al complejo III, evitando el complejo II. Los electrones del FADH_2 fluyen directamente desde el complejo II hasta el complejo III, evitando el complejo I. **Etapa IV:** la ATP sintasa, el complejo F_0F_1 (anaranjado), aprovecha la fuerza protón-motriz para sintetizar ATP en la matriz. Las proteínas antiportadoras (óvalos púrpura y verde) transportan ADP y P_i a la matriz y exportan grupos hidroxilos y ATP. El NADH generado en el citosol no es transportado directamente hasta la matriz debido a que la membrana interna es impermeable al NAD^+ y NADH ; en su lugar, el sistema de lanzaderas (rojo) transporta los electrones desde el NADH citosólico hasta el NAD^+ en la matriz. El O_2 difunde hacia el interior de la matriz y el CO_2 se difunde hacia el exterior.

Esta reacción, catalizada por la *piruvato deshidrogenasa*, es altamente exérgica ($\Delta G^\circ = -8,0 \text{ kcal/mol}$) y esencialmente irreversible.

El **acetil-CoA** es una molécula que consiste en grupos acetilos de dos carbonos unidos covalentemente a una molécula más larga conocida como coenzima A (CoA) (Fig. 12-9). Cumple un papel central en la oxidación del piruvato, los ácidos grasos y los aminoácidos. Además, es un intermediario en numerosas reacciones fotosintéticas, incluyendo la transferencia de un grupo acetilo a proteínas histonas y muchas proteínas de mamífero, así como la síntesis de lípidos como el colesterol. Sin embargo, en la respiración mitocondrial, el grupo acetilo de dos carbonos del acetil-CoA casi siempre es oxidado a CO_2

a través del ciclo del ácido cítrico. Nótese que los dos carbonos en el grupo acetilo provienen del piruvato; el tercer carbono es liberado como dióxido de carbono.

En la segunda parte de la etapa II, el ciclo del ácido cítrico oxida el grupo acetilo en el acetil-CoA a CO_2 y genera electrones de alta energía

Nueve reacciones secuenciales funcionan en un ciclo para oxidar el grupo acetilo del acetil-CoA a CO_2 (Fig. 12-8, etapa II derecha). El

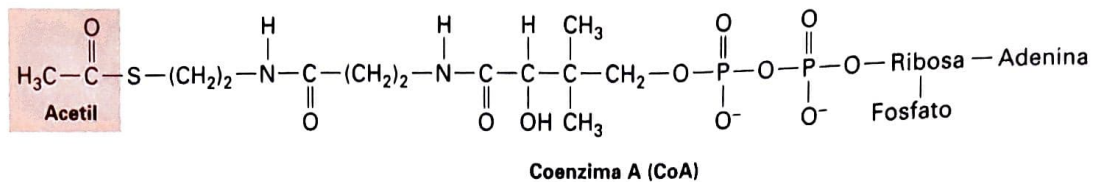


FIGURA 12-9 La estructura del acetil-CoA. Este compuesto, que consiste en un grupo acetilo unido covalentemente a una coenzima A (CoA), es un intermediario importante en la oxidación aeróbica del piruvato, de los ácidos

grasos y de muchos otros aminoácidos. También contribuye a los grupos acetilos en muchas vías biosintéticas.

ciclo es conocido con diversos nombres: **ciclo del ácido cítrico**, ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y ciclo de Krebs. El resultado neto es que para cada acetilo que entra al ciclo como acetil-CoA se producen dos moléculas de CO_2 , tres de NADH , una de FADH_2 y una de GTP . El NADH y el FADH_2 son transportadores de electrones de alta energía que cumplirán una función importante en la etapa III de la oxidación mitocondrial: el transporte de electrones.

Como se muestra en la Fig. 12-10, el ciclo comienza con la condensación de dos grupos acetilos de dos carbonos del acetil-CoA con la molécula de *oxalacetato* de cuatro carbonos, para dar el *ácido cítrico* de seis carbonos (por ende el nombre ciclo del ácido cítrico). En ambas reacciones 4 y 5, se libera una molécula de CO_2 y el NAD^+ es reducido a NADH . La reducción de NAD^+ a NADH también se

produce durante la reacción 9; por lo tanto, se generan tres NADH por vuelta del ciclo. En la reacción 7, los dos electrones y los dos protones son transferidos al FAD produciendo la forma reducida de esta coenzima, FADH_2 . La reacción 7 es distintiva debido a que no solo es una parte intrínseca del ciclo del ácido cítrico (etapa II), sino que también está catalizada por una enzima unida a la membrana que, como se verá, también cumple un papel importante en la etapa III. En la reacción 6, la hidrólisis del enlace tioéster de alta energía en el succinil-CoA está acoplado a la síntesis de un GTP por la fosforilación al nivel de sustrato. Como el GTP y el ATP son interconvertibles,

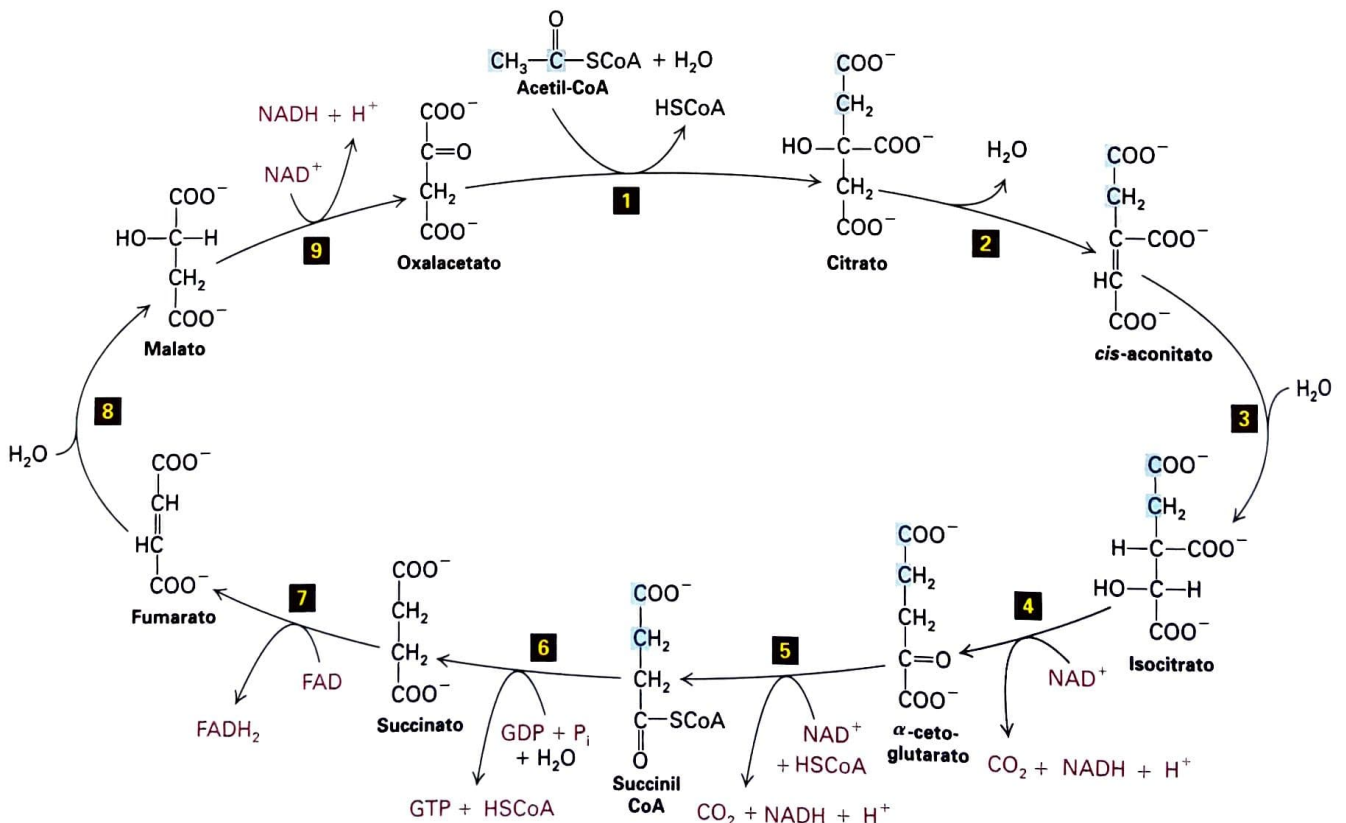
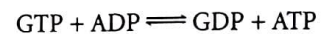


FIGURA 12-10 El ciclo del ácido cítrico. El acetil-CoA es metabolizado a CO_2 y los transportadores de electrones de alta energía NADH y FADH_2 . En la reacción 1, un residuo de acetilo de dos carbonos a partir del acetil-CoA se condensa con la molécula de cuatro carbonos oxalacetato para formar el citrato de seis carbonos. En las reacciones restantes (2-9), cada molécula de citrato es eventualmente convertida de nuevo a oxalacetato, perdiendo dos moléculas de CO_2 en el proceso. En cada vuelta del ciclo, se eliminan cuatro pares de electrones a partir de átomos de carbono, formando tres moléculas

de NADH , una molécula de FADH_2 y una molécula de GTP . Los dos átomos de carbono que entran al ciclo con acetil-CoA se resaltan en azul a través del succinil CoA. En el succinato y el fumarato, que son moléculas simétricas, ya no se pueden destacar más en forma específica. Estudios de marcación con isótopos demostraron que estos átomos de carbono no se pierden en la vuelta del ciclo en la cual entran; en promedio, uno se perderá como CO_2 durante la siguiente vuelta del ciclo y el otro en vueltas subsiguientes.

Cuadro 12-1 Resultado neto de la vía glucolítica y del ciclo del ácido cítrico

Reacción	Moléculas de CO ₂ producidas	Moléculas de NAD ⁺ reducida a NADH	Moléculas de FAD reducidas a FADH ₂	ATP (o GTP)
1 molécula de glucosa a 2 moléculas de piruvato	0	2	0	2
2 piruvato a 2 moléculas de acetil-CoA	2	2	0	0
2 acetil-CoA a 4 moléculas de CO ₂	4	6	2	2
Total	6	10	2	4

Esto puede ser considerado un paso de generación de ATP. La reacción 9 regenera el oxalacetato, de manera tal que el ciclo puede comenzar de nuevo. Nótese que el O₂ molecular no participa en el ciclo del ácido cítrico.

La mayoría de las enzimas y moléculas pequeñas involucradas en el ciclo del ácido cítrico son solubles en la matriz mitocondrial acuosa. Estas incluyen a CoA, acetil-CoA, succinil-CoA, NAD⁺ y NADH, así como a la mayoría de las ocho enzimas del ciclo. La *succinato deshidrogenasa* (reacción 7), sin embargo, es un componente de una proteína integral de membrana en la membrana interna, con su sitio activo del lado de la matriz. Cuando las mitocondrias son disgregadas mediante vibración ultrasónica suave o por lisis osmótica, se liberan enzimas no unidas a la membrana en el ciclo del ácido cítrico en forma de complejos multiproteicos grandes. Se cree que, dentro de tales complejos, el producto de reacción de una enzima pasa directamente a la siguiente enzima sin difundirse a través de la solución. Se necesitó mucho trabajo para determinar las estructuras de estos grandes complejos enzimáticos tal como existen en la célula.

Debido a que la glucólisis de una molécula de glucosa genera dos moléculas de acetil-CoA, las reacciones en la vía glucolítica y del ciclo del ácido cítrico producen seis moléculas de CO₂, 10 de NADH y dos de FADH₂ por molécula de glucosa (Cuadro 12-1). Aunque estas reacciones también generan cuatro enlaces fosfoanhídridos de alta energía en la forma de dos moléculas de ATP y dos de GTP, esto representa solo una pequeña fracción de la energía disponible liberada en la oxidación aeróbica completa de la glucosa. La energía remanente es almacenada en los electrones de alta energía en las coenzimas reducidas NADH y FADH₂, que pueden visualizarse como los “transportadores de electrones”. El objetivo de las etapas III y IV es el de recuperar esta energía en la forma de ATP.

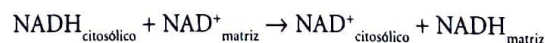
Los transportadores en la membrana mitocondrial interna ayudan a mantener las concentraciones citosólicas y de la matriz adecuadas de NAD⁺ y NADH

En el citosol, el NAD⁺ se requiere para el paso 6 de la glucólisis (véase la Fig. 12-3) y en la matriz mitocondrial el NAD⁺ es necesario para la conversión de piruvato a acetil-CoA y para tres pasos en el ciclo del ácido cítrico (4, 5 y 9 en la Fig. 12-10). En cada caso, el NADH es un producto de la reacción. Si la glucólisis y la oxidación del piruvato continúan, el NAD⁺ debe ser regenerado mediante oxidación del NADH (similarmente, el FADH₂ generado en las reacciones de la

etapa II debe ser reoxidado a FAD si las reacciones dependientes de FAD continúan). Como se verá en la siguiente sección, la cadena de transporte de electrones *dentro* de la membrana mitocondrial interna convierte el NADH a NAD⁺ y el FADH₂ a FAD, a medida que se reduce el O₂ a agua y se convierte la energía almacenada en los electrones de alta energía en las formas reducidas de estas moléculas en una fuerza protón-motriz (etapa III). Incluso si el O₂ no está involucrado en ninguna reacción del ciclo del ácido cítrico, en ausencia de O₂ este ciclo pronto deja de funcionar en tanto que el suministro intramitocondrial de NAD⁺ y FAD disminuye debido a la incapacidad de la cadena de transporte de electrones para oxidar el NADH y el FADH₂. Estas observaciones plantean la cuestión de cómo se regenera un suministro de NAD⁺ en el citosol.

Si el NADH del citosol pudiera moverse a la matriz mitocondrial y ser oxidado por la cadena de transporte de electrones y si el producto NAD⁺ pudiera transportarse de regreso al citosol, la regeneración del NAD⁺ citosólico sería simple. Sin embargo, la membrana mitocondrial interna es impermeable al NADH. Para resolver este problema y permitir que los electrones del NADH citosólico sean transferidos *indirectamente* al O₂ a través de la cadena mitocondrial de transporte de electrones, las células utilizan diversas *lanzaderas de electrones* para transferir los electrones desde el NADH citosólico hasta el NAD⁺ en la matriz. En la Figura 12-11 se describe el funcionamiento de la lanzadera más ampliamente difundida, la *lanzadera malato-aspartato*.

Por cada “vuelta” completa del ciclo no existe un cambio global del número de moléculas de NADH y NAD⁺ o de los intermediarios malato o aspartato usados por la lanzadera. Sin embargo, en el citosol, el NADH es oxidado a NAD⁺ que puede usarse para la glucólisis y en la matriz el NAD⁺ es reducido a NADH, que puede ser utilizado para el transporte de electrones:



La oxidación mitocondrial de los ácidos grasos genera ATP

Hasta el momento, nos hemos centrado principalmente en la oxidación de los hidratos de carbono, es decir glucosa, para la generación de ATP. Los ácidos grasos son otra fuente importante de energía celular. Las células pueden incorporar glucosa o ácidos grasos desde el espacio extracelular con la ayuda de proteínas de transporte específicas (Cap. 11). Si una célula no necesita quemar de inmediato estas moléculas,

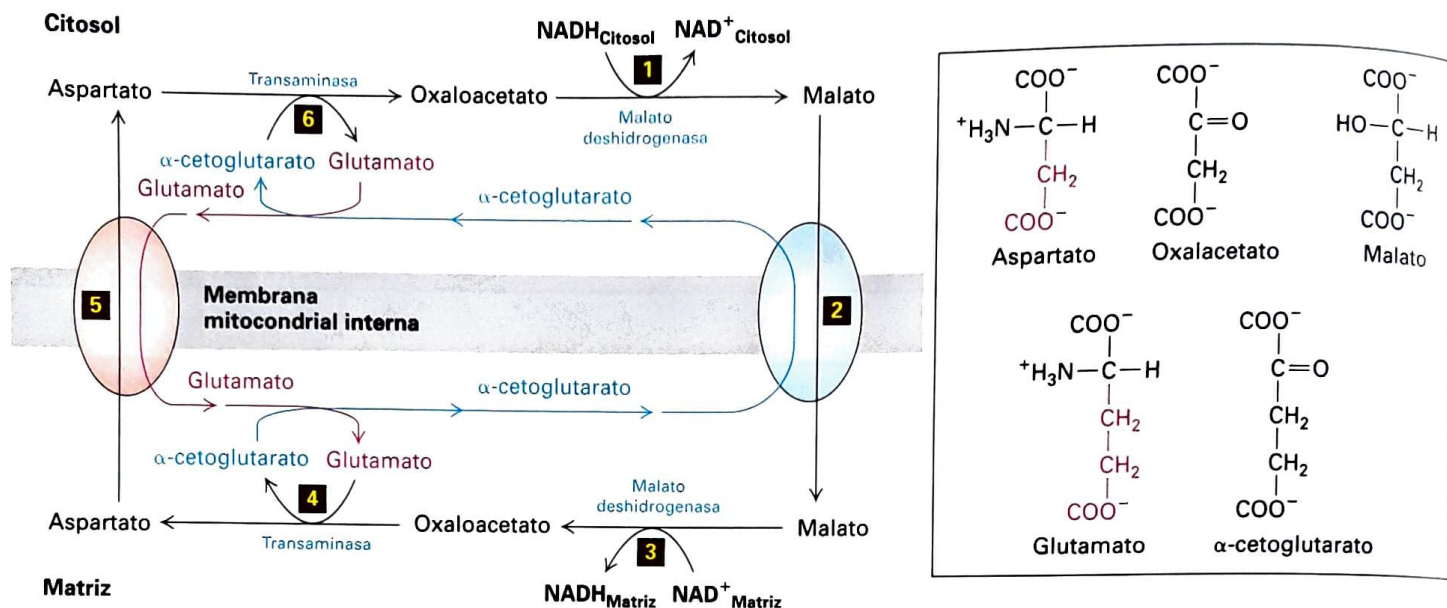
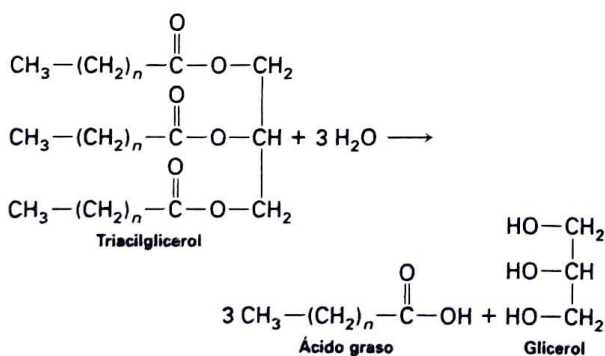


FIGURA 12-11 La lanzadera malato-aspartato. Esta serie cíclica de reacciones transfieren electrones desde el NADH en el citosol (espacio intermembrana) a través de la membrana, que es impermeable al NADH en sí mismo, hasta el NAD^+ en la matriz. El resultado neto es el reemplazo del NADH citosólico con NAD^+ y NAD^+ de matriz con NADH. Paso 1: la malato deshidrogenasa citosólica transfiere electrones desde el NADH hasta el oxalacetato, formando malato. Paso 2: un antiportador (óvalo azul) en la membrana mitocondrial interna transporta malato hacia el interior de la matriz en intercambio por α -cetoglutarato. Paso 3: la malato deshidrogenasa mitocondrial convierte el malato nuevamente a oxalacetato, reduciendo NAD^+ en la matriz a NADH en el proceso. Paso 4: el oxalacetato, que no

puede cruzar directamente la membrana interna, es convertido a aspartato por adición de un grupo amino a partir de glutamato. En esta reacción catalizada por transaminasa en la matriz, el glutamato es convertido a α -cetoglutarato. Paso 5: un segundo antiportador (óvalo rojo) exporta aspartato hasta el citosol en intercambio por glutamato. Paso 6: Una transaminasa citosólica convierte el aspartato α -oxalacetato y α -cetoglutarato a glutamato, completando el ciclo. Las flechas azules reflejan el movimiento del α -cetoglutarato, las flechas rojas el movimiento del glutamato y las flechas negras las del aspartato/malato. Es notable que, así como el ciclo del aspartato y malato se establece en el sentido de las agujas del reloj, el ciclo del glutamato y el α -cetoglutarato lo hace en la dirección opuesta.

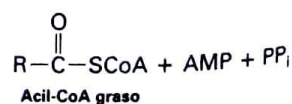
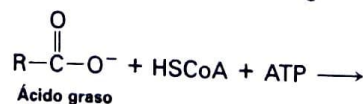
puede almacenarlas como un polímero de glucosa llamado glucógeno (en especial en los músculos y el hígado) o como un trimero de ácidos grasos unidos covalentemente al glicerol, llamado **triacilglicerol** o **triglicérido**. En algunas células, el exceso de glucosa es convertido a ácidos grasos y luego a triacilglicerol para almacenamiento. Sin embargo, a diferencia de los microorganismos, los animales son incapaces de convertir ácidos grasos a glucosa. Cuando las células necesitan quemar estas energías almacenadas para sintetizar ATP (p. ej., cuando un músculo en reposo comienza a realizar trabajo y necesita quemar glucosa o ácidos grasos como combustible), las enzimas degradan el glucógeno a glucosa o hidrolizan los triacilglicerol a ácidos grasos, que luego son oxidados para generar ATP:



Los ácidos grasos son la principal fuente de energía para algunos tejidos, en particular para el músculo cardíaco adulto. En los seres

humanos, en efecto, se genera más ATP por oxidación de grasas que por la oxidación de glucosa. La oxidación de 1 g de triacilglicerol a CO_2 genera alrededor de seis veces más ATP que la oxidación de 1 g de glucógeno hidratado. Así, los triglicéridos son más eficientes que los hidratos de carbono para almacenar energía, en parte debido a que son almacenados en forma de anhídridos y pueden producir más energía cuando son oxidados en parte debido a que intrínsecamente están más reducidos (tienen menos hidrógenos) que los hidratos de carbono. En los mamíferos, el sitio primario de almacenamiento de los triglicéridos es el tejido graso (adiposo), mientras que los sitios primarios para el almacenamiento de glucógeno son los músculos y el hígado.

Así como hay cuatro etapas en la oxidación de la glucosa, existen cuatro etapas en la oxidación de los ácidos grasos. Para optimizar la eficacia de la generación de ATP, parte de la etapa II (oxidación de acetil-CoA del ciclo del ácido cítrico) y las etapas III y IV completas de la oxidación de ácidos grasos son idénticas a las de la oxidación de la glucosa. Las diferencias se encuentran en la etapa I citosólica y en la primera parte de la etapa II mitocondrial. En la etapa I, los ácidos grasos son convertidos a un acil-CoA graso en el citosol en una reacción acoplada a la hidrólisis de ATP a AMP y PP_i (pirofosfato inorgánico) (véase la Fig. 12-8):



La posterior hidrólisis de PP_i a dos moléculas de P_i libera energía que conduce esta reacción hasta completarse. Para transferir el grupo acilo graso a la matriz mitocondrial, es transferido covalentemente a una molécula denominada carnitina y se mueve a través de la membrana mitocondrial interna mediante una proteína transportadora de acilcarnitina (véase la Fig. 12-8, óvalo azul); luego, sobre el otro lado de la matriz, el grupo acilo graso es liberado de la carnitina y se vuelve a adherir a otra molécula de CoA. La actividad del transportador de acilcarnitina está regulada para evitar la oxidación de ácidos grasos cuando las células tienen suministros adecuados de energía (ATP).

En la primera parte de la etapa II, cada molécula de un acil-CoA graso en la mitocondria es oxidada en una secuencia cíclica de cuatro reacciones, en las cuales todos los átomos de carbono son convertidos a dos por vez a acetil-CoA con la generación de $FADH_2$ y $NADH$ (Fig. 12-12a). Por ejemplo, la oxidación mitocondrial de cada molécula de 18 carbonos del ácido esteárico, $CH_3(CH_2)_{16}COOH$, produce nueve moléculas de acetil-CoA y ocho moléculas de cada una de $NADH$ y de $FADH_2$. En la segunda parte de la etapa II, como con el acetil-CoA generado a partir de piruvato, estos grupos acetilos entran al ciclo del ácido cítrico y son oxidados a CO_2 . Como se describirá en detalle en la

siguiente sección, el $NADH$ y el $FADH_2$ reducidos con sus electrones de alta energía serán utilizados en la etapa III para generar una fuerza protón-motriz que a su vez es utilizada en la etapa IV para impulsar la síntesis de ATP.

La oxidación peroxisómica de los ácidos grasos no genera ATP

La oxidación mitocondrial de los ácidos grasos es la principal fuente de ATP en las células hepáticas de mamíferos y los bioquímicos alguna vez creyeron que esto era cierto para todos los tipos de células. Sin embargo, se encontró que las ratas tratadas con clofibrato, un fármaco que afecta muchas características del metabolismo de lípidos, presentaban una velocidad incrementada de oxidación de ácidos grasos y un aumento en el número de peroxisomas en las células hepáticas. Este hallazgo sugiere que los peroxisomas, así como las mitocondrias, pueden oxidar ácidos grasos. Estos pequeños orgánulos ($\sim 0,2-1$ mm de diámetro) están recubiertos por una única membrana (véase la Fig. 9-32). Los mismos están presentes en todas las células de mamífero excepto en los

(a) OXIDACIÓN MITOCONDRIAL

(b) OXIDACIÓN PEROXISÓMICA

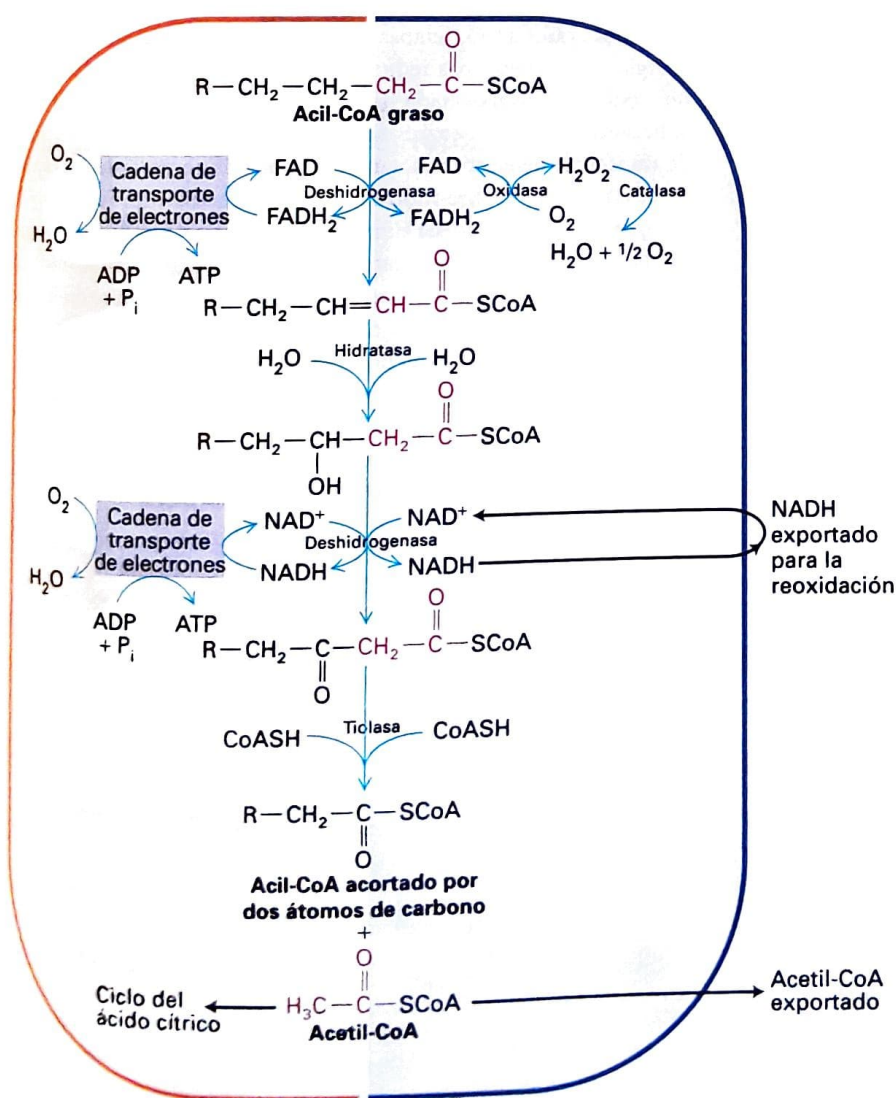


FIGURA 12-12 Oxidación de los ácidos grasos en las mitocondrias y los peroxisomas. Tanto en la oxidación mitocondrial (a) como en la oxidación peroxisómica (b), los ácidos grasos son convertidos a acetil-CoA por una serie de cuatro reacciones catalizadas por enzimas (mostradas abajo en el centro de la figura). Una molécula de acil-CoA graso es convertida a acetil-CoA y un acil-CoA graso acortado por dos átomos de carbono. Concomitantemente, una molécula de FAD es reducida a $FADH_2$ y una molécula de NAD^+ es reducida a $NADH$. El ciclo se repite sobre los acil-CoA acortados hasta que los ácidos grasos con un número par de átomos de carbono son completamente convertidos a acetil-CoA. En las mitocondrias, los electrones del $FADH_2$ y el $NADH$ entran a la cadena de transporte de electrones y en última instancia son utilizados para generar ATP; el acetil-CoA generado es oxidado en el ciclo del ácido cítrico, dando como resultado la liberación de CO_2 y finalmente la síntesis de ATP adicional. Debido a que los peroxisomas carecen de los complejos transportadores de electrones y de las enzimas del ciclo del ácido cítrico, la oxidación de ácidos grasos en estos orgánulos no produce ATP.

(Adaptado de D. L. Nelson y M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, 3d ed., 2000, Worth Publishers).

eritrocitos y también se encuentran en las células vegetales, levaduras y probablemente la mayoría de otras células eucariontes.

Las mitocondrias oxidan preferentemente cadenas cortas (menos de 8 carbonos en la cadena de acilo graso, o $< C_8$), cadenas medianas (C_8 - C_{12}) y cadenas largas (C_{14} - C_{20}) de ácidos grasos, mientras que los peroxisomas oxidan preferentemente ácidos grasos de cadena muy larga (VLCFA, $> C_{20}$), que no pueden ser oxidados por las mitocondrias. La mayoría de los ácidos grasos dietarios tienen cadenas largas, lo cual significa que en su mayoría son oxidados en las mitocondrias. Al contrario de la oxidación mitocondrial de los ácidos grasos, que está acoplada a la generación de ATP, la oxidación peroxisómica de los ácidos grasos no está conectada a la formación de ATP y la energía se libera como calor.

La vía de reacción por la cual los ácidos grasos son degradados a acetil-CoA en los peroxisomas es similar a la utilizada en las mitocondrias (Fig. 12-12b). No obstante, los peroxisomas carecen de una cadena de transporte de electrones y los electrones del $FADH_2$ producidos durante la oxidación de los ácidos grasos son inmediatamente transferidos al O_2 por las *oxidodasas*, regenerando FAD y formando peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Además de oxidodasas, los peroxisomas contienen *catalasa*, que rápidamente descompone el H_2O_2 a metabolito altamente citotóxico. El NADH producido durante la oxidación de los ácidos grasos es exportado y reoxidado en el citosol; aquí no existe la necesidad de una lanzadera malato-aspartato. Los peroxisomas también carecen de un ciclo del ácido cítrico, por ende el acetil-CoA generado durante la degradación peroxisómica de los ácidos grasos no puede ser oxidado aún más; en cambio es transportado al citosol para ser utilizado en la síntesis de colesterol (Cap. 10) y otros metabolitos.

CONCEPTOS CLAVES de la Sección 12.2

Mitocondrias y ciclo del ácido cítrico

- La mitocondria tiene dos membranas diferentes (externa e interna) y dos compartimientos distintos (espacio intermembrana entre las dos membranas y matriz rodeada por la membrana interna). La oxidación aeróbica se produce en la matriz mitocondrial y sobre la membrana mitocondrial interna (véase la Fig. 12-6).
- En la etapa II de la oxidación de la glucosa, la molécula de piruvato de tres carbonos es primero oxidada para generar una molécula de cada una de CO_2 , NADH y acetil-CoA. El grupo acetilo del acetil-CoA luego es oxidado a CO_2 por el ciclo del ácido cítrico (véase la Fig. 12-8).
- En cada vuelta del ciclo del ácido cítrico se liberan dos moléculas de CO_2 y se generan tres moléculas de NADH, una de $FADH_2$ y una de GTP (véase la Fig. 12-10).
- La mayoría de la energía liberada en las etapas I y II de la oxidación de la glucosa es almacenada temporalmente en las coenzimas reducidas NADH o $FADH_2$, que llevan electrones de alta energía que posteriormente conducirán la cadena de transporte de electrones (etapa III).
- Ni la glucólisis ni el ciclo del ácido cítrico utilizan directamente oxígeno molecular (O_2).
- La lanzadera malato-aspartato regenera el suministro de NAD^+ citosólico necesario para la glucólisis continuada (véase la Fig. 12-11).

• Al igual que la oxidación de la glucosa, la oxidación de los ácidos grasos se produce en cuatro etapas. En la etapa I, los ácidos grasos son convertidos a acil-CoA graso en el citosol. En la etapa II, el acil-CoA graso es primero convertido a múltiples moléculas de acetil-CoA con generación de NADH y $FADH_2$. Luego, al igual que en la oxidación de la glucosa, el acetil-CoA entra en el ciclo del ácido cítrico. Las etapas III y IV son idénticas para la oxidación de los ácidos grasos y la glucosa (véase la Fig. 12-8).

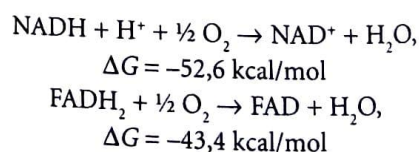
• En la mayoría de las células eucariontes, la oxidación de los ácidos grasos de cadena corta a larga ocurre en las mitocondrias con producción de ATP, mientras que la oxidación de los ácidos grasos de cadena muy larga se produce principalmente en los peroxisomas y no está conectada a la producción de ATP (véase la Fig. 12-12); la energía liberada durante la oxidación peroxisómica de los ácidos grasos es convertida a calor.

12.3 Cadena de transporte de electrones y generación de la fuerza protón-motriz

La mayoría de la energía liberada durante la oxidación de la glucosa y los ácidos grasos a CO_2 (etapas I y II) es convertida a electrones de alta energía en las coenzimas reducidas NADH y $FADH_2$. A continuación nos centraremos en la etapa III, en la cual la energía transitoriamente almacenada en estas coenzimas reducidas es convertida por una cadena de transporte de electrones, también conocida como **cadena respiratoria**, a la fuerza protón-motriz. Primero describiremos la lógica y los componentes de la cadena de transporte de electrones. Luego seguiremos el recorrido de los electrones a medida que fluyen a través de la membrana mitocondrial interna. Finalizaremos esta sección con un análisis de la magnitud de la fuerza protón-motriz producida por el transporte de electrones y el bombeo de protones. En la Sección 12-4 se verá como la fuerza protón-motriz es utilizada para sintetizar ATP.

La oxidación del NADH y el $FADH_2$ libera una cantidad significativa de energía

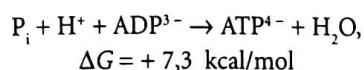
Durante el transporte de electrones, los mismos son liberados desde el NADH y el $FADH_2$ y eventualmente transferidos al O_2 , formando H_2O de acuerdo con las siguientes reacciones globales:



Recuérdese que la conversión de 1 g de molécula de glucosa a CO_2 a través de la vía glucolítica y del ciclo del ácido cítrico produce 10 moléculas de NADH y 2 $FADH_2$ (véase el Cuadro 12-1). La oxidación de estas coenzimas reducidas tiene un ΔG° de -613 kcal/mol [$10(-52,6) + 2(-43,4)$]. Así, del potencial de energía libre presente en los enlaces químicos de la glucosa (-686 kcal/mol), alrededor del 90% se conserva en

las coenzimas reducidas. ¿Por qué debe haber dos coenzimas diferentes, NADH y FADH₂? Aunque muchas de las reacciones involucradas en la oxidación de la glucosa y los ácidos cítricos son suficientemente energéticas como para reducir NAD⁺, otras no lo son, por ende estas reacciones están acopladas a la reducción del FAD, que requiere menos energía.

La energía transportada en las coenzimas reducidas puede ser liberada por oxidación de las mismas. El desafío bioquímico enfrentado por la mitocondria es el de transferir, tan eficazmente como sea posible, la energía liberada por esta oxidación en la energía en el enlace fosfoanhídrido terminal en el ATP.



Una sencilla reacción de uno a uno que involucra la reducción de una molécula de coenzima y la síntesis de un ATP podría ser excesivamente ineficiente, debido a que el ΔG° para la generación del ATP a partir de ADP y P_i es sustancialmente menor que para la oxidación de la coenzima y se perdería mucha energía como calor. Para recuperar eficazmente la energía, las mitocondrias convierten la energía de la oxidación de la coenzima en una fuerza protón-motriz usando una serie de transportadores de electrones, de los cuales todos excepto uno son componentes integrales de la membrana interna (véase la Fig. 12-8). La fuerza protón-motriz puede ser utilizada para generar eficientemente ATP.

El transporte de electrones en las mitocondrias está acoplado al bombeo de protones

Durante el transporte de electrones del NADH y el FADH₂ al O₂, los protones de la matriz mitocondrial son bombeados a través de la membrana interna. Este bombeo eleva el pH de la matriz mitocondrial relativo al del espacio intermembrana y el citosol y también

torna más negativa a la matriz con respecto al espacio intermembrana. En otras palabras, la energía libre liberada durante la oxidación del NADH o del FADH₂ es almacenada tanto como un gradiente de concentración de protones y como un gradiente eléctrico a través de la membrana: colectivamente, la fuerza protón-motriz (véase la Fig. 12-2). Como se verá en la Sección 12.4, el movimiento de protones de regreso a través de la membrana interna, conducido por esta fuerza, está acoplado a la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i mediante la ATP sintasa (etapa IV).

La síntesis de ATP a partir de ADP y P_i, conducida por la energía liberada por la transferencia de electrones a partir de NADH o FADH₂ al O₂, es la principal fuente de ATP en las células no fotosintéticas aerobias. Mucha evidencia demuestra que en las mitocondrias y bacterias este proceso de *fosforilación oxidativa* depende de la generación de una fuerza protón-motriz a través de la membrana interna (mitocondria) o de la membrana plasmática bacteriana, con transporte de electrones, bombeo de protones y formación de ATP. En el laboratorio, por ejemplo, la adición de O₂ y un sustrato oxidable como piruvato o succinato a las mitocondrias aisladas intactas da como resultado una síntesis neta de ATP si la membrana mitocondrial interna está intacta. En presencia de cantidades diminutas de detergentes que debilitan la membrana, aún se produce el transporte de electrones y la oxidación de estos metabolitos por el O₂. Sin embargo en estas condiciones no se sintetiza ATP, debido a que la fuga de protones evita el mantenimiento de la fuerza protón-motriz.

El acoplamiento entre el transporte de electrones del NADH (o FADH₂) al O₂ y el transporte de electrones a través de la membrana mitocondrial interna se puede demostrar experimentalmente con mitocondrias intactas, aisladas (Fig. 12-13). Tan pronto como se añade el O₂ a una suspensión de mitocondrias en una solución libre de O₂ que contiene NADH, el medio por afuera de las mitocondrias se torna de forma transitoria más ácido (concentración de protones aumentada), debido a que la membrana mitocondrial externa es libremente permeable a los protones (recuérdese que la lanzadera malato-aspar-

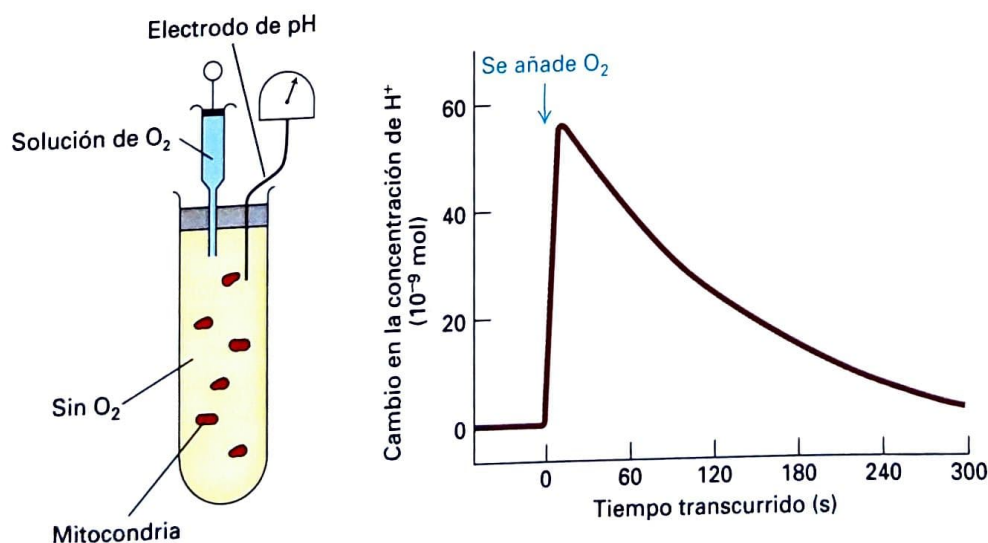


FIGURA EXPERIMENTAL 12-13 La transferencia electrónica del NADH al O₂ está acoplada al transporte de electrones a través de la membrana mitocondrial. Si se añade NADH a una suspensión de mitocondrias sin O₂, no se oxida NADH. Cuando se añade una pequeña cantidad de O₂ al sistema (flecha), existe una elevación pronunciada en la concentración de protones

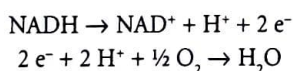
en el medio circundante fuera de la mitocondria (disminuye el pH). Así, la oxidación de NADH por el O₂ está acoplada al movimiento de protones fuera de la matriz. Una vez que el O₂ se agota, el exceso de protones lentamente retorna nuevamente a las mitocondrias (impulsados por la síntesis de ATP) y el pH del medio extracelular retorna a su valor inicial.

tato y otras pueden convertir el NADH en la solución en NADH en la matriz). Una vez que el O_2 se ha agotado, el exceso de protones en el medio reingresa lentamente a la matriz. Del análisis del cambio de pH medido en tales experimentos se puede calcular que alrededor de 10 protones son transportados desde el NADH al O_2 .

Para obtener números para el $FADH_2$, el experimento anterior se puede repetir usando succinato en lugar de NADH como sustrato (recuérdese que la oxidación de succinato a fumarato en el ciclo del ácido cítrico genera $FADH_2$; véase la Fig. 12-10). La cantidad de succinato añadido se puede ajustar de manera tal que la cantidad de $FADH_2$ generada es equivalente a la cantidad de NADH en el primer experimento. Como en el primer experimento, la adición de oxígeno causa que el medio por fuera de las mitocondrias se torne ácido, pero menos que con el NADH. Esto no es sorprendente debido a que los electrones en el $FADH_2$ tienen menos energía potencial (43,4 kcal/mol) que los electrones en el NADH (52,6 kcal/mol) y así produce la translocación de menos protones desde la matriz y un menor cambio de pH.

Los electrones fluyen “cuesta abajo” a través de una serie de transportadores de electrones

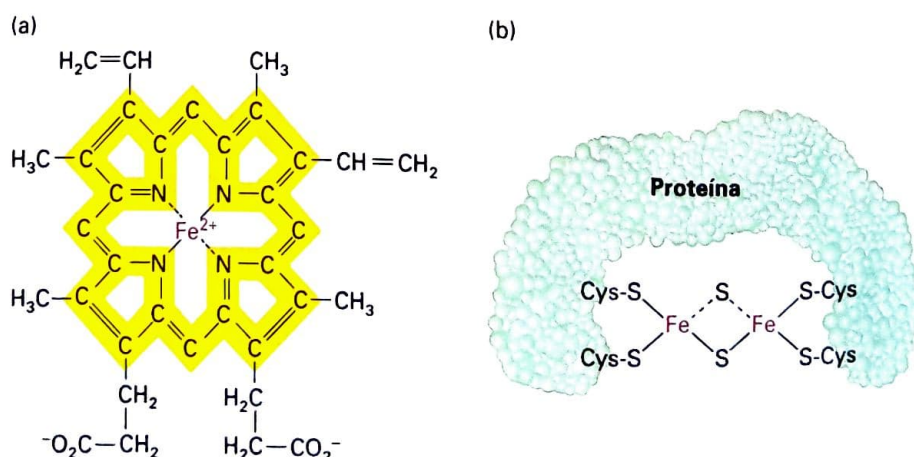
Ahora analizaremos más de cerca el movimiento energéticamente favorecido de los electrones desde el NADH y el $FADH_2$ hasta el aceptor final de electrones, el O_2 . Para simplicidad, se analizará sobre la base del NADH. En respiración mitocondrial, cada molécula de NADH libera dos electrones a la cadena de transporte de electrones; estos electrones reducen en última instancia un átomo de oxígeno (la mitad de una molécula de O_2), formando una molécula de agua:



A medida que los electrones se mueven desde el NADH hasta el O_2 , sus potenciales eléctricos disminuyen en 1,14 V, lo cual corresponde a 26,2 kcal/mol de electrones transferidos o ~ 53 kcal/mol por un par de electrones. Como se mencionó anteriormente, mucha de esta energía se conserva como fuerza protón-motriz generada a través de la membrana mitocondrial interna.

FIGURA 12-14 Los grupos prostéticos de hierro-azufre en la cadena de transporte de electrones.

(a) Porción hemo de los citocromos b_L y b_H , que son componentes de la CoQH_2 -citocromo c reductasa (complejo III). El mismo anillo porfirina (amarillo) está presente en todos los hemos. Los sustituyentes químicos adheridos al anillo de porfirina difieren en los otros citocromos en la cadena de transporte de electrones. Todos los hemos aceptan y liberan un electrón por vez. (b) Grupo hierro-azufre (Fe-S) dimérico. Cada átomo de Fe está unido a cuatro átomos de S: dos son azufre inorgánicos y dos están en cadenas laterales de cisteínas de la proteína asociada. Todos los grupos Fe-S aceptan y liberan un electrón por vez.



Cuadro 12-2 Grupos prostéticos transportadores de electrones en la cadena respiratoria

Componente proteico	Grupos prostéticos*
NADH-CoQ reductasa (complejo I)	FNM Fe-S
Succinato-CoQ reductasa (complejo II)	FAD Fe-S
CoQH_2 -citocromo c reductasa (complejo III)	Hemo b_L Hemo b_H Fe-S Hemo c_1
Citocromo c	Hemo c
Citocromo c oxidasa (complejo IV)	Cu_a^{2+} Hemo a Cu_b^{2+} Hemo a_3

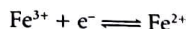
* No se incluye la coenzima Q, un transportador de electrones que no está unido de manera permanente a un complejo proteico.

FUENTES: J. W. De Pierre y L. Ernster, 1977, *Ann. Rev. Biochem.* 46:201.

Cuatro complejos multiproteína grandes (los complejos I-IV) componen una cadena de transporte de electrones en la membrana mitocondrial interna que es responsable de la generación de la fuerza protón-motriz (véase la Fig. 12-8, etapa III). Cada uno de los complejos contiene diversos *grupos prostéticos*, que participan en el proceso de mover electrones desde las moléculas donantes hasta las moléculasceptoras en reacciones de oxidación-reducción acopladas (véase el Cap. 2). Estas moléculas pequeñas no peptídicas o iones metálicos se asocian de manera específica o estrechamente con los complejos multiproteína (Cuadro 12-2).

Hemo y los citocromos Diversos tipos de *hemo*, un grupo prostético que contiene hierro similar al que se encuentra en la hemoglobina

y la mioglobina (Fig. 12-14a), se unen fuertemente (covalente o no covalentemente) a un grupo de proteínas mitocondriales denominadas **citocromos**. Cada citocromo es designado por una letra, como *a*, *b*, *c*, o *c₁*. El flujo de electrones a través de los citocromos se produce por la oxidación y la reducción del átomo de Fe en el centro de la molécula hemo:



Debido a que el anillo hemo en los citocromos consiste en átomos unidos por enlaces dobles y simples alternantes, existe un gran número de formas híbridas de resonancia. Estas permiten que el electrón extra se distribuya en el citocromo para ser deslocalizado por todos los átomos de carbono y de nitrógeno hemo, así como el ion Fe.

Los diversos citocromos tienen grupos hemo y átomos que los rodean levemente diferentes (llamados ligandos axiales), lo cual genera ambientes diferentes para el ion Fe. Por lo tanto, cada citocromo tiene un potencial de reducción distinto o tendencia a aceptar un electrón: una propiedad importante que dictamina la unidireccionalidad del flujo de electrones “cuesta abajo” a lo largo de la cadena. Al igual que el agua fluye espontáneamente cuesta abajo desde un estado de energía potencial más elevado hacia uno más bajo (pero no cuesta arriba), los electrones fluyen en solo una dirección desde un hemo (u otro grupo prostético) a otro, debido a sus diferencias de potencial de reducción (para más información acerca del concepto de potencial de reducción, *E*, véase el Cap. 2). Todos los citocromos, excepto el citocromo *c*, son componentes de los complejos multiproteína de membrana integral en la membrana mitocondrial interna.

Grupos hierro-azufre Los grupos de hierro-azufre son grupos prostéticos no hemo que contienen hierro, los cuales consisten en átomos de Fe unidos tanto a átomos de S inorgánico como a átomos de S en residuos de cisteína en una proteína (Fig. 12-14b). Algunos átomos de Fe en el grupo portan una carga + 2; otros tienen una carga +3. Sin embargo, la carga neta de cada átomo de Fe está en realidad entre +2 y +3 debido a que los electrones en sus orbitales más externos, junto al electrón extra distribuido a través de la cadena de transporte, están dispersados entre los átomos de Fe y se mueven rápidamente desde un átomo a otro. Los grupos hierro-azufre aceptan y liberan electrones de a uno por vez.

Coenzima Q (CoQ) La coenzima Q (CoQ), también denominada *ubiquinona*, es el único transportador de electrones que es una molécula pequeña en la cadena que no constituye en esencia un grupo prostético unido irreversiblemente a una proteína (Fig. 12-15). Es un transportador tanto de protones como de electrones. La forma quinona oxidada de la CoQ puede aceptar un único electrón para formar una semiquinona, un radical libre cargado denotado por $\text{CoQ}^{\cdot-}$. La adición de un segundo electrón y dos protones (así, un total de dos átomos de hidrógeno) a $\text{CoQ}^{\cdot-}$ estructura la hidroubiquinona (CoQH_2), la forma totalmente reducida. Ambas formas, CoQ y CoQH_2 , son solubles en fosfolípidos y se difunden libremente en el centro hidrófobo de la membrana mitocondrial interna. Así es como participan en la cadena de transporte de electrones, llevando protones y electrones entre los complejos proteicos en la cadena.

A continuación veremos en detalle los complejos multiproteicos que usan estos grupos prostéticos y las vías que toman los electrones y protones a medida que pasan a través de los complejos.

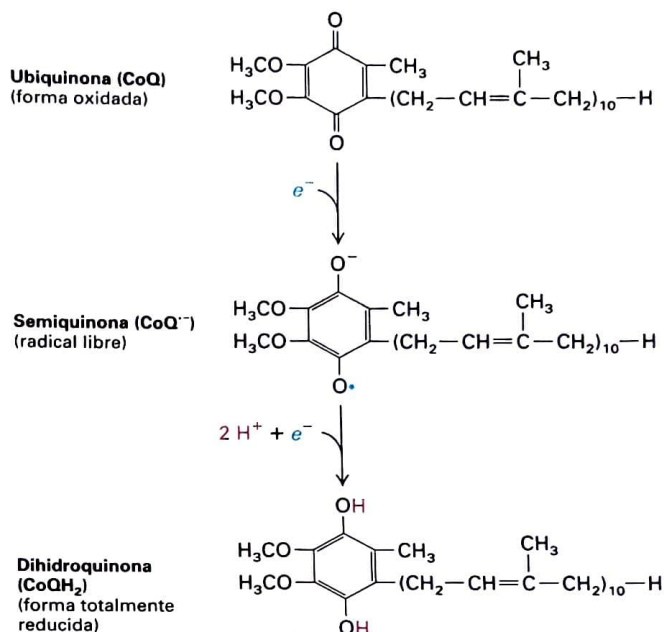


FIGURA 12-15 Formas oxidada y reducida de la coenzima Q (CoQ), que puede transportar dos protones y dos electrones. Debido a su “cola” hidrocarbonada de las unidades de isopreno, la CoQ (también llamada ubiquinona) es soluble en el centro hidrófobo de las bicapas fosfolípicas y es muy móvil. La reducción de CoQ a la forma totalmente reducida, QH_2 (dihidroquinona), se produce en dos pasos con un intermediario de radical libre semirreducido, llamado semiquinona.

Cuatro complejos multiproteína grandes acoplan el transporte de electrones al bombeo de protones a través de la membrana mitocondrial interna

A medida que los electrones fluyen cuesta abajo desde un transportador de electrones hasta el siguiente en la cadena de transporte de electrones, la energía liberada es utilizada para impulsar el bombeo de protones en contra de su gradiente electroquímico a través de la membrana mitocondrial interna. Cuatro complejos multiproteína grandes acoplan el movimiento de los electrones al bombeo de protones: la *NADH-CoQ reductasa* (complejo I, > 40 subunidades), la *succinato-CoQ reductasa* (complejo II, 4 subunidades), la *CoQH₂-citocromo c reductasa* (complejo III, 11 subunidades) y la *citocromo c oxidasa* (complejo IV, 13 subunidades) (Fig. 12-16). Los electrones del NADH fluyen desde el complejo I a través de CoQ/CoQH_2 hasta el complejo III y luego a través de la proteína soluble citocromo *c* (cyt *c*) hasta el complejo IV para reducir el oxígeno molecular (el complejo II es saltado) (véase la Fig. 12-16a); alternativamente, los electrones del FADH_2 fluyen desde el complejo II a través de CoQ/CoQH_2 hasta el complejo III y luego a través del citocromo *c* hasta el complejo IV para reducir el oxígeno molecular (el complejo I es saltado) (véase la Fig. 12-16b).

Como se muestra en la Figura 12-16, la CoQ acepta electrones liberados desde la *NADH-CoQ reductasa* (complejo I) o la *succinato-CoQ reductasa* (complejo II) y los dona a la *CoQH₂-citocromo c reductasa* (complejo III). Los protones son transportados simultáneamente desde el lado de la matriz de la membrana (también denominada citosólico) hasta el espacio intermembrana (también llamado lado exoplásmico). Donde sea que la CoQ acepte los electrones, lo hace a un sitio de unión sobre el lado de la matriz de un complejo proteico, siempre recogiendo

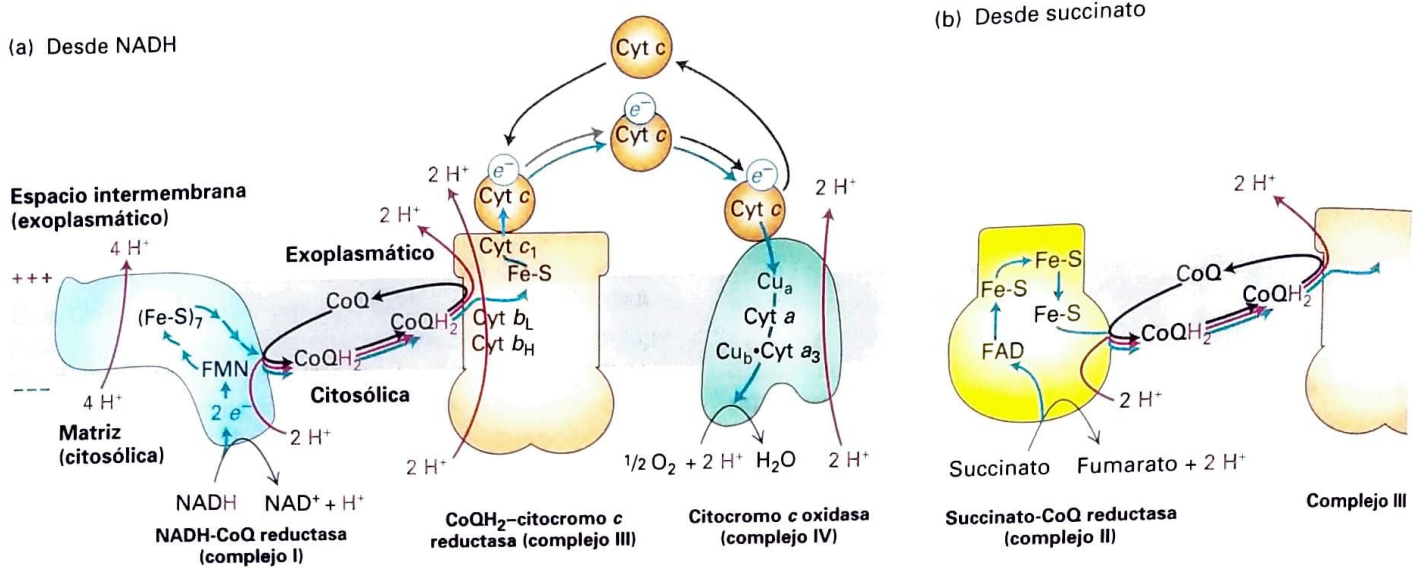


FIGURA 12-16 Cadena de transporte de electrones. Los electrones (flechas azules) a través de cuatro principales complejos multiproteicos (I-IV). El movimiento de los electrones entre los complejos está mediado, ya sea por la molécula de coenzima Q soluble en lípidos (CoQ, forma oxidada; CoQH₂, forma reducida) o por la proteína citocromo c soluble en agua (Cyt c). Múltiples complejos multiproteicos utilizan la energía liberada del paso de electrones para bombear protones desde la matriz hasta el espacio intermembrana (flechas rojas). (a) Vía desde el NADH. Los electrones del NADH fluyen a través del complejo I, inicialmente a través de una flavina mononucleótido (FMN) y luego a través de siete grupos hierro-azufre (Fe-S), hasta la CoQ (que une dos protones) formando CoQH₂. Los cambios conformacionales en el complejo I que acompañan el flujo de electrones conducen el bombeo de protones desde la matriz hasta el espacio intermembrana (flechas rojas). Los electrones luego fluyen a través del CoQH₂, liberado (y reciclado) hasta el complejo III y luego a través del Cyt c hasta el complejo IV. Un total de 10 protones son

translocados por par de electrones que fluyen desde el NADH hasta el O₂. Los protones liberados en el espacio de la matriz durante la oxidación del NADH por el complejo I son consumidos en la formación de agua a partir del O₂ por el complejo IV, dando como resultado que no hay una translocación neta de protones a partir de estas reacciones. (b) Vía desde el succinato. Los electrones fluyen desde el succinato hasta el complejo II a través del FAD/FADH₂ y los grupos hierro-azufre (Fe-S) desde el complejo II hasta el complejo III a través del CoQ/CoQH₂ y luego hasta el complejo IV a través del Cyt c. Los electrones liberados durante la oxidación del succinato hasta el fumarato en el complejo II son usados para reducir el CoQ hasta CoQH₂ sin translocar protones adicionales. Los electrones restantes transportados desde el CoQH₂ proceden por la misma vía que la del NADH en (a). Por lo tanto, por cada par de electrones transportados desde el succinato hasta el O₂ se translocan seis protones a través de los complejos III y IV.

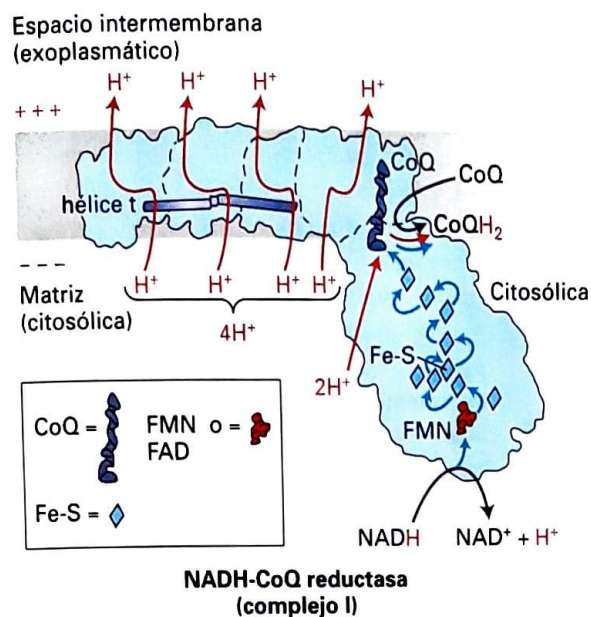
protones del medio allí. Donde sea que la CoQH₂ libere los electrones, lo hace sobre un sitio sobre el lado del espacio intermembrana de un complejo proteico, liberando los protones en el líquido del espacio intermembrana. Así, el transporte de cada par de electrones por la CoQ está obligatoriamente acoplado al movimiento de dos protones desde la matriz hasta el espacio intermembrana.

NADH-CoQ reductasa (complejo I) Los electrones son transferidos desde el NADH hasta el CoQ por la NADH-CoQ reductasa (véase la Fig. 12-16a). La microscopía electrónica y la cristalografía de rayos x del complejo I de bacterias (masa ~ 500 kDa, con 14 subunidades) y de los eucariontes (~1 MDa, con 14 subunidades centrales altamente conservadas compartidas con las bacterias de alrededor de más de 26-32 subunidades accesorias) establecieron que tiene forma de L (Fig. 12-17a). El brazo de la L embebido en la membrana está levemente curvado ~ 180 Å de longitud y comprende proteínas con más de 60 hélices alfa transmembrana. Este brazo tiene cuatro subdominios, tres de los cuales tienen proteínas que son miembros de una familia de antitransportadores de cationes. El brazo periférico hidrófilo se extiende alrededor de 130 Å alejándose de la membrana hacia el interior del espacio citosólico.

El NAD⁺ es exclusivamente un transportador de dos electrones: acepta o libera un par de electrones simultáneamente. En la NADH-CoQ reductasa (complejo I), el sitio de unión del NADH está en la punta del brazo periférico (véase la Fig. 12-17a); los electrones liberados desde el NADH primero fluyen hacia el FMN (flavina mononucleótido), un cofactor relacionado con FAD; luego son transportados hacia abajo ~ 95 Å por ese brazo a través de siete grupos hierro-azufre y finalmente al CoQ, que está unido a un sitio al menos parcialmente en el plano de la membrana. El FMN, al igual que el FAD, puede aceptar dos electrones pero de a uno por vez.

Cada electrón transportado sufre una caída en el potencial de ~ 360 mV, equivalente a un ΔG° de -16,6 kcal/mol para los dos electrones transportados. Mucha de esta energía liberada se utiliza para transportar cuatro protones a través de la membrana interna por molécula de NADH oxidada por el complejo I. Esos cuatro protones son distintos de los dos protones que son transferidos al CoQ como se ilustra en las Figuras 12-15, 12-16a y 12-17a. La estructura del complejo I sugiere que la energía liberada por el transporte de electrones en el brazo periférico se utiliza para cambiar la conformación de las subunidades en el brazo de la membrana y así mediar el movimiento de cuatro protones a través de la membrana. Es probable que tres protones pasen a través

(a) Complejo I



(b) Complejo II

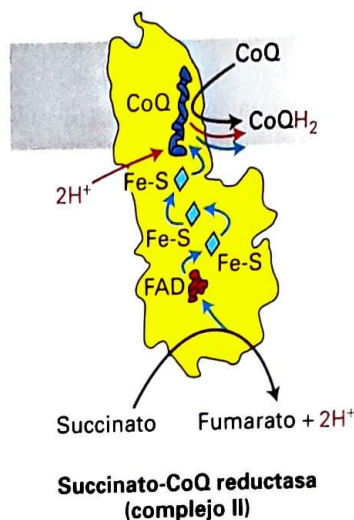
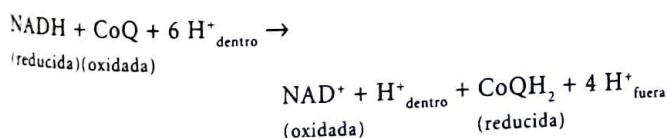


FIGURA 12-17 El transporte de electrones y protones a través de los complejos I y II. (a) Modelo del complejo I sobre la base de su estructura tridimensional. El contorno de la forma del complejo I, como se determina por cristalografía de rayos X, se muestra en celeste y se indican distintas subunidades estructurales mediante líneas delgadas de puntos negros. Desde el NADH los electrones fluyen primero hasta una flavina mononucleótido (FMN) y luego, a través de siete a nueve grupos hierro-azufre (Fe-S, rombos azules) hasta el CoQ, a la cual se unen dos protones de la matriz (flechas azules) para formar CoQH₂. Los cambios conformacionales debido al flujo de electrones, que probablemente incluyen el movimiento horizontal como

un pistón de la hélice t, conducen el bombeo de protones a través de las subunidades transmembrana desde la matriz hasta el espacio intramembrana (flechas rojas). (b) Modelo del complejo II sobre la base de sus estructuras tridimensionales. Flujo de electrones desde el succinato hasta el complejo II a través del FAD/FADH₂ y de los grupos hierro-azufre (Fe-S, rombos azules) y desde el complejo II hasta el complejo III a través de la CoQ/CoQH₂. Los electrones liberados durante la oxidación de succinato a fumarato en el complejo II son usados para reducir la CoQ hasta CoQH₂ sin la translocación de protones adicionales. (Estructura del complejo I adaptado de C. Hunte, V. Zickermann y U. Brandt, 2010, *Science* **329**:448-451 y R. G. Efremov, R. Baradaran y L. A. Sazanov, 2010, *Nature* **465**:441-445.)

de tres dominios de antitransportadores de cationes, mientras que la ruta del cuarto es a través de un tipo diferente de dominio. Una hélice alfa (hélice t) transversa, doblada, de ~ 110 Å de longitud en el brazo de la membrana, se extiende paralela al plano de la membrana, uniendo potencialmente en forma mecánica los dominios del antitransportador con el brazo periférico (Fig. 12-17a) y por lo tanto, transmitiendo los cambios conformacionales inducidos por el transporte de electrón en el brazo periférico a los dominios antitransportadores distantes para conducir el transporte de electrones.

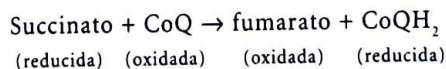
La reacción global catalizada por este complejo es:



Succinato-CoQ reductasa (complejo II) La succinato deshidrogenasa, la enzima que oxida una molécula de succinato a fumarato en el ciclo del ácido cítrico (y en el proceso genera la coenzima reducida FADH₂), es una de las cuatro subunidades del complejo II. Así, el ciclo del ácido cítrico está unido tanto física como funcionalmente a la cadena de transporte de electrones. Los dos electrones liberados en la conversión de succinato a fumarato son transferidos primero a FAD en la succinato deshidrogenasa, luego a los grupos de hierro-azufre (regeneración del FAD) y finalmente a la CoQ, que se une a una hendidura sobre

el lado de la matriz de las porciones transmembrana del complejo II (Figs. 12-16b y 12-17b). La vía es de alguna manera reminiscente a la del complejo I (Fig. 12-17a).

La reacción global catalizada por este complejo es:

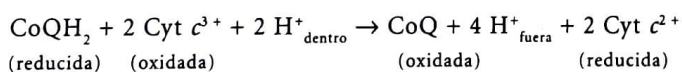


Aunque el ΔG° para esta reacción es negativo, la energía liberada es insuficiente para el bombeo de protones, además de la reducción de CoQ para formar CoQH₂. Por lo tanto, no se translocan protones directamente a través de la membrana mediante el complejo succinato-CoQ reductasa y no se genera fuerza protón-motriz en esta parte de la cadena respiratoria. Brevemente describiremos cómo los protones y los electrones en las moléculas de CoQH₂, generados por los complejos I y II, contribuyen a la formación de la fuerza protón-motriz.

El complejo II genera CoQH₂ a partir del succinato a través de las reacciones redox mediadas por FAD/FADH₂. Otro grupo de proteínas en la matriz y la membrana mitocondrial interna lleva a cabo un grupo comparable de reacciones redox mediadas por FAD/FADH para producir CoQH₂ a partir de acil-CoA graso. La *acil-CoA graso deshidrogenasa*, que es una enzima soluble en agua, cataliza el primer paso de la oxidación de acil-CoA graso en la matriz mitocondrial (véase la Fig. 12-12). Existen diversas enzimas acilo graso-CoA deshidrogenasa con especificidades por las cadenas de acilo graso de diferentes longi-

tudes. Estas enzimas median el primer paso en un proceso de cuatro pasos, que elimina los dos carbonos del grupo acilo graso mediante la oxidación del carbono en la posición β de la cadena de acilo graso (así, el proceso entero suele denominarse como β -oxidación). Estas reacciones generan acetil-CoA, que a su vez entra al ciclo del ácido cítrico. Ellas también generan un intermediario de FADH_2 y NADH . El FADH_2 generado permanece unido a la enzima durante la reacción redox, como es el caso para el complejo II. Una proteína soluble en agua llamada *flavoproteína de transferencia de electrones* (ETF) transfiere los electrones de alta energía del FADH en la acil-CoA deshidrogenasa a la *flavoproteína de transferencia de electrones:ubiquinona oxidoreductasa* (ETF:QO), una proteína de membrana que reduce la CoQ a CoQH_2 en la membrana interna. Esta CoQH_2 se entremezcla en la membrana con las otras moléculas CoQH_2 generadas por los complejos I y II.

CoQH_2 -citocromo c reductasa (complejo III) Una CoQH_2 generada ya sea por el complejo I, el complejo II o la ETF:QO , dona dos electrones a la CoQH_2 -citocromo c reductasa (complejo III), regenerando la CoQ oxidada. Concomitantemente libera al interior del espacio intermembrana dos protones previamente recolectados por la CoQ del lado de la matriz, generando parte de la fuerza protón-motriz (véase la Fig. 12-16). Dentro del complejo III, los electrones liberados primero son transferidos a un grupo de hierro-azufre dentro del complejo y luego al citocromo c_1 o a los dos citocromos tipo b (b_L y b_H , véase el ciclo Q a continuación). Finalmente, los dos electrones son transferidos secuencialmente a dos moléculas de la forma oxidada del citocromo c, una proteína periférica soluble en agua que se difunde en el espacio intermembrana. Por cada par de electrones transferidos, la reacción global catalizada por el complejo CoQH_2 -citocromo c reductasa es:

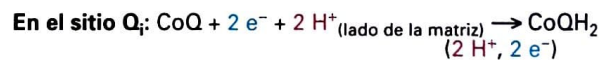
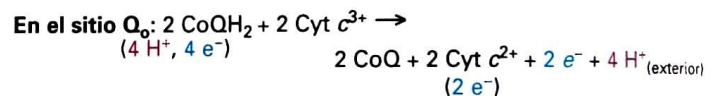
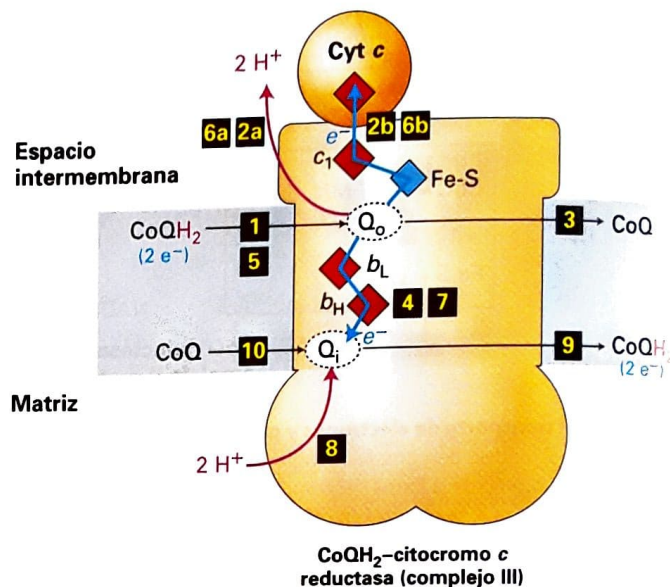


El ΔG° para esta reacción es lo suficientemente negativo como para que dos protones, además de los procedentes de la CoQH_2 , sean transportados desde la matriz mitocondrial a través de la membrana interna por cada par de electrones transferidos; esto involucra el ciclo Q protón-motriz, analizado a continuación. La proteína hemo citocromo c y la molécula pequeña soluble en lípidos CoQ cumplen funciones similares en la cadena de transporte de electrones, en el sentido de que ambas sirven como lanzaderas de electrones móviles, transfiriendo electrones (y por ende energía) entre los complejos de la cadena de transporte de electrones.

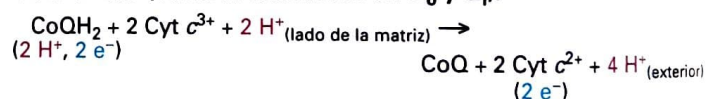
El ciclo Q Los experimentos han demostrado que se transfieren cuatro protones a través de la membrana por par de electrones transportados desde la CoQH_2 a través de la CoQH_2 -citocromo c reductasa (complejo III). Estos cuatro protones son aquellos transportados sobre dos moléculas de CoQH_2 , que son convertidos a dos moléculas de CoQ durante el ciclo. Sin embargo, otra molécula de CoQ recibe otros dos protones del espacio de la matriz y se convierte en una molécula de CoQH_2 . Así, la reacción global neta involucra la conversión de solo una molécula de CoQH_2 a CoQ a medida que se transfieren dos electrones (uno por vez) a dos moléculas del citocromo c acep-

toras. Un mecanismo evolutivamente conservado, llamado *ciclo Q*, es responsable del transporte de dos por uno de protones y electrones por el complejo III (Fig. 12-18).

El sustrato para el complejo III, CoQH_2 , es generado por diversas enzimas incluyendo la NADH-CoQ reductasa (Complejo I), la



Ciclo Q neto (suma de reacciones en Q_o y Q_i):



Por cada 2e^- transferidos a través del complejo III al citocromo c, se liberan 4H^+ al espacio intermembrana

FIGURA 12-18 El ciclo Q. El ciclo Q del complejo III utiliza la oxidación neta de una molécula de CoQH_2 para transferir cuatro protones al espacio intermembrana y dos electrones a dos moléculas de citocromo c. El ciclo comienza cuando una molécula del reservorio combinado de CoQH_2 reducido en la membrana se une a un sitio Q_o sobre el lado del espacio intermembrana (exterior) de la porción transmembrana del complejo III (paso 1). Allí, CoQH_2 libera dos protones al espacio intermembrana (paso 2a) y dos electrones, y la CoQ resultante se disocia (paso 3). Uno de los electrones es transportado, a través de una proteína hierro-azufre y del citocromo c_1 , directamente hasta el citocromo c (paso 2b). (Recordar que cada citocromo c envía un electrón desde el complejo III hasta el complejo IV). El otro electrón se mueve a través del citocromo b_L y b_H y se reduce parcialmente una molécula CoQ unida al segundo sitio, Q_i , sobre el lado (interno) de la matriz del complejo, formando un anión semiquinona CoQ^- (paso 4). El proceso se repite con la unión de una segunda molécula de CoQH_2 en el sitio Q_o (paso 5), la liberación de un protón (paso 6a), la reducción de otro citocromo c (paso 6b) y la adición del otro electrón al CoQ^- unido al sitio Q_i (paso 7). Allí, la adición de dos protones de la matriz produce una molécula de CoQH_2 totalmente reducida en el sitio Q_i , que luego se disocia (pasos 8 y 9), liberando el Q para unir una molécula nueva de CoQ. (Paso 10) y comenzar nuevamente el ciclo Q (Adaptado de B. Trumpower, 1990, *J. Biol. Chem.* **265**:11 409, y E. Darrouzet y cols., *Trends Biochem. Sci.* **26**:445).

succinato-CoQ reductasa (complejo II), la *flavoproteína de transferencia de electrones:ubiquinona oxidorreductasa* (ETF:QO, durante la β -oxidación) y, como se verá, por el complejo III en sí mismo.

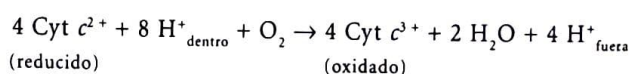
Como se muestra en la Figura 12-18, en una vuelta del ciclo Q, se oxidan dos moléculas de CoQH_2 a CoQ en el sitio Q_o y se libera un total de cuatro protones al espacio intermembrana, pero en el sitio Q_i se regenera una molécula de CoQH_2 a partir de CoQ y dos proteínas adicionales del espacio de la matriz. Los protones transferidos son distribuidos a partir de CoQH_2 , que obtiene sus protones de la matriz como se describió de manera reciente. Aunque aparentemente engorroso, el ciclo Q optimiza el número de protones bombeados por el par de electrones que se mueven a través del complejo III. El ciclo Q se encuentra en todas las plantas y animales, así como en las bacterias. Su formación en una etapa muy temprana de la evolución celular fue probablemente esencial para el éxito de todas las formas de vida, como un modo de convertir la energía potencial en la coenzima Q reducida en la máxima fuerza protón-motriz a través de una membrana. A su vez esto maximiza el número de moléculas de ATP sintetizadas a partir de cada electrón que se mueve descendiendo en la cadena de transporte de electrones desde el NADH o FADH_2 hasta el oxígeno.

¿Cómo se dirigen los dos electrones liberados desde la CoQH_2 en el sitio Q_o hasta diferentes aceptores, ya sea Fe-S, citocromo c_1 y luego al citocromo c (vía superior en la Fig. 12-18), o alternativamente hasta el citocromo b_L , el citocromo b_H y luego a la CoQ en el sitio Q_i (vía inferior en la Fig. 12-18)? El mecanismo involucra una bisagra flexible en la subunidad proteica que contiene Fe-S del complejo III. Inicialmente el grupo Fe-S se encuentra lo suficientemente cerca del sitio Q_o para recolectar un electrón del CoQH_2 unido allí. Una vez que sucedió esto, un segmento de la proteína que contiene este grupo Fe-S balancea el grupo alejándose del sitio Q_o hasta una posición lo suficientemente cerca del hemo en el citocromo c_1 para que se produzca la transferencia electrónica. Con la subunidad Fe-S en esta conformación alternada, el segundo electrón liberado del CoQH_2 unido al sitio Q_o no puede moverse hasta el grupo Fe-S: está demasiado lejos, por ende toma un camino alternativo a través de una vía de alguna manera termodinámicamente menos favorecida hasta el citocromo b_L y a través del citocromo b_H hasta la CoQ en el sitio Q_i .

Citocromo c oxidasa (complejo IV) El citocromo c , después de ser reducido por un electrón que proviene de la CoQH_2 -citocromo c reductasa (complejo III), se vuelve a reducir a medida que transporta su electrón hasta la citocromo c oxidasa (complejo IV) (véase la Fig. 12-16). Las citocromo c oxidasas contienen 13 subunidades diferentes, pero el centro catalítico de la enzima consiste en solo tres subunidades. Las funciones de las subunidades restantes no son bien comprendidas. Las citocromo c oxidasas bacterianas contienen solo las tres subunidades catalíticas. Tanto en las mitocondrias como en las bacterias, las cuatro moléculas de citocromo c reducido se unen, de a una por vez, a la oxidasa. Se transfiere un electrón desde el hemo de cada citocromo c , primero al par de iones de cobre llamados Cu_2^{2+} , luego al hemo en el citocromo a y a continuación al Cu_2^{2+} y al hemo en el citocromo a_3 , que juntos componen el centro de reducción del oxígeno. Los cuatro electrones finalmente pasan al O_2 , el aceptor final de electrones, produciendo cuatro H_2O que junto con el CO_2 es uno de los productos finales de la vía de oxidación global (nótese que, por simplicidad, la Figura 12-16 únicamente muestra dos electrones moviéndose y $1/2 \text{O}_2$ siendo reducido). Los

intermediarios en la reducción del oxígeno incluyen el anión peróxido (O_2^{2-}) y probablemente el radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), así como numerosos complejos inusuales de átomos de hierro y oxígeno. Estos intermediarios podrían ser dañinos para la célula si ellos se escapan del complejo IV, pero lo hacen solo raramente (véase el análisis de las especies reactivas del oxígeno a continuación). Durante el transporte de cuatro electrones a través del complejo citocromo c oxidasa, se transportan cuatro protones desde el espacio de la matriz a través de la membrana. Así, el complejo IV transporta solo un protón por electrón transferido, mientras que el complejo II, utilizando el ciclo Q, transporta dos protones por electrón transferido. Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual el complejo IV transporta estos protones.

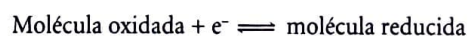
Por cada cuatro electrones transferidos, la reacción global catalizada por la citocromo c oxidasa es:



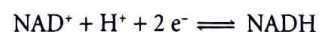
El veneno cianuro, que se ha utilizado como agente de guerra química por espías para suicidarse cuando eran capturados, en las cámaras de gas para ejecutar prisioneros y por los nazis (gas Zyklon B) para el asesinato en masa de judíos y otros, es tóxico debido a que se une al hemo a_3 en la citocromo c oxidasa (complejo IV), inhibiendo el transporte de electrones y por ende la fosforilación oxidativa y la producción de ATP. El cianuro es una de muchas moléculas pequeñas que interfieren con la producción de energía en las mitocondrias. ■

Los potenciales de reducción de los transportadores electrónicos en la cadena de transporte de electrones favorecen el flujo de electrones del NADH hasta el O_2

Como vimos en el Capítulo 2, el **potencial de reducción E** para una reacción de reducción parcial



es una medida de la constante de equilibrio de esa reacción parcial. Con la excepción de los citocromos b en los complejos de CoQH_2 -citocromo c reductasa, el potencial de reducción estándar E° de los transportadores electrónicos en la cadena respiratoria mitocondrial se incrementa continuamente desde el NADH hasta el O_2 . Por ejemplo, para la reacción parcial



el valor del potencial de reducción estándar es -320 mV , lo cual es equivalente a un ΔG° de $+14,8 \text{ kcal/mol}$ para la transferencia de dos electrones. Así, esta reacción parcial tiende a proceder hacia la izquierda, es decir, hacia la oxidación de NADH a NAD^+ .

Por el contrario, el potencial de reducción estándar para la reacción parcial

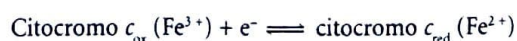
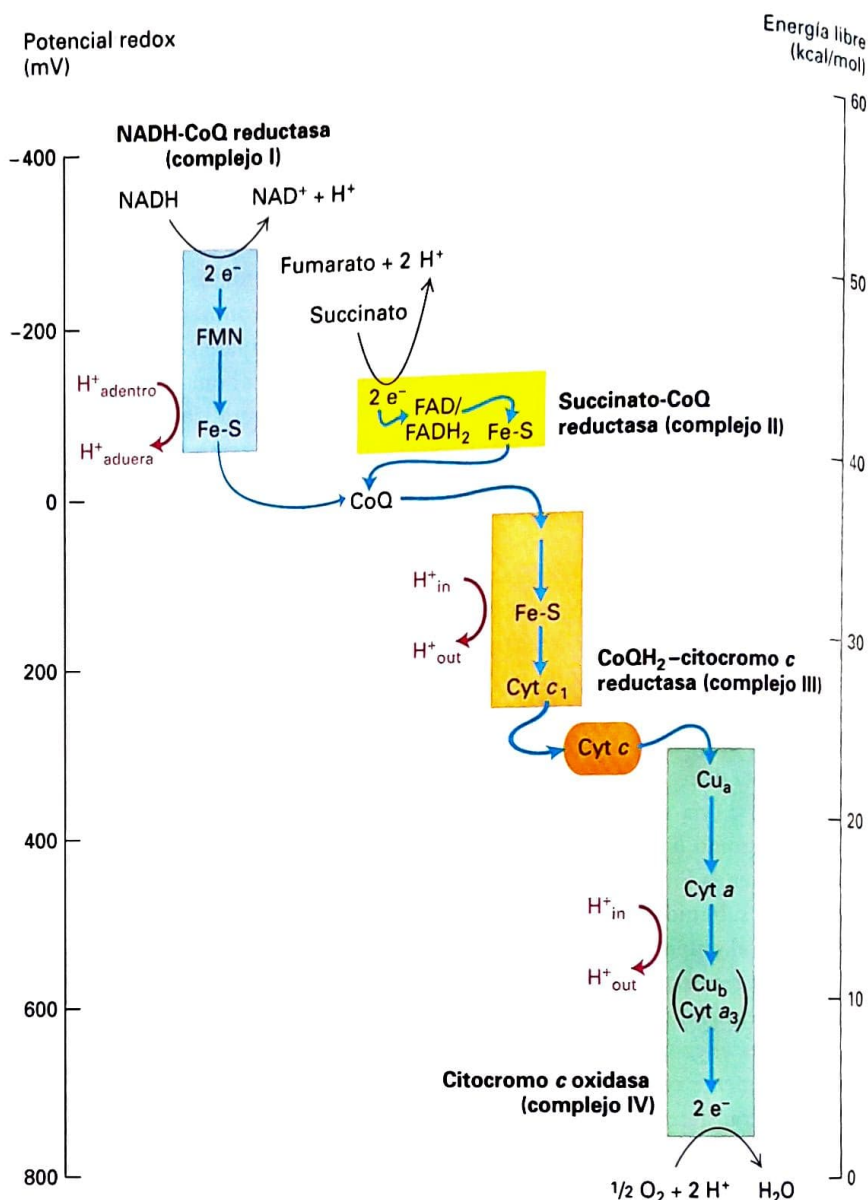


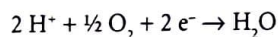
FIGURA 12-19 Cambios en el potencial redox y la energía libre durante el flujo escalonado de electrones a través de la cadena respiratoria. Las

flechas azules indican el flujo de electrones; las flechas rojas, la translocación de protones a través de la membrana mitocondrial interna. Los electrones pasan a través de complejos multiproteicos desde aquellos a un potencial de reducción más bajo hasta aquellos con un potencial de reducción más alto (más positivo) (escala de la izquierda), con una reducción correspondiente en energía libre (escala de la derecha). La energía liberada a medida que los electrones fluyen a través de tres de los complejos es suficiente para impulsar el bombeo de iones H^+ a través de la membrana, estableciendo una fuerza protón-motriz.



es + 220 mV ($\Delta G^\circ = -5,1$ kcal/mol) para transferir un electrón. Así, esta reacción parcial tiende a proceder hacia la derecha, es decir, hacia la reducción del citocromo c (Fe^{3+}) a citocromo c (Fe^{2+}).

La reacción final en la cadena respiratoria, la reducción de O_2 a H_2O :



tiene un potencial de reducción estándar de + 816 mV ($\Delta G^\circ = -37,8$ kcal/mol para transferir dos electrones), el más positivo en la serie completa; por lo tanto, esta reacción tiende a proceder hacia la derecha.

Como se ilustra en la Figura 12-19, el incremento constante en los valores de E° y el correspondiente descenso en los valores de ΔG° de los transportadores en la cadena de transporte de electrones, favorecen el flujo de electrones desde el NADH y el $FADH_2$ (generados a partir del succinato) hasta el oxígeno. La energía liberada como electrones que fluyen energéticamente "cuesta abajo" a través de los complejos de la cadena de transporte de electrones, conduce el bombeo de protones en contra de sus gradientes de concentración atravesando la membrana mitocondrial interna.

Los complejos multiproteicos de la cadena de transporte de electrones se ensamblan en supercomplejos

Hace 50 años Britton Chance, propuso que los complejos de transporte de electrones podrían ensamblarse en supercomplejos grandes. Haciendo esto, los complejos podrían acercarse a una proximidad altamente organizada, lo cual mejoraría la velocidad y la eficacia del proceso global. En efecto, los estudios genéticos, bioquímicos y biofísicos proporcionaron gran evidencia acerca de la existencia de supercomplejos en la cadena de transporte de electrones. Estos estudios involucraron métodos electroforéticos en gel llamados electroforesis nativa azul (BN)-PAGE y electroforesis nativa simple o incolora (CN)-PAGE, que permiten la separación de complejos multiproteína macromoleculares muy grandes y el análisis por microscopía electrónica de sus estructuras tridimensionales. Uno de tales supercomplejos contiene una copia del complejo I, un dímero del complejo III (III_2) y una o más copias del complejo IV (Fig. 12-20). A partir de los geles BN-PAGE se aisló un supercomplejo que contiene todos los componentes que se cree que cumplen un papel en la respiración (complejos I-IV, ubiquinona (CoQ) y citocromo c), el cual demostró transferir los electrones desde

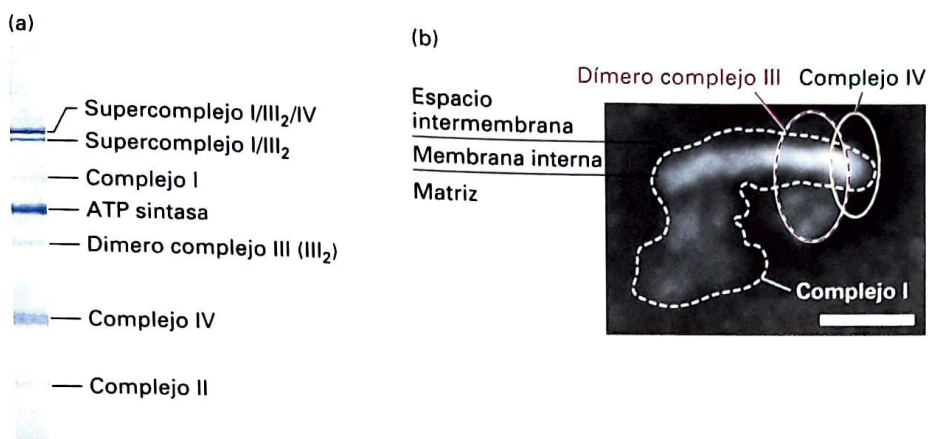


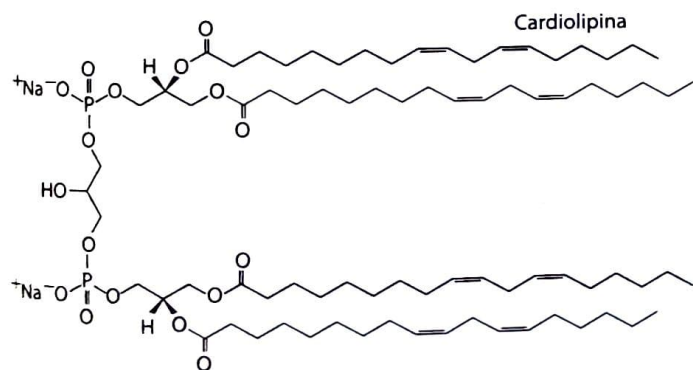
FIGURA EXPERIMENTAL 12-20 La electroforesis y las imágenes de microscopia electrónica identifican un supercomplejo de la cadena de transporte de electrones conteniendo los complejos I, III y IV.

(a) Las proteínas de membrana en las mitocondrias de corazón bovino aislado se solubilizaron con un detergente y se separaron los complejos y supercomplejos mediante electroforesis en gel usando el método azul nativo (BN)-PAGE. Cada banda teñida de azul dentro del gel representa el complejo proteico indicado o supercomplejo, con III_2 representando un dímero del complejo III. La intensidad de la tinción azul es aproximadamente proporcional

a la cantidad de complejo o supercomplejo presente. (b) El supercomplejo I/ III_2 /IV fue extraído del gel y las partículas se tiñeron negativamente con acetato de uranilo al 1%, visualizándose luego mediante microscopia electrónica de transmisión. Se combinaron las imágenes de 228 partículas a una resolución de $\sim 3,4$ nm para generar una imagen promedio del complejo visto desde el lateral del plano de la membrana. Las localizaciones aproximadas del dímero complejo III y complejo IV se indican mediante óvalos; el borde del complejo I también se indica mediante líneas de puntos (blanco). La barra de escala es 10 nm. (Adaptado de E. Schäfer y cols., 2006, *J. Biol. Chem.* **281**(22):15370-15375).

el NADH hasta el O_2 ; en otras palabras, este supercomplejo puede respirar: es un respirasoma.

El único fosfolípido *cardiolipina* (difosfatidil glicerol) parece cumplir un papel importante en el ensamblaje y la función de estos supercomplejos. En general no se observa



en otras membranas de las células eucariontes, se ha observado que la cardiolipina se une a proteínas integrales de membrana de la membrana interna (p. ej., complejo II). Estudios genéticos y bioquímicos en mutantes de levadura, en los cuales la síntesis de cardiolipina está bloqueada, han establecido que la cardiolipina contribuye a la formación y la actividad de los supercomplejos mitocondriales y así se lo ha denominado el pegamento que mantiene juntos a todos los transportadores de la cadena electrónica, aunque queda por definir el mecanismo preciso. Además, existe evidencia de que la cardiolipina puede influir en la unión y la permeabilidad de la membrana interna a los protones y en consecuencia, a la fuerza protón-motriz.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son subproductos tóxicos del transporte de electrones que pueden dañar las células



Alrededor de 1-2% del oxígeno metabolizado por los organismos aerobios, en lugar de ser convertido a agua, es parcialmente reducido al anión radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot -}$ donde el “punto” representa un electrón desapareado). Los radicales son átomos que tienen uno o más electrones desapareados en una capa (de valencia) externa, o moléculas que contienen uno de tales átomos. Muchos radicales, aunque no todos, suelen ser altamente reactivos, alterando las estructuras y propiedades de aquellas moléculas con las cuales reaccionan. Los productos de tales reacciones a menudo son ellos mismos radicales y por lo tanto pueden propagar una reacción en cadena que altera muchas moléculas adicionales. Los superóxidos y otras moléculas que contienen oxígeno altamente reactivo, ambos radicales (es decir, $\text{O}_2^{\cdot -}$) y los no radicales (peróxido de hidrógeno, H_2O_2) se denominan *especies reactivas de oxígeno* (ROS, por sus siglas en inglés). Las ROS son de gran interés debido a que pueden reaccionar con muchas moléculas biológicas claves y por ende causar daño, incluyendo lípidos (en particular ácidos grasos insaturados y sus derivados), proteínas y DNA, interfiriendo gravemente con sus funciones normales. A concentraciones moderadas, las ROS contribuyen a lo que se denomina estrés oxidativo celular y puede ser altamente tóxico. En efecto, las ROS son generadas a propósito por las células de defensa del cuerpo (p. ej., macrófagos, neutrófilos) para matar patógenos. En los seres humanos, la generación excesiva o inadecuada de ROS está implicada en muchas enfermedades, incluyendo fallos cardíacos, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades hepáticas inducidas por alcohol, diabetes y envejecimiento.

Aunque existen diversos mecanismos para generar las ROS en las células, la principal fuente en las células eucariontes es el transporte de electrones en las mitocondrias (o en los cloroplastos, como se descri-

be a continuación). Los electrones que pasan a través de la cadena de transporte mitocondrial pueden tener suficiente energía para reducir el oxígeno molecular (O_2) formando aniones superóxido (Fig. 12-21, arriba). Sin embargo, esto solo puede suceder cuando el oxígeno molecular entra en contacto con los transportadores de electrones reducidos (hierro, FMN, $CoQH_2$) en la cadena. En general, se previene tal contacto por el secuestro de los transportadores dentro de las proteínas involucradas. No obstante, existen algunos sitios (en particular el complejo I y CoQ^{+} , véase la Fig. 12-15) y algunas condiciones (p. ej., alta relación $NADH/NAD^+$ en la matriz, fuerza protón-motriz alta cuando no se genera ATP) en que los electrones pueden “fugarse” más rápidamente de la cadena y reducir el O_2 a $O_2^{\cdot-}$.

El anión superóxido es un ROS en especial inestable y reactivo. Las mitocondrias han desarrollado diversos mecanismos de defensa que ayudan a proteger contra la toxicidad de $O_2^{\cdot-}$, incluyendo el uso de enzimas que inactivan el superóxido, primero mediante su conversión a H_2O_2 (superóxido dismutasa que contiene Mn, SOD) y luego a H_2O (catalasa) (Fig. 12-21). Debido a que $O_2^{\cdot-}$ es también altamente reactivo y tóxico, SOD y la catalasa son algunas de las enzimas más rápidas conocidas. SOD se encuentra dentro de las mitocondrias y otros compartimientos subcelulares. El peróxido de hidrógeno en sí mismo es un ROS que puede difundirse rápidamente a través de las membranas y reaccionar con moléculas a lo largo de toda la célula. También se puede convertir mediante ciertos metales como el Fe^{2+} en radicales hidroxilos

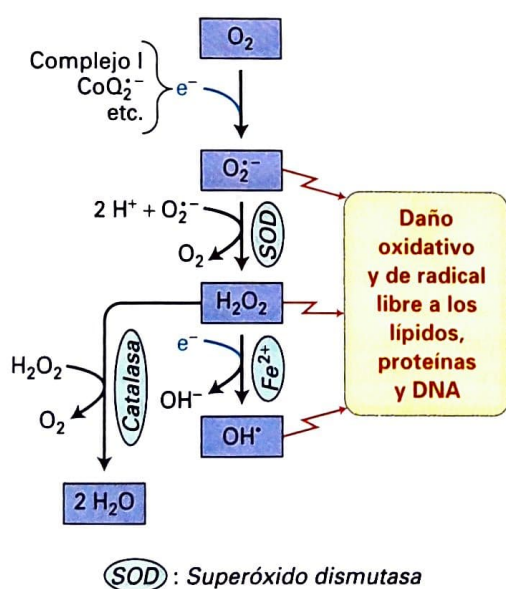


FIGURA 12-21 Generación e inactivación de las especies reactivas del oxígeno. Los electrones de las cadenas de transporte de electrones de las mitocondrias y los cloroplastos, así como también algunos generados a través de otras reacciones enzimáticas, reducen el oxígeno molecular (O_2) formando el anión radical superóxido altamente reactivo ($O_2^{\cdot-}$). El superóxido es rápidamente convertido por la superóxido dismutasa (SOD) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que a su vez puede ser convertido por iones metálicos como el Fe^{2+} a radicales hidroxilos ($OH^{\cdot}$) o puede ser inactivado hasta formar agua mediante enzimas como la catalasa. Debido a su alta reactividad química, el $O_2^{\cdot-}$, el H_2O_2 , el $OH^{\cdot}$ y las moléculas similares se denominan especies reactivas de oxígeno (ROS). Ellas causan daño oxidativo y radicales libres a muchas biomoléculas, incluyendo lípidos, proteínas y DNA. Este daño lleva al estrés oxidativo celular que causa enfermedades y, si es suficientemente grave, puede matar células.

($OH^{\cdot}$) aún más dañinos. Por ende, las células dependen de la activación del H_2O_2 por parte de la catalasa y otras enzimas, como la peroxidoxina y la glutatión peroxidasa, que también desintoxican los productos hidroperóxidos lipídicos formados cuando las ROS reaccionan con los grupos acilo grasos insaturados. Pequeñas moléculas radicales antioxidantes como la vitamina E y el ácido α -lipoico también protegen contra el estrés oxidativo. Aunque en muchas células la catalasa solo se localiza en los peroxisomas, en las células del músculo cardíaco se encuentra en las mitocondrias. Esto no es sorprendente, debido a que el corazón es el órgano que más oxígeno consume por gramo de peso en los mamíferos.

Como la tasa de producción de ROS por parte de las mitocondrias y de los cloroplastos refleja la tasa metabólica de estos orgánulos (p. ej., tamaño de la fuerza protón-motriz, relación $NADH/NAD^+$), las células han desarrollado sistemas que detectan ROS, como los factores de transcripción ROS/redox, para detectar el estado metabólico de estos orgánulos y responder de acuerdo al mismo, por ejemplo mediante el cambio en la velocidad de transcripción de los genes nucleares que codifican proteínas específicas del orgánulo. ■

Los experimentos que usan complejos de la cadena de transporte de electrones purificados establecen la estequiometría del bombeo de protones

Se han identificado los complejos multiproteicos de la cadena de transporte de electrones que son responsables del bombeo de protones mediante extracción selectiva de las membranas mitocondriales con detergentes, aislando cada uno de los complejos en forma casi pura y luego preparando vesículas de fosfolípidos artificiales (liposomas) conteniendo cada complejo. Cuando un donante y aceptor de electrones adecuado se añade a tales liposomas, ocurrirá un cambio en el pH del medio si el complejo embebido transporta protones (Fig. 12-22). Estudios de este tipo indican que la $NADH$ - CoQ reductasa (complejo I) traspasa cuatro protones por cada par de electrones transportados, mientras que la citocromo c oxidasa (complejo IV) traspasa dos protones por cada par de electrones transportados.

La evidencia actual sugiere que un total de 10 protones son transportados desde el espacio de la matriz a través de la membrana mitocondrial interna por cada par de electrones que es transferido desde el $NADH$ hasta el O_2 (véase la Fig. 12-16). Debido a que la succinato- CoQ reductasa (complejo II) no transporta protones y el complejo I es saltado cuando los electrones provienen del succinato derivados del $FADH_2$, solo se transportan seis protones a través de la membrana por cada par de electrones que son transferidos desde este $FADH_2$ hasta el O_2 .

La fuerza protón-motriz en las mitocondrias se debe en gran parte a un gradiente de voltaje a través de la membrana mitocondrial interna

El principal resultado de la cadena de transporte de electrones es la generación de la fuerza protón-motriz (pmf), que es la suma de un gradiente transmembrana de concentración de protones (pH) y de un gradiente de voltaje o potencial eléctrico, a través de la membrana mitocondrial interna. La contribución relativa de los dos componentes del pmf total se ha determinado experimentalmente y de-

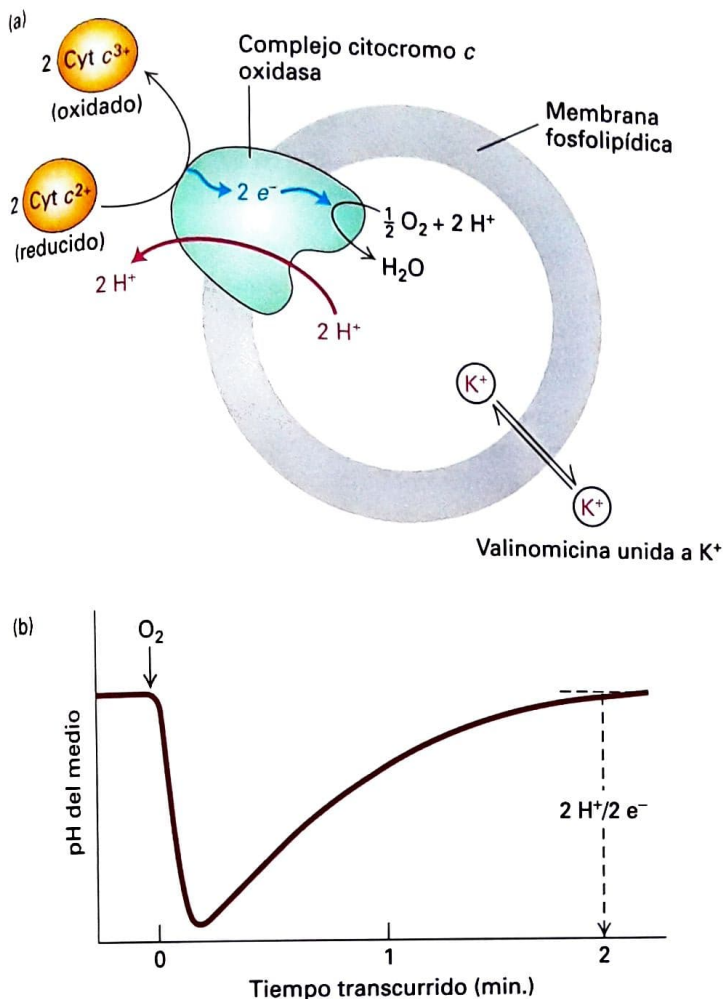


FIGURA EXPERIMENTAL 12-22 La transferencia de electrones desde el citocromo c reducido hasta el O_2 a través de la citocromo c oxidasa (complejo IV), está acoplada al transporte de protones. El complejo oxidasa es incorporado dentro de liposomas con los sitios de unión para el citocromo c posicionado sobre la superficie externa. (a) Cuando se añade el O_2 y el citocromo c reducido, los electrones son transferidos al O_2 para formar H_2O y los protones son transportados desde el medio interno de las vesículas al exterior. Un fármaco llamado valinomicina se añadió al medio para disipar el gradiente de voltaje generado por la translocación de H^+ , que de otra manera podría reducir el número de protones movidos a través de la membrana. (b) El seguimiento del pH del medio revela una caída abrupta en el pH a continuación del agregado de O_2 . A medida que el citocromo c reducido se oxida por completo, los protones se filtran de nuevo al interior de las vesículas y el pH del medio regresa a su valor inicial. Las mediciones muestran que dos protones son transportados por átomo de O_2 reducido. Se necesitan dos electrones para reducir un átomo de O , pero el citocromo c transfiere solo un electrón; por ende, se oxidan dos moléculas de Cyt c^{2+} por cada O reducido.

(Adaptado de B. Reynafarje y cols, 1986, *J. Biol. Chem.* **261**:8 254).

de cargas iguales) también harían cortocircuito a la formación del gradiente de voltaje. En efecto, la membrana mitocondrial interna es poco permeable a otros iones. Así el bombeo de protones genera un gradiente de voltaje que torna energéticamente dificultoso que protones adicionales se muevan a través, debido a la repulsión de carga. En consecuencia, el bombeo de protones por la cadena de transporte de electrones establece un gradiente de voltaje fuerte en el contexto de un gradiente de pH más bien pequeño.

Debido a que las mitocondrias son mucho más pequeñas para ser atravesadas con electrodos, el potencial eléctrico y el gradiente de pH a través de la membrana mitocondrial interna no se puede medir directamente. Sin embargo, el potencial eléctrico se puede medir directamente por adición de iones $^{42}K^+$ y trazas de valinomicina a una suspensión de mitocondrias que respiran y medir la cantidad de radioactividad que se acumula en la matriz. Aunque la membrana interna normalmente es impermeable a los K^+ , la valinomicina es un ionóforo, una molécula pequeña liposoluble que se une selectivamente a un ion específico (en este caso K^+) y lo transporta a través de la membrana de otro modo impermeable. En presencia de valinomicina, el $^{42}K^+$ se equilibra a través de la membrana interna de las mitocondrias aisladas de acuerdo con el potencial eléctrico: cuanto más negativo es el lado de la matriz de la membrana, más $^{42}K^+$ serán atraídos hacia él y se acumularán en la matriz.

En el equilibrio, la concentración medida de iones K^+ radioactivos en la matriz, $[K_{\text{dentro}}]$, es alrededor de 500 veces más grande que en el medio circundante, $[K_{\text{fuera}}]$. La sustitución de este valor en la ecuación de Nernst (Cap. 11) muestra que el potencial eléctrico E (en mV) a través de la membrana interna en la respiración mitocondrial es -160 mV, con la matriz (dentro) negativa

$$E = -59 \log \frac{[K_{\text{dentro}}]}{[K_{\text{fuera}}]} = -59 \log 500 = -160 \text{ mV}$$

Los investigadores pueden medir el pH de la matriz (dentro) capturando vesículas formadas a partir de la membrana mitocondrial interna con colorantes fluorescentes sensibles al pH en su interior, con el lado de la matriz de la membrana mirando hacia el interior. También se puede medir el pH por fuera de las vesículas (equivalente al espacio intermembrana) y así determinar el gradiente de pH (ΔpH), que resulta ser ~ 1 unidad de pH. Debido a que una diferencia de una unidad de pH representa una diferencia de diez veces en la concentración de H^+ , de acuerdo con la ecuación de Nernst un gradiente de pH de una unidad a través de una membrana es equivalente a un potencial eléctrico de 59 mV a 20 °C. Así, conociendo los gradientes de voltaje y pH, se puede calcular la fuerza protón-motriz (pmf) como

$$pmf = \psi - \left(\frac{RT}{F} \times \Delta pH \right) = \psi - 59 \Delta pH$$

donde R es la constante de gases de 1,987 cal/(grado $\cdot$ mol), T es la temperatura (en grados Kelvin), F es la constante de Faraday [23,062 cal/(V $\cdot$ mol)], ψ es el potencial eléctrico transmembrana y pmf se mide en milivoltios. El potencial eléctrico ψ a través de la membrana interna es -160 mV (negativo dentro de la matriz) y es equivalente a ~ 60 mV. Así, el pmf total es -220 mV, con el potencial eléctrico transmembrana responsable de alrededor del 73% del total.

Pende de la permeabilidad de la membrana a los iones diferentes al H^+ . Un gradiente de voltaje significativo puede desarrollarse solo si la membrana es poco permeable a otros cationes y aniones. De otra manera, los aniones podrían fugarse a través de la matriz hasta el espacio intermembrana junto con los protones y evitar la formación de un gradiente de voltaje. De modo similar, los cationes que se fugan a través del espacio intermembrana hasta la matriz (intercambio

CONCEPTOS CLAVES de la Sección 12.3

Cadena de transporte de electrones y generación de la fuerza protón-motriz

- Hacia el final del ciclo del ácido cítrico (etapa II), mucha de la energía originalmente presente en los enlaces covalentes de la glucosa y los ácidos grasos es convertida a electrones de alta energía en las coenzimas reducidas NADH y FADH_2 . La energía de estos electrones se utiliza para generar la fuerza protón-motriz.
- En las mitocondrias, la fuerza protón-motriz es generada por acoplamiento del flujo electrónico (del NADH y FADH_2 hasta el O_2) a un transporte cuesta arriba de protones desde la matriz a través de la membrana interna hasta el espacio intermembrana. Este proceso junto con la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i dirigida por la fuerza protón-motriz se denomina fosforilación oxidativa.
- A medida que los electrones fluyen desde el FADH_2 y el NADH hasta el O_2 , pasan a través de muchos complejos. Los cuatro complejos principales son la NADH-CoQ reductasa (complejo I), la succinato-CoQ reductasa (complejo II), la CoQH_2 -citocromo *c* reductasa (complejo III) y la citocromo *c* oxidasa (complejo IV) (véase la Fig. 12-16).
- Cada complejo contiene uno o más grupos prostéticos que llevan electrones: los grupos hierro-azufre, las flavinas, los grupos hemo y los iones de cobre (véase el Cuadro 12-2). El citocromo *c*, que contiene hemo y la coenzima Q (CoQ), una molécula pequeña liposoluble, son transportadores móviles que transfieren electrones entre los complejos.
- Los complejos I, III y IV bombean protones desde la matriz hacia el espacio intermembrana. Los complejos I y II reducen la CoQ a CoQH_2 , que transporta protones y electrones de alta energía hasta el complejo III. El hemo de la proteína citocromo *c* transporta electrones desde el complejo III hasta el complejo IV, que los utilizan para bombear protones y reducir el oxígeno molecular a agua.
- Los electrones de alta energía del NADH entran a la cadena de transporte de electrones a través del complejo I, mientras que los electrones de alta energía del FADH_2 (derivados del succinato en el ciclo del ácido cítrico) entran a la cadena de transporte de electrones a través del complejo II. Electrones adicionales derivados del FADH_2 por el paso inicial de la β -oxidación del acil-CoA graso incrementan el suministro de CoQH_2 disponible para el transporte de electrones.
- El ciclo Q permite que cuatro protones sean transferidos por cada par de electrones que se mueven a través del complejo III (véase la Fig. 12-18).
- Cada transportador de electrones en la cadena acepta un electrón o par de electrones de un transportador con un potencial de reducción menos positivo y transfiere el electrón a un transportador con un potencial de reducción más positivo. Así, los potenciales de reducción de los transportadores de electrones favorecen la unidireccionalidad “cuesta abajo” del flujo de electrones desde el NADH y el FADH_2 hasta el O_2 (véase la Fig. 12-19).
- Dentro de la membrana interna, los complejos de transporte de electrones se ensamblan para formar supercomplejos que se mantienen juntos mediante la cardiolipina, un fosfolípido especializado. La formación de supercomplejos puede incrementar la velocidad y la eficiencia de generación de la fuerza protón-motriz.

- Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son subproductos citotóxicos de la cadena de transporte de electrones que pueden modificar y dañar proteínas, DNA y lípidos. Enzimas específicas (p. ej., glutatión peroxidasa, catalasa) y pequeñas moléculas antioxidantes (p. ej., vitamina E) ayudan a proteger contra el daño inducido por ROS (véase la Fig. 12-21). Las ROS también se puede utilizar como moléculas de señalización intracelular.
- Un total de 10 iones H^+ son transferidos desde la matriz a través de la membrana interna por par de electrones que fluyen desde el NADH hasta el O_2 (véase la Fig. 12-16), mientras que 6 iones H^+ son transferidos por par de electrones que fluyen desde el FADH_2 hasta el O_2 .
- La fuerza protón-motriz se debe en gran parte a un gradiente de voltaje a través de la membrana interna producido por el bombeo de protones; el gradiente de pH cumple una función cuantitativamente menos importante.

12.4 Aprovechamiento de la fuerza protón-motriz para sintetizar ATP

La hipótesis de que una fuerza protón-motriz a través de la membrana mitocondrial interna es la fuente inmediata de energía para la síntesis de ATP fue propuesta en 1961 por Peter Mitchell. Virtualmente todos los investigadores que estudiaban la fosforilación oxidativa y la fotosíntesis inicialmente rechazaron esta *hipótesis quimiosmótica*. Ellos estaban a favor de un mecanismo similar a la entonces bien estudiada fosforilación a nivel de sustrato en la glucólisis, en la cual la transformación química de una molécula de sustrato (en el caso de la glucólisis, fosfoenolpiruvato) está directamente acoplada con la síntesis de ATP. A pesar de los intensos esfuerzos por un gran número de investigadores, sin embargo, la recolección de evidencia por tal mecanismo mediado por la fosforilación a nivel de sustrato nunca fue observada.

La evidencia definitiva que avalaba la hipótesis de Mitchell dependió del desarrollo de técnicas para purificar y reconstruir las membranas de orgánulos y proteínas de membrana. El experimento con vesículas formadas a partir de membranas de tilacoides de cloroplastos (equivalente a la membrana interna de la mitocondria) conteniendo ATP sintasa, esquemática en la Figura 12-23, fue uno de los varios que demostraron que esta proteína es una enzima generadora de ATP y que esa generación de ATP es dependiente del movimiento de protones y del gradiente electroquímico. Resulta que los protones efectivamente se mueven a través de la ATP sintasa a medida que atraviesan la membrana.

Como se verá, la ATP sintasa es un complejo multiproteína que puede ser subdividido en dos subcompartimientos llamados F_0 (que contiene las proteínas transmembranas del complejo) y F_1 (que contiene las porciones globulares del complejo que se ubica por encima de la membrana y apunta hacia el espacio de la matriz en las mitocondrias). Por lo tanto, la ATP sintasa también suele denominarse **complejo F_0F_1** ; utilizaremos estos términos de modo indistinto.

El mecanismo de la síntesis de ATP es compartido entre las bacterias, las mitocondrias y los cloroplastos

Aunque las bacterias carecen de membranas internas, las bacterias aerobias no obstante llevan a cabo fosforilación oxidativa mediante

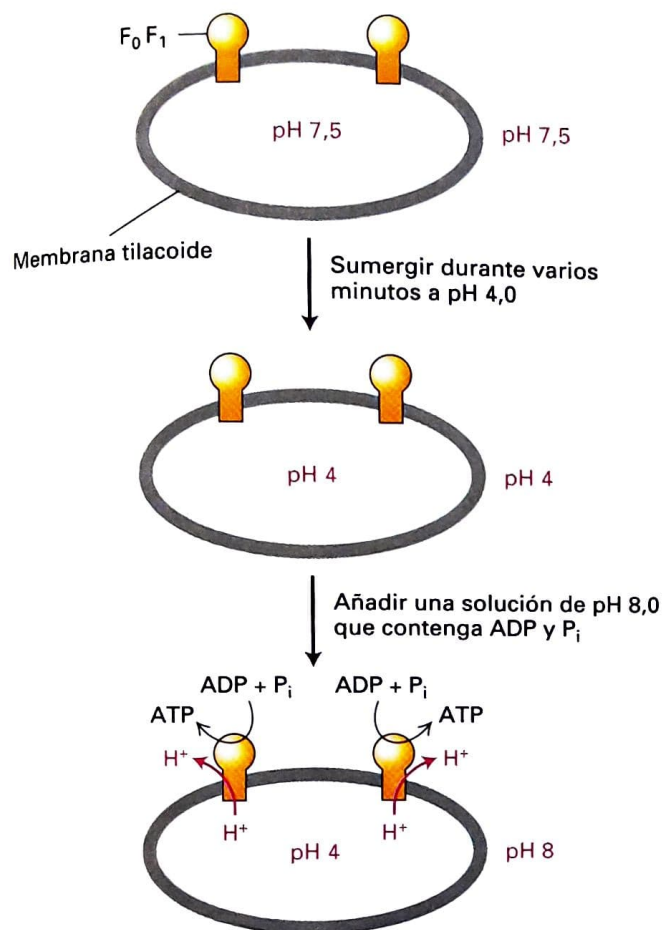


FIGURA EXPERIMENTAL 12-23 La síntesis de ATP por la ATP sintasa depende de un gradiente de pH a través de la membrana. Las vesículas de tilacoide de cloroplasto aislado conteniendo ATP sintasa (partículas F_0F_1) se equilibraron en oscuridad con una solución amortiguadora a pH 4,0. Cuando el pH en el lumen tilacoide se convirtió en 4,0, las vesículas se mezclaron rápidamente con una solución a pH 8,0 conteniendo ADP y P_i . Un pulso de síntesis de ATP acompañó el movimiento transmembrana de protones conducido por un gradiente de concentración H^+ 10 000 veces superior ($10^{-4} M$ versus $10^{-8} M$). En experimentos similares "interior-exterior" usando preparaciones de vesículas de membranas mitocondriales, un experimento de potencial eléctrico de membrana generado artificialmente también da como resultado la síntesis de ATP.

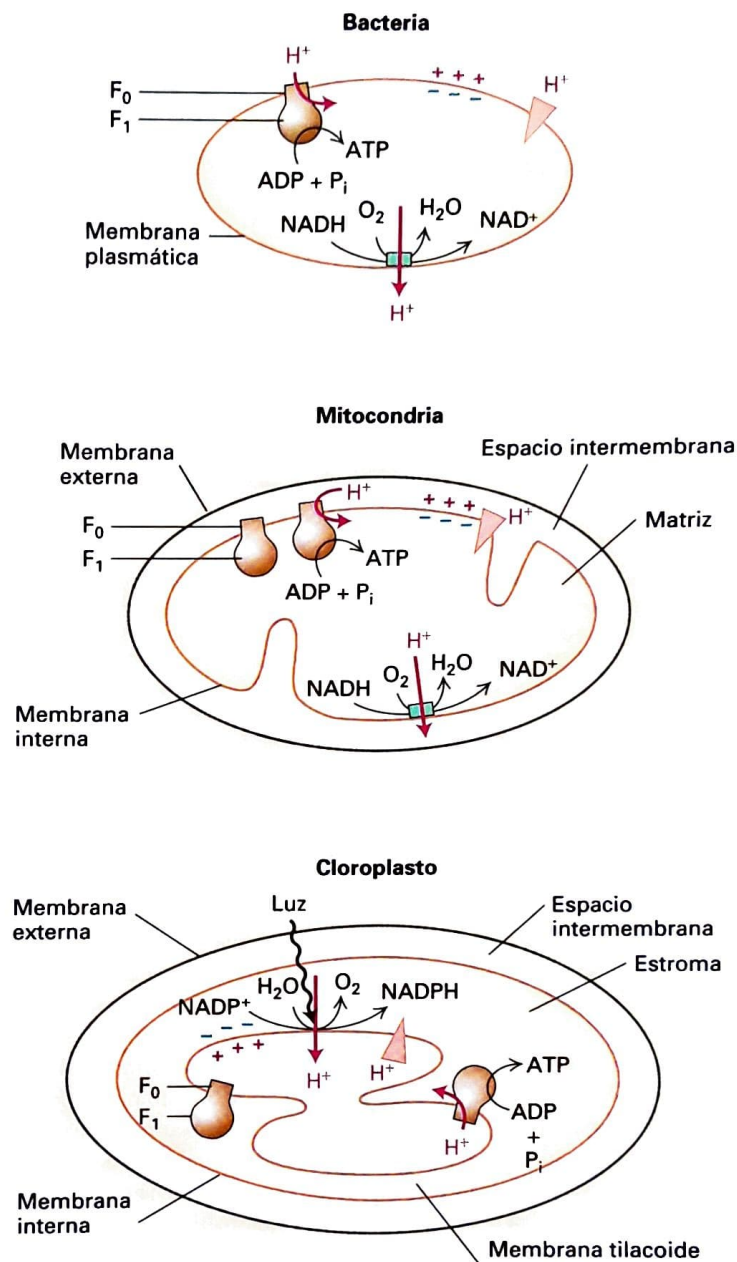


FIGURA 12-24 La síntesis de ATP por quimiosmosis es similar en las bacterias, en los cloroplastos y en las mitocondrias. En quimiosmosis, una fuerza protón-motriz generada por el bombeo de protones a través de la membrana se utiliza para impulsar la síntesis de ATP. El mecanismo y la orientación de la membrana del proceso son similares en las bacterias, en las mitocondrias y en los cloroplastos. En cada ilustración, la superficie de la membrana orientada hacia una zona sombreada constituye el lado citoplasmático; la superficie orientada hacia una zona blanca sin sombras, representa una cara exoplasmática. Nótese que la cara citosólica de la membrana plasmática bacteriana, la cara de la matriz de la membrana mitocondrial interna y la cara estromal de la membrana tilacoide, son todas equivalentes. Durante el transporte de electrones, los protones siempre son bombeados desde el lado citosólico hacia el lado exoplasmático, creando un gradiente de concentración de protones (lado exoplasmático > lado citosólico) y un potencial eléctrico (lado citosólico negativo y un lado exoplasmático positivo) a través de la membrana. Durante la síntesis de ATP, los protones fluyen en la dirección inversa (a favor de sus gradientes electroquímicos) a través de la ATP sintasa (complejo F_0F_1), que sobresale en una protuberancia en la cara citosólica en todos los casos.

el mismo proceso que se produce en las mitocondrias y los cloroplastos eucariontes (Fig. 12-24). Las enzimas que catalizan la reacción de ambas vías glucolíticas y el ciclo del ácido cítrico están presentes en las bacterias; las enzimas que oxidan el NADH a NAD^+ y transfieren los electrones al último aceptor O_2 residen en la membrana plasmática bacteriana. El movimiento de los electrones a través de estos transportadores de membranas está acoplado al bombeo de protones fuera de la célula. El movimiento de los protones de regreso a la célula, a favor de su gradiente de concentración a través de la ATP sintasa, conduce la síntesis de ATP. La ATP sintasa bacteriana (complejo F_0F_1) es esencialmente idéntica en estructura y función a las ATP sintasas de mitocondrias y cloroplastos, pero es más simple de purificar y estudiar.

¿Por qué se comparte el mecanismo de síntesis de ATP entre organismos procariontes y orgánulos eucariontes? Las bacterias aerobias primitivas probablemente fueron los progenitores tanto de las mitocondrias como de los cloroplastos en las células eucariontes (Fig. 12-25). De acuer-

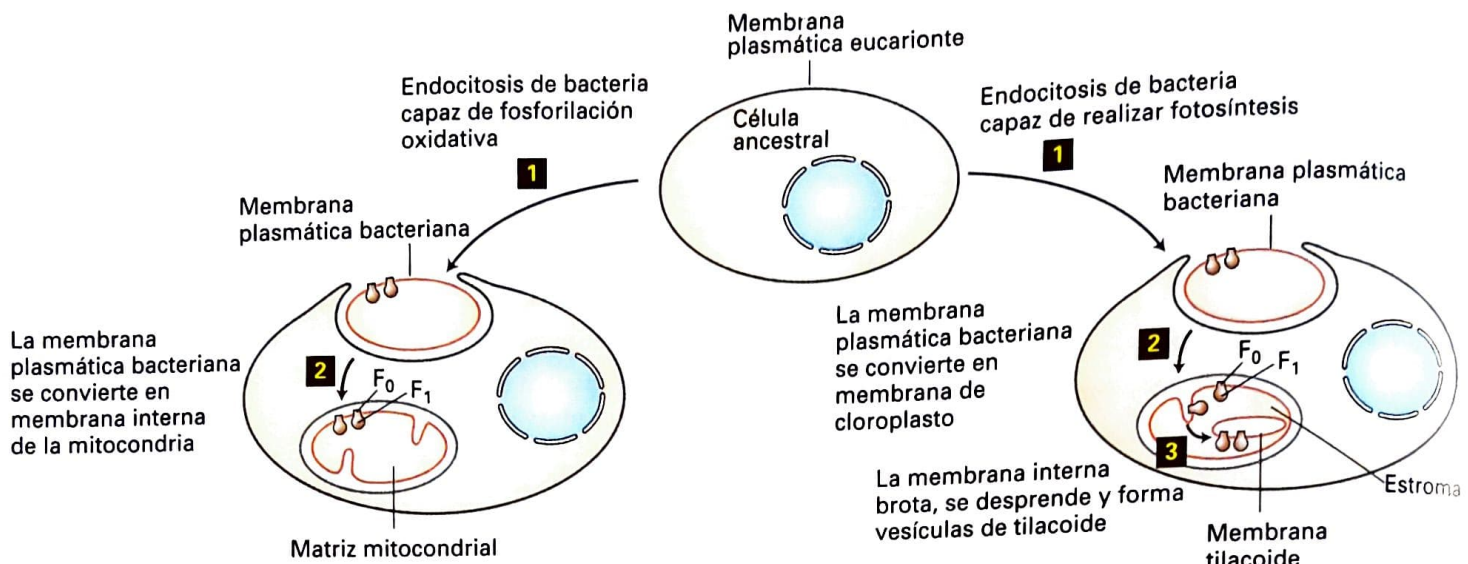


FIGURA 12-25 La hipótesis endosimbiótica para el origen evolutivo de las mitocondrias y los cloroplastos.

La endocitosis de una bacteria por una célula eucarionte ancestral (paso 1) podría generar un orgánulo con dos membranas: la membrana externa derivada de la membrana plasmática eucarionte y la interna a partir de una membrana bacteriana (paso 2). La subunidad F_1 de la ATP sintasa, localizada sobre el lado citosólico de la membrana bacteriana, podría entonces orientarse hacia la

matriz de la mitocondria en evolución (izquierda) o del cloroplasto (derecha). La formación de vesículas a partir de la membrana interna de cloroplastos en las plantas actuales, generaría las membranas tilacoides con la subunidad F_1 permaneciendo sobre el lado citosólico hacia el estroma del cloroplasto (paso 3). Las superficies de la membrana orientadas hacia una zona sombreada constituyen las caras citosólicas; las superficies que se orientan hacia una zona blanca son las caras exoplasmáticas.

do con esta *hipótesis endosimbiótica*, la membrana mitocondrial interna podría derivar de la membrana plasmática bacteriana con su lado citosólico apuntando hacia lo que se convirtió en el espacio de la matriz de la mitocondria. De manera similar, en las plantas la membrana plasmática progenitora se convirtió en la membrana tilacoide de los cloroplastos y su lado citosólico apuntó hacia lo que se convirtió en el espacio estromal del cloroplasto. En todos los casos, la ATP sintasa está posicionada con el dominio F_1 globular (que cataliza la síntesis de ATP) en el lado citosólico de la membrana, de manera tal que el ATP siempre se forma en el lado citosólico de la membrana (véase la Fig. 12-24). Los protones siempre fluyen a través de la ATP sintasa desde el lado exoplasmático hacia el lado citoplasmático de la membrana. Este flujo es conducido por la fuerza protón-motriz. Invariablemente, el lado citosólico tiene un potencial eléctrico negativo en relación con el lado exoplasmático.

Además de la síntesis de ATP, la fuerza protón-motriz a través de la membrana plasmática bacteriana se utiliza para impulsar otros procesos, incluyendo la captación de nutrientes como azúcares (utilizando los simportadores protón/azúcar) y la rotación del flagelo bacteriano. El acoplamiento quimiosmótico ilustra así un principio importante introducido en nuestro análisis de transporte activo en el Capítulo 11: *el potencial de membrana, los gradientes de concentración de protones (y otros iones) a través de la membrana y los enlaces fosfoanhídridos en el ATP, son formas equivalentes e interconvertibles de la energía potencial química*. En efecto, la síntesis de ATP a través de la ATP sintasa puede pensarse como un transporte activo marcha atrás.

La ATP sintasa incluye los complejos multiproteicos F_0 y F_1

Con la aceptación general del mecanismo quimiosmótico de Mitchell, los investigadores pusieron su atención en la estructura y el funcionamiento de la ATP sintasa. El complejo tiene dos componentes prin-

cipales, F_0 y F_1 , ambos de los cuales son proteínas multiméricas (Fig. 12-26a). El componente F_0 contiene tres tipos de proteínas integrales de membrana, designadas *a*, *b* y *c*. En las bacterias y las mitocondrias de levaduras la estequiometría más común de las subunidades es $a_1 b_2 c_{10}$, pero los complejos F_0 en las mitocondrias de animales tienen 12 subunidades *c* y las de cloroplastos tienen 14. En todos los casos las subunidades *c* forman un anillo con forma de rosquilla ("anillo *c*") en el plano de la membrana. La subunidad *a* y las dos *b* están rígidamente unidas una con otra pero no con el anillo *c*, una característica crucial de la proteína que trataremos brevemente.

La porción F_1 es un complejo soluble en agua de cinco polipéptidos distintos con la composición $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$, que normalmente está unida firmemente al subcomplejo F_0 en la superficie de la membrana. El extremo más inferior de la subunidad γ en forma de varilla del subcomplejo F_1 es una espiral enrollada que ajusta en el centro del anillo de la subunidad *c* de F_0 y parece unirse rígidamente a él. Así, cuando el anillo de subunidad *c* rota, la subunidad γ con forma de varilla se mueve con él. La subunidad ϵ de F_1 está rígidamente unida a γ y también forma contactos estrechos con varias de las subunidades *c* de F_0 . Las subunidades α y β son responsables de la forma globular general del subcomplejo F_1 y se asocian en orden alternante para formar un hexámero, $\alpha_3\beta_3$, o $(\alpha\beta)_3$, que descansa en la cima de la única subunidad γ larga. La subunidad $F_1\delta$ está permanentemente unida a la subunidad *b* de F_0 . Por lo tanto, las subunidades F_0a y b y la subunidad δ y el hexámero $(\alpha\beta)_3$ del complejo F_0 forman una estructura rígida anclada en la membrana. Las subunidades *b* con forma de varilla forman también podría traducirse como: la "parte estática" que evita que el hexámero $(\alpha\beta)_3$ se mueva mientras descansa sobre la subunidad γ , cuya rotación junto con las subunidades *c* de F_0 cumplen un papel esencial en el mecanismo de la ATP sintasa que se describe a continuación.

Cuando la ATP sintasa está embebida en una membrana, el componente F_1 forma una perilla que sobresale de la cara citosólica (en la mitocondria es la matriz). Debido a que F_1 separado de la membrana es capaz de catalizar la hidrólisis (conversión de ATP a ADP más P_i) en

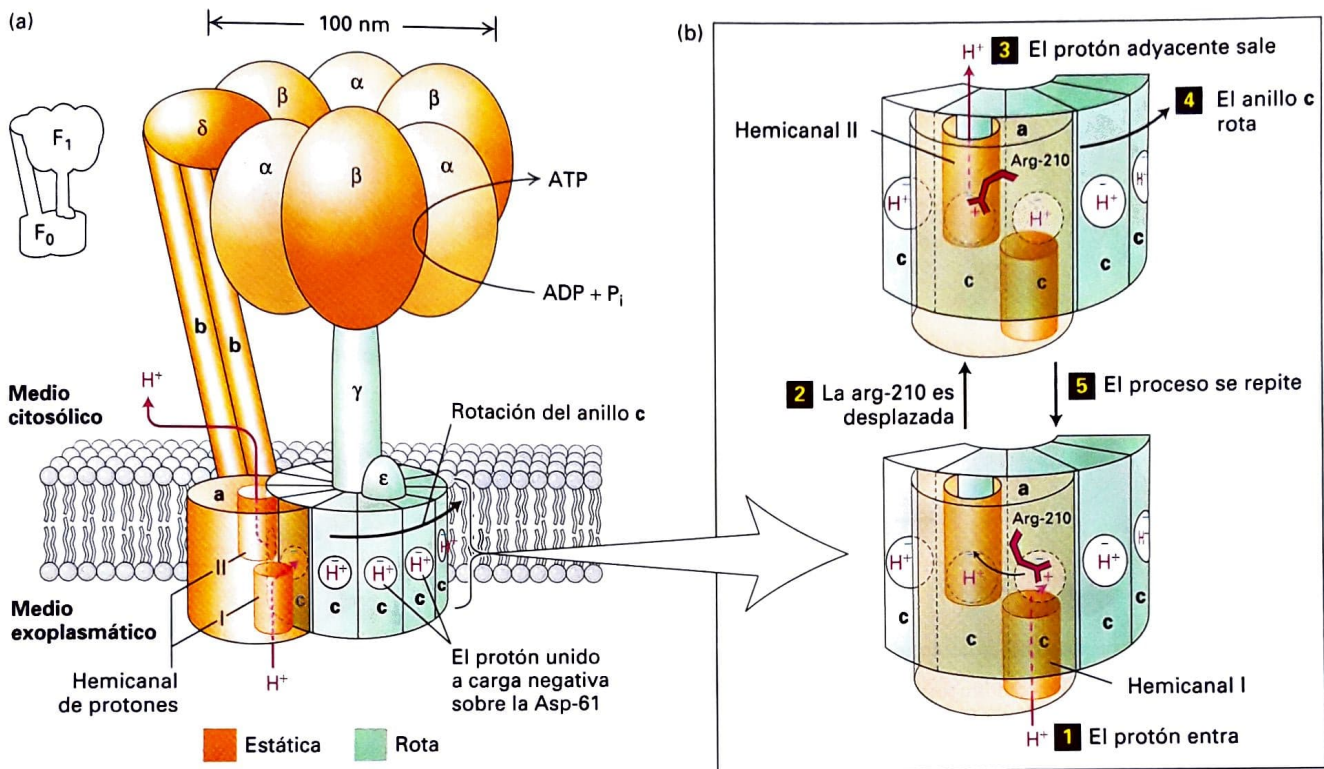


FIGURA 12-26 Estructura de la ATP sintasa (complejo F_0F_1) en la membrana plasmática bacteriana y mecanismos de translocación de protones a través de la membrana. (a) La porción F_0 embebida en la membrana de la ATP sintasa está formada por tres proteínas integrales de membrana: una copia de **a**, dos copias de **b** y un promedio de 10 copias de **c** dispuestas en un anillo en el plano de la membrana. Dos hemicanales de protones en la subunidad **a** median el movimiento de protones a través de la membrana (vía de protones indicada por flechas rojas). Los hemicanales permiten a los protones moverse uno por vez desde el medio exoplasmático hacia la cadena lateral del Asp-61, cargada negativamente en el centro de una subunidad **c** cerca del centro de la membrana. El sitio de unión al protón en cada subunidad **c** está representado como círculo blanco con una "-" azul, que constituye la carga negativa sobre la cadena lateral del Asp-61. El hemicanal II permite a los protones moverse desde el Asp-61 de la subunidad **c** adyacente hasta el medio citosólico. La porción F_1 de la ATP sintasa contiene tres copias de cada subunidad α y β , que forman un hexámero que se apoya por encima de la subunidad γ con forma de barra, la cual se inserta dentro del anillo **c** de la F_0 . La subunidad ϵ está adherida rígidamente a la subunidad γ y también a varias subunidades **c**. La subunidad δ unida de forma permanente a una de las subunidades **a** en el complejo F_1 , a la subunidad **b** de F_0 . Así, las subunidades

F_0 **a** y **b** y la subunidad δ y el hexámero ($\alpha\beta$)₃ forman una estructura rígida anclada en la membrana (anaranjado). Durante el flujo de protones, el anillo **c** y las subunidades ϵ y γ de F_1 rotan como una unidad (verde), provocando cambios conformacionales en las subunidades β de F_1 , llevando a la síntesis de ATP. (b) Mecanismo potencial de la translocación de protones. Paso **1**: un protón del espacio exoplasmático entra al hemicanal I y se mueve hacia el sitio de unión al protón del Asp-61 (desprotonado) "vacío". La carga negativa (azul "-") sobre la cadena lateral desprotonada del Asp-61 está equilibrada, en parte, por una carga positiva sobre la cadena lateral del Arg-210 (rojo "+"). Paso **2**: El protón llena el sitio de unión al protón y simultáneamente desplaza la cadena lateral de la Arg-210, la cual se balancea sobre el sitio de unión al protón lleno sobre la subunidad **c** adyacente. Como consecuencia de la unión, el protón unido en el sitio adyacente es desplazado. Paso **3**: el protón adyacente desplazado se mueve a través del hemicanal II y es liberado al espacio citosólico, dejando el sitio de unión al protón vacío en la Asp-61. Paso **4**: La rotación en contra de las agujas del reloj del anillo **c** completo mueve la subunidad **c** "vacía" sobre el hemicanal. Paso **5**: se repite el proceso. (Adaptado de M. J. Schnitzer, 2001, *Nature* **410**:878; P. D. Boyer, 1999, *Nature* **402**:247; y C. von Ballmoos, A. Wiedenmann, y P. Dimroth, 2009, *Ann. Rev. Biochem.* **78**:649-672).

la ausencia del componente F_0 , se lo denominó ATPasa F_1 ; sin embargo, su función en las células es la inversa, para sintetizar ATP. La hidrólisis de ATP es un proceso espontáneo ($\Delta G < 0$); así, la energía es necesaria para conducir la ATPasa "marcha atrás" y generar ATP.

La rotación de la subunidad F_1 γ conduce el movimiento de protones a través de F_0 , impulsando la síntesis de ATP

Cada una de las tres subunidades β en la porción globular F_1 del complejo F_0F_1 completo puede unir ADP y P_i y catalizar la síntesis endergónica

de ATP cuando está acoplada al flujo de protones desde el medio exoplasmático (espacio intermembrana en la mitocondria) hacia el medio citosólico (matriz). Sin embargo, el acoplamiento entre el flujo de protones y la síntesis de ATP no debe ocurrir en las mismas regiones de la proteína, debido a que los sitios de unión a nucleótidos sobre las subunidades β de F_1 (donde se produce la síntesis de ATP) están a 9-10 nm de la superficie de la membrana mitocondrial. El modelo más ampliamente aceptado para la síntesis de ATP por parte del complejo F_0F_1 (*mecanismo de unión-cambio*) postula solo un acoplamiento indirecto (Fig. 12-27).

De acuerdo con este mecanismo, la energía liberada por el movimiento "cuesta abajo" de protones a través de F_0 impulsa directamen-

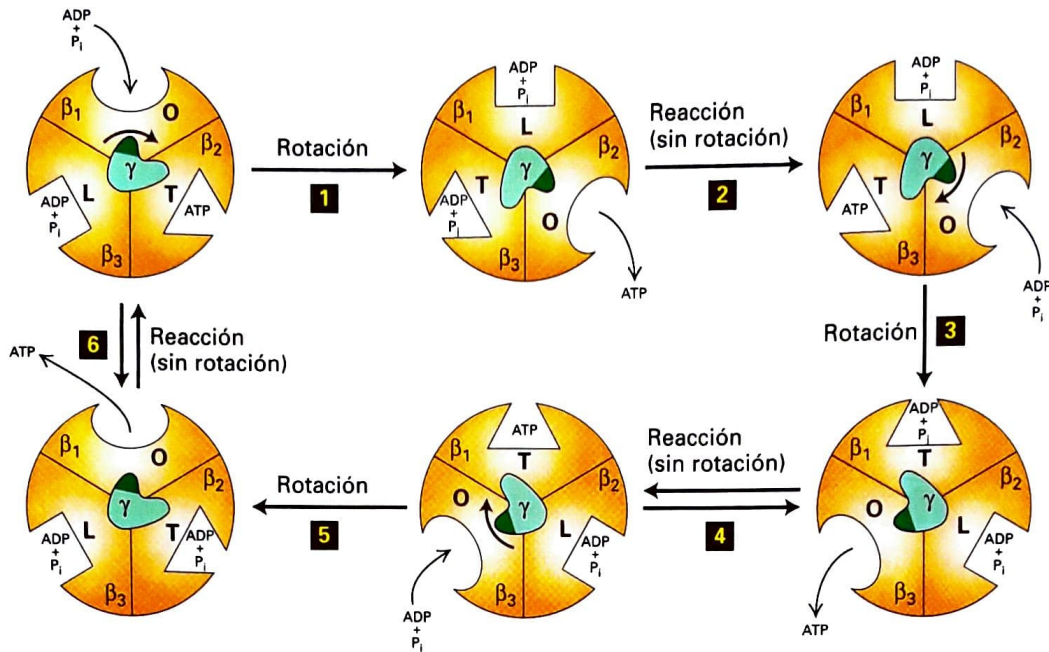


FIGURA 12-27 Mecanismo de unión-cambio de la síntesis del ATP a partir de ADP y P_i . En esta vista se visualiza a F_1 desde la superficie de la membrana (véase la Figura 12-26). A medida que la subunidad γ rota 120° en el centro, cada una de las subunidades β , idénticas alternan entre tres estados conformacionales (O, conformación abierta, representada como óvalo en el sitio de unión; L, laxa con un rectángulo en el sitio de unión; T, ajustada con un triángulo en el sitio de unión), los cuales difieren en sus afinidades por el ATP, el ADP y el P_i . El ciclo comienza (arriba a la izquierda) cuando el ADP y el P_i se unen laxamente a una de las tres subunidades β (aquí, designada arbitrariamente β_1), cuyo sitio de unión al nucleótido se encuentra en la conformación abierta (O). El flujo de protones a través de la porción F_0 de la proteína impulsa una rotación de 120° de la subunidad γ (relativa a las subunidades β fijas) (paso 1). Esto provoca la rotación de la subunidad γ , que es asimétrica, para empujarla de manera diferencial contra las subunidades β , dando como resultado un cambio conformacional y un aumento en la afinidad de unión de la subunidad β para el ADP y el P_i (de O $\rightarrow$ L), un incremento en

la afinidad de unión de la subunidad β_3 por el ADP y el P_i que previamente se unieron (de L $\rightarrow$ T), y una disminución en la afinidad de unión de la subunidad β_2 por un ATP previamente unido (de T $\rightarrow$ O), provocando la liberación del ATP unido. Paso 2: sin rotación adicional del ADP y el P_i en el sitio T (aquí la subunidad β_3) se forma ATP, una reacción que no requiere una entrada adicional de energía debido al ambiente especial en el sitio activo del estado T. Al mismo tiempo, un nuevo ADP y un P_i se unen al sitio de O no ocupado en β_2 . Paso 3: El flujo de protones impulsa otra rotación de 120° de la subunidad γ , con los consiguientes cambios conformacionales en los sitios de unión (L $\rightarrow$ T, O $\rightarrow$ L, T $\rightarrow$ O) y la liberación del ATP desde la β_3 . Paso 4: sin rotación adicional el ADP y el P_i en el sitio T de la β_1 forma ATP, y el ADP y el P_i adicional se unen al sitio O desocupado sobre β_3 . El proceso continúa con la rotación (paso 5) y la formación de ATP (paso 6) hasta que se completa el ciclo, con la producción de tres ATP por cada rotación de 360° de γ . (Adaptado de P. Boyer, 1989, *FASEB J.* 3:2 164; Y. Zhou y cols., 1997, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 94:10 583; y M. Yoshida, E. Muneyuki y T. Hisabori, 2001, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:669-677).

te la rotación del anillo de subunidad c junto con sus subunidades γ y ϵ (véase la Fig. 12-26a). La subunidad γ actúa como un eje de rotación no simétrico, cuya rotación dentro del centro del hexámero estático ($\alpha\beta$) de F_1 causa que empujen secuencialmente cada una de las subunidades β y por ende, provoca cambios cíclicos en sus conformaciones entre tres estados diferentes. Como se describe esquemáticamente desde la vista inferior de la estructura globular del hexámero ($\alpha\beta$), en la Figura 12-27, la rotación de la subunidad γ en relación al hexámero ($\alpha\beta$), fijo causa que el sitio de unión a nucleótido de cada una de las subunidades β alterne entre tres estados conformacionales en el siguiente orden:

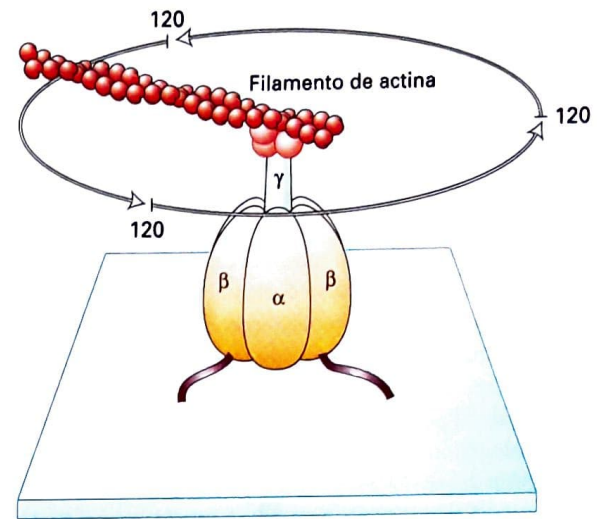
1. Un estado O (abierto) que une ATP de manera muy escasa y ADP y P_i débilmente
2. Un estado L (laxo) que une ADP y P_i más fuertemente, pero no puede unir ATP

3. Un estado T (ajustado) que une ADP y P_i tan fuertemente que de manera espontánea reaccionan y forman ATP

En el estado T, el ATP producido se une tan fuertemente que no puede disociarse de manera rápida del sitio: está atrapado hasta que otra rotación de la subunidad γ retorna esa subunidad β al estado O, liberando por lo tanto ATP y comenzando nuevamente el ciclo. El ATP o el ADP también se unen a sitios regulatorios o alostéricos en las tres subunidades α ; esta unión modifica la velocidad de síntesis de ATP de acuerdo al nivel de ATP y ADP en la matriz, pero no está directamente involucrada en la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i .

Diversos tipos de evidencia avalan el mecanismo de unión-cambio. Primero, los estudios bioquímicos demostraron que una de las tres subunidades β sobre partículas F_1 aisladas puede unir fuertemente ADP y P_i y luego formar ATP, que permanece fuertemente unido. El ΔG medido para esta reacción es casi cero, lo cual indica que una vez que el ADP y el P_i se unen en el estado T de una subunidad β , espontáneamente

FIGURA EXPERIMENTAL 12-28 La subunidad γ del complejo F rota en relación al hexámero ($\alpha\beta$)₃. Los complejos F₁ se diseñaron para que contengan subunidades β con una secuencia adicional His-6, que provoca que las mismas se adhieran a una placa de vidrio recubierta con un metal reactivo que une polihistidina. La subunidad γ en los complejos F₁ diseñados estaba unida a un filamento de actina marcado con fluorescencia. Cuando se los visualizó en un microscopio fluorescente, se notó que los filamentos de actina rotaban en contra de las agujas del reloj en pasos discretos de 120° en presencia de ATP, impulsados por la hidrólisis de ATP por las subunidades β . (Adaptado de H. Noji y cols., 1997, *Nature* **386**:299y R. Yasuda y cols., 1998, *Cell* **93**:117).



forman ATP. Es importante destacar que la disociación del enlace de ATP a partir de la subunidad β sobre las partículas F₁ aisladas se producen de forma extremadamente lenta. Este hallazgo sugiere que la disociación del ATP podría estar impulsada por un cambio conformacional en la subunidad β , que a su vez podría ser causado por el movimiento de protones.

El análisis por cristalografía de rayos X del hexámero ($\alpha\beta$)₃ produce una conclusión notable: aunque las tres subunidades β son idénticas en secuencia y estructura general, los sitios de unión del ADP/ATP tienen conformaciones diferentes en cada subunidad. La conclusión más razonable fue que las tres subunidades β alternan en una reacción dependiente de energía entre tres estados conformacionales (O, L, T), en los cuales los sitios de unión al nucleótido tienen estructuras sustancialmente diferentes.

En otros estudios, los complejos F₀F₁ se trataron con agentes químicos que producen entrecruzamientos que se unen covalentemente a las subunidades γ y ϵ y al anillo de la subunidad c . La observación de que tales complejos tratados podían sintetizar ATP o usar ATP para impulsar el bombeo de protones indica que las proteínas entrecruzadas normalmente rotan juntas.

Finalmente, la rotación de la subunidad γ en relación con el hexámero fijo ($\alpha\beta$)₃, como se propuso en el mecanismo de unión-cambio, se observó directamente en el experimento ingenioso descrito en la Figura 12-28. En una modificación de este experimento en el cual se adherieron partículas de oro diminutas (en lugar de filamentos de actina) a la subunidad γ , se observó una velocidad de rotación de 134 revoluciones por segundo. La hidrólisis de tres ATP, que recuérdese que es la reacción inversa catalizada por la misma enzima, se cree que impulsó una revolución; este resultado está cerca de la velocidad determinada experimentalmente de la hidrólisis de ATP por parte de los complejos F₀F₁: alrededor de 400 ATP por segundo. En experimentos relacionados, se observó rotar a una subunidad γ unida a una subunidad ϵ y a un anillo de subunidades c en relación al hexámero fijo ($\alpha\beta$)₃. La rotación de la subunidad γ en estos experimentos fue impulsada por la hidrólisis de ATP, la inversa del proceso normal, en la cual el movimiento de protones a través del complejo F₀ conduce

la rotación de la subunidad γ . Estas observaciones establecieron que la subunidad γ , junto con el anillo c adherido y la subunidad ϵ efectivamente rotan, impulsando así los cambios conformacionales en las subunidades β que son necesarias para la unión de ADP y P_i, seguido por la síntesis y posterior liberación de ATP.

Múltiples protones deben pasar a través de la ATP sintasa para sintetizar un ATP

Un cálculo simple indica que se necesita el paso de más de un protón para sintetizar una molécula de ATP a partir de ADP y P_i. Aunque el ΔG para esta reacción en condiciones estándares es +7,3 kcal/mol, a las concentraciones de los reactivos en la mitocondria ΔG es probablemente más elevado (+10 a +12 kcal/mol). Se puede calcular la cantidad de energía libre liberada por el paso de 1 mol de protones a favor del gradiente electroquímico de 220 mV (0,22 V) de la ecuación de Nernst, fijando $n = 1$ y midiendo ΔE en volts:

$$\begin{aligned}\Delta G(\text{cal/mol}) &= -nF\Delta E = -(23,062 \text{ cal} \times \text{V}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}) \Delta E \\ &= (23,062 \text{ cal} \times \text{V}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}) (0,22 \text{ V}) \\ &= -5,074 \text{ cal/mol, o } -5,1 \text{ kcal/mol}\end{aligned}$$

Debido a que el movimiento cuesta abajo de 1 mol de protones libera poco más de 5 kcal de energía libre, el paso de al menos dos protones es necesario para la síntesis de cada molécula de ATP a partir de ADP y P_i.

La rotación del anillo c de F₀ es conducida por protones que fluyen a través de los canales transmembrana

Cada copia de subunidad c contiene dos hélices a que atraviesan la membrana que forma una estructura similar a una horquilla. Se cree que un residuo de aspartato, Asp-61 (numeración de la ATPasa de *E. coli*), en el centro de una de estas hélices en cada subunidad cumple una

función clave en el movimiento de protones mediante la unión y liberación de protones a medida que atraviesa la membrana. La modificación química de este aspartato mediante el veneno dicitohexilcarbodiimida o su mutación a alanina bloquea específicamente el movimiento de protones a través de F_0 . De acuerdo a un modelo actual, los protones atraviesan la membrana mediante dos hemicanales escalonados debido a que uno solo se extiende hasta la mitad del recorrido de la membrana (véase Fig. 12-26a y b); el extremo intermembrana de los canales se encuentra al nivel del Asp-61 en la mitad de la membrana. El hemicanal I solo se abre hacia la superficie exoplasmática y el II solo se abre hacia el lado citosólico. Previo a la rotación, cada cadena lateral de carboxilato de Asp-61 en las subunidades c está unida a un protón, excepto la de la subunidad c que está en contacto con el hemicanal I. La carga negativa sobre el carboxilato desprotonado (el sitio "vacío" de unión al protón; véase la Fig. 12-26b, *abajo*) está neutralizada por la interacción con la cadena lateral positivamente cargada de la Arg-210 de la subunidad a. La translocación del protón a través de la membrana comienza cuando un protón del medio exoplasmático se mueve hacia arriba a través del hemicanal I (Fig. 12-26b, paso 1). A medida que el protón se mueve hacia el sitio de unión al protón vacío, desplaza la cadena lateral de la Arg-210, la cual se balancea hacia el sitio de unión al protón lleno de la subunidad c adyacente en contacto con el hemicanal II (paso 2). En consecuencia, la cadena lateral positiva de la Arg-210 desplaza el protón unido al Asp-61 de la subunidad c adyacente. Este protón desplazado ahora está libre para viajar hasta el hemicanal II y salir al medio citosólico (paso 3). Así, cuando un protón que entra del hemicanal I se une al anillo c, un protón diferente se libera hacia el lado opuesto de la membrana a través del hemicanal II. La rotación del anillo c entero debido al movimiento térmico/browniano (paso 3) luego permite que una subunidad c recientemente desprotonada se mueva y se alinee por encima del hemicanal I, a medida que una subunidad c protonada adyacente rota para tomar su lugar debajo del hemicanal II. Luego se repite el ciclo completo (paso 5), a medida que protones adicionales se mueven descendiendo por sus gradiente electroquímicos desde el medio exoplasmático hacia el medio citosólico. Durante cada rotación parcial (360° divididos entre el número de subunidades c en el anillo), la rotación del anillo c está obligada de manera tal que el movimiento neto del anillo solo ocurre en una dirección. La energía conducida por los protones a través de la membrana y por ende la rotación del anillo c, proviene del potencial eléctrico y del gradiente de pH a través de la membrana. Si la dirección del flujo de protones es invertida, lo cual se puede realizar experimentalmente invirtiendo la dirección del gradiente de protones y la fuerza protón-motriz, se invierte la dirección de rotación del anillo c.

Debido a que la subunidad γ de F_1 está estrechamente unida al anillo c de F_0 , la rotación del anillo c asociada con el movimiento de protones causa la rotación de la subunidad γ . De acuerdo al mecanismo de unión-cambio, una rotación de 120° de γ impulsa la síntesis de un ATP (véase la Fig. 12-27). Por lo tanto, la rotación completa del anillo c en 360° podría generar tres ATP. En *E. coli*, donde la composición de F_0 es $a_1b_2c_{10}$, el movimiento de 10 protones conduce una rotación completa y por ende a la síntesis de tres ATP. Este valor es consistente con la información experimental del flujo de protones durante la síntesis de ATP, proporcionando evidencia indirecta para el modelo de acoplamiento del movimiento de protones a la rotación del anillo c descrita en la Figura 12-26. El F_0 de los cloroplastos contiene 14 subunidades c por anillo y el movimiento de 14 protones podría ser necesario para la síntesis de tres ATP. Es incierto por qué

estos complejos F_0F_1 , por lo demás similares, han evolucionado para tener proporciones H^+ :ATP diferentes.

El intercambio ATP-ADP a través de la membrana mitocondrial interna es impulsado por la fuerza protón-motriz

La fuerza protón-motriz se utiliza para impulsar múltiples procesos que necesitan energía en las células. Además de impulsar la síntesis de ATP, la fuerza protón-motriz a través de la membrana mitocondrial interna impulsa el intercambio de ATP formado por fosforilación oxidativa dentro de la mitocondria por ADP y P_i en el citosol. Este intercambio, que es necesario para suministrar los sustratos ADP y P_i para que la fosforilación oxidativa continúe, está mediado por dos proteínas en la membrana interna: un *transportador de fosfato* (HPO_4^{2-} /antiportador OH^-) que media la importación de un HPO_4^{2-} acoplado a la exportación de un OH^- y un *antiportador ATP/ADP* (Fig. 12-29).

El antiportador ATP/ADP permite que una molécula de ADP entre solo si sale simultáneamente un ATP. El antiportador ATP/ADP, un dímero de dos subunidades de 30 000 Da, constituye 10-15% de las proteínas en la membrana interna, de manera tal que es una de las

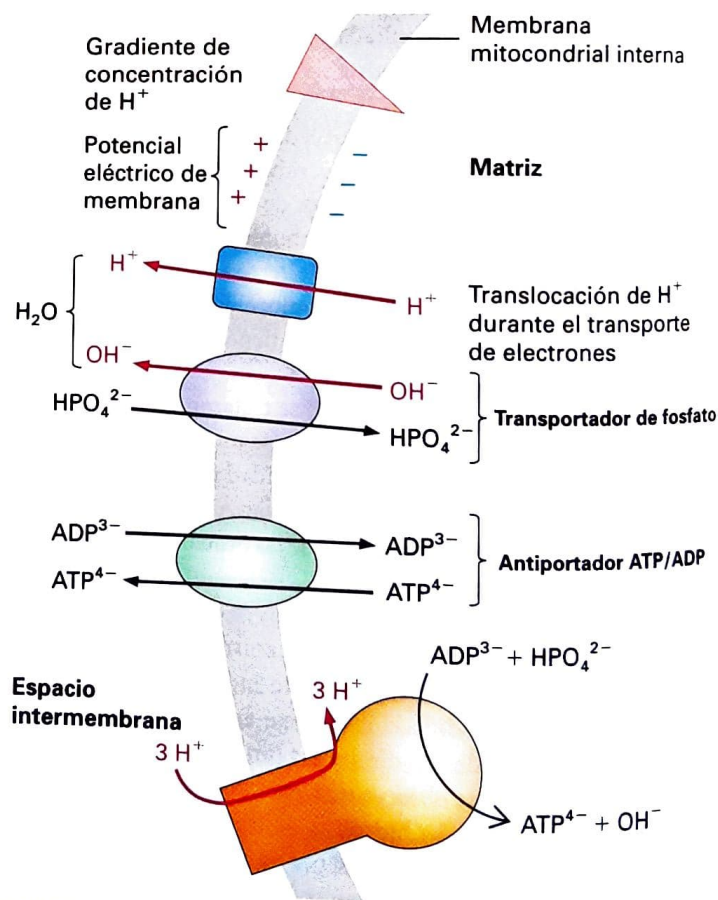


FIGURA 12-29 Sistemas de transporte de fosfato y ATP/ADP en la membrana mitocondrial interna. La acción coordinada de dos antiportadores (púrpura y verde) dan como resultado la captación de un ADP^{3-} y un HPO_4^{2-} en intercambio por un ATP y un hidroxilo, impulsado por la translocación afuera de un protón (mediada por las proteínas de la cadena de transporte de electrones, azul) durante el transporte de electrones. Aquí no se muestra la membrana externa debido a que es permeable a las moléculas menores a 5 000 Da.

proteínas mitocondriales más abundantes. El funcionamiento de dos antiportadores juntos produce un flujo de entrada de un ADP^{3-} y un P_i^{2-} y un flujo de salida de un ATP^{4-} junto con un OH^- . Cada OH^- transportado hacia afuera se combina con un protón, translocado durante el transporte de electrones al espacio intermembrana, para formar H_2O . Esto dirige la reacción global en la dirección de exportación de ATP e importación de ADP y P_i .

Debido a que algunos de los protones translocados fuera de la mitocondria durante el transporte de electrones proporcionan la potencia (por combinación con la exportación de OH^-) para el intercambio ATP-ADP, hay menos protones disponibles para la síntesis de ATP. Se estima que por cada cuatro protones translocados fuera, tres se utilizan para sintetizar una molécula de ATP y uno se utiliza para impulsar la exportación de ATP a partir de la mitocondria en intercambio por ADP y P_i . Este gasto de energía a partir del gradiente de concentración de protones para exportar ATP desde de la mitocondria en intercambio por ADP y P_i , asegura una alta relación de ATP respecto de ADP en el citosol, donde la hidrólisis del enlace fosfoanhídrido de alta energía del ATP se utiliza para impulsar muchas reacciones que requieren energía.



Los estudios de lo que resultó ser la actividad antiportadora ATP/ADP se registraron por primera vez hace alrededor de 2 000 años, cuando Dioscorides (~ AD 40-90) describió una hierba venenosa a partir del cardo *Atractylis gummifera*, que se encontraba comúnmente en la región del Mediterráneo. El mismo agente se encontró en el tradicional remedio multipropósito Zulú a base de hierba *impila* (*Callilepis laureola*). En Zulú *impila* significa “salud”, aunque se ha asociado con numerosos envenenamientos. En 1962 se demostró que el agente activo en la hierba (el atractilósido) inhibe al antiportador ATP/ADP y a la fosforilación oxidativa del ADP extramitocondrial, pero no al ADP intramitocondrial. Esto demostró la importancia del antiportador ATP/ADP y proporcionó una herramienta útil para estudiar el mecanismo por el cual funciona este transportador.

Dioscorides vivió cerca de Tarsus, en aquel momento una provincia de Roma en el sudeste de Asia menor, en lo que actualmente es Turquía. Su *De Materia Medica* de cinco volúmenes “sobre la preparación, las propiedades y las pruebas de fármacos” describió las propiedades medicinales de alrededor de 1 000 productos naturales y 4 740 usos médicos. Durante aproximadamente 1 600 años fue la referencia básica en medicina del norte de Europa hasta el océano Índico, comparable al *vademécum de especialidades farmacéuticas* que se utiliza en Estados Unidos como una guía para el uso de fármacos. ■

La velocidad de oxidación mitocondrial normalmente depende de las concentraciones de ADP

Si mitocondrias intactas aisladas son provistas con NADH (o una fuente de FADH_2 como succinato) más O_2 y P_i , pero no con ADP, la oxidación de NADH y la reducción de O_2 rápidamente cesan, debido a que la cantidad de ADP endógeno se agota por la formación de ATP. Si luego se añade ADP se restaura rápidamente la oxidación de NADH. Por lo tanto, las mitocondrias pueden oxidar FADH_2 y NADH solo en la medida en que exista una fuente de ADP y P_i para generar ATP. Este fenómeno, llamado **control respiratorio**, se produce debido a que la oxidación de NADH y succinato (FADH_2) está obligatoriamente acoplada al transporte de protones a través de la membrana mitocondrial interna. Si la fuerza protón-motriz resultante no se disipa durante la síntesis de

ATP a partir de ADP y P_i (o durante otros procesos que requieren energía), ambos gradientes de concentración de protones transmembrana y el potencial eléctrico de membrana se incrementan hasta concentraciones muy elevadas. En este punto, el bombeo de protones adicionales a través de la membrana interna requiere tanta energía que eventualmente cesa, bloqueando la oxidación de NADH y otros sustratos.

Las mitocondrias de la grasa parda utilizan la fuerza protón-motriz para generar calor

El *tejido de la grasa parda*, cuyo color se debe a la presencia de abundantes mitocondrias, está especializado para la generación de calor. Por el contrario, el *tejido de la grasa blanca* está especializado para el almacenamiento de grasa y contiene relativamente pocas mitocondrias.

La membrana interna de las mitocondrias de la grasa parda contiene **termogenina**, una proteína que funciona como un **desacoplante** natural de la fosforilación oxidativa y la generación de la fuerza protón-motriz. La termogenina, o UCP1, es una de las varias proteínas desacoplares (UCP) que se encuentran en la mayoría de los eucariontes (pero no en las levaduras fermentativas). La termogenina disipa la fuerza protón-motriz al tornar a la membrana mitocondrial interna permeable a los protones. Como consecuencia, la energía liberada por la oxidación del NADH en la cadena de transporte de electrones y utilizada para crear un gradiente de protones no se usa luego para sintetizar ATP a través de la ATP sintasa. En efecto, cuando los protones retornan a la matriz a favor de sus gradientes de concentración a través de la termogenina, la energía se libera como calor. La termogenina es un transportador de protones, no un canal de protones y envía a los protones a través de la membrana a una velocidad que es un millón de veces más lenta que la de los canales de iones típicos (véase la Fig. 11-2). La termogenina es similar en secuencia al transportador ATP/ADP mitocondrial, como muchas otras proteínas transportadoras mitocondriales que componen la familia de transportadores de ATP/ADP. Ciertos venenos que son moléculas pequeñas también funcionan como desacoplares al tornar la membrana mitocondrial interna permeable a los protones. Un ejemplo es el químico soluble en lípidos 2,4-dinitrofenol (DNP), que se puede unir reversiblemente y liberar protones y transportarlos a través de la membrana desde el espacio intermembrana hasta la matriz.

Las condiciones ambientales regulan la cantidad de termogenina en las mitocondrias de la grasa parda. Por ejemplo, durante la adaptación de las ratas al frío, la capacidad de sus tejidos para generar calor está aumentada por la inducción de la síntesis de termogenina. En los animales adaptados al frío, la termogenina puede constituir hasta el 15% de la proteína total en la membrana mitocondrial interna.

Durante muchos años se sabía que los animales y los lactantes humanos expresan cantidades significativas de grasa parda, pero hubo escasa evidencia de que cumplía un papel significativo en los seres humanos adultos. En el recién nacido humano, la termogénesis de las mitocondrias de la grasa parda es vital para la supervivencia, como lo es en los animales que hibernan. En los lobos marinos y otros animales aclimatados naturalmente al frío, las mitocondrias de las células musculares contienen termogenina; como resultado, mucha de la fuerza protón-motriz es utilizada para generar calor, manteniendo así la temperatura corporal. Recientemente investigadores utilizaron métodos sofisticados de imagen funcional (por ejemplo, tomografía emisión de positrones) para establecer definitivamente la presencia de grasa parda

en los humanos adultos en el cuello, clavícula y otros sitios, y los niveles a los cuales se incrementa significativamente con la exposición al frío.

CONCEPTOS CLAVES de la Sección 12.4

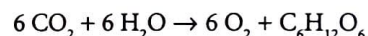
Aprovechamiento de la fuerza protón-motriz para sintetizar ATP

- Peter Mitchell propuso la hipótesis quimiosmótica de que una fuerza protón-motriz a través de la membrana mitocondrial interna es la fuente inmediata de energía para la síntesis de ATP.
- Las bacterias, las mitocondrias y los cloroplastos utilizan el mismo mecanismo quimiosmótico y una ATP sintasa similar para generar ATP (véase la Fig. 12-24).
- La ATP sintasa (el complejo F_0F_1) cataliza la síntesis de ATP a medida que los protones fluyen a través de la membrana mitocondrial interna (membrana plasmática en las bacterias), a favor de sus gradientes electroquímicos de protones.
- F_0 contiene un anillo de 10-14 subunidades c que está rígidamente unido a la subunidad γ con forma de varilla y a la subunidad ϵ de F_1 . Juntos rotan durante la síntesis de ATP. Encima de la subunidad γ se encuentra la perilla hexamérica de F_1 $[(\alpha\beta)_3]$, que sobresale en la matriz mitocondrial (citósol en las bacterias). Las tres subunidades β son los sitios de síntesis de ATP (véase la Fig. 12-26).
- El movimiento de protones a través de la membrana a través de dos hemicanales en la interfase de la subunidad a y el anillo c del F_0 impulsa la rotación del anillo c con sus subunidades ϵ y γ adheridos de F_1 .
- La rotación de la subunidad γ de F_1 , que está insertada en el centro del hexámero $(\alpha\beta)_3$ que no rota y funciona como un eje de rotación, lleva a cambios en la conformación de los sitios de unión a nucleótido en las tres subunidades β de F_1 (véase la Fig. 12-27). Mediante este mecanismo de unión-cambio las subunidades β unen ADP y P_i , los condensan para formar ATP y luego liberan el ATP. Se sintetizan tres ATP por cada revolución hecha mediante el ensamblaje de las subunidades c , γ y ϵ .
- La fuerza protón-motriz también impulsa la captación de P_i y ADP del citósol en intercambio por ATP y OH^- mitocondrial, reduciendo así parte de la energía disponible para la síntesis de ATP. El antiporador ATP/ADP que participa en este intercambio es una de las proteínas más abundantes en la membrana mitocondrial interna (véase la Fig. 12-29).
- La oxidación continuada de NADH y la reducción de O_2 son dependientes de que exista suficiente ADP disponible en la matriz. Este fenómeno, llamado control respiratorio, es un mecanismo importante para la oxidación coordinada y la síntesis de ATP en la mitocondria.
- En las grasas pardas, la membrana mitocondrial interna contiene la proteína desacoplante termogenina, un transportador de protones que disipa la fuerza protón-motriz como calor. Ciertos químicos también funcionan como desacopladores (p. ej., DNP) y tienen el mismo efecto, desacoplar la fosforilación oxidativa del transporte de electrones.

12.5 Fotosíntesis y pigmentos que absorben la luz



Ahora nos centraremos en la fotosíntesis, el segundo proceso principal para sintetizar ATP. En las plantas la fotosíntesis se produce en los cloroplastos, orgánulos grandes que se encuentran en las células de las hojas. Durante la fotosíntesis, los cloroplastos capturan la energía solar, la convierten en energía química en la forma de ATP y NADPH y utilizan esta energía para sintetizar hidratos de carbono complejos sin dióxido y agua. Los hidratos de carbono principales producidos son polímeros de azúcares hexosa (seis carbonos): sacarosa, un disacárido de glucosa-fructosa (véase la Fig. 2-19) y almidón de las hojas, una mezcla de dos tipos de polímeros de glucosa insoluble llamados amilosa y amilopectina. El almidón es el hidrato de carbono primario en las plantas (Fig. 12-30). El almidón de las hojas es sintetizado y almacenado en el cloroplasto. La sacarosa es sintetizada en el citósol de las hojas a partir de precursores de tres carbonos generados en el cloroplasto; es transportado a tejidos vegetales no fotosintéticos (no verdes) (p. ej., raíces y semillas), que metabolizan la sacarosa para energía mediante las vías descritas en las secciones anteriores. La fotosíntesis de las plantas, así como en las algas eucariontes unicelulares (p. ej., las cianobacterias y los proclorofitos), genera oxígeno. La reacción global de la fotosíntesis generadora de oxígeno



es la reacción inversa a la reacción global por la cual los hidratos de carbono son oxidados a CO_2 y H_2O . En efecto, la fotosíntesis en los cloroplastos produce azúcares ricos en energía que son degradados y almacenados para energía en las mitocondrias utilizando fosforilación oxidativa.

Aunque las bacterias verdes y púrpuras también realizan fotosíntesis, ellas utilizan un proceso que no genera oxígeno. Como se analiza en la Sección 12.6, el análisis detallado del sistema fotosintético en estas bacterias ha contribuido a elucidar las primeras etapas en el proceso más complejo de fotosíntesis que genera oxígeno. En esta sección, se proporciona un panorama general de las etapas en la fotosíntesis generadora de oxígeno y se introducen los principales componentes moleculares, incluyendo a las **clorofilas**, los principales pigmentos que absorben luz. ■

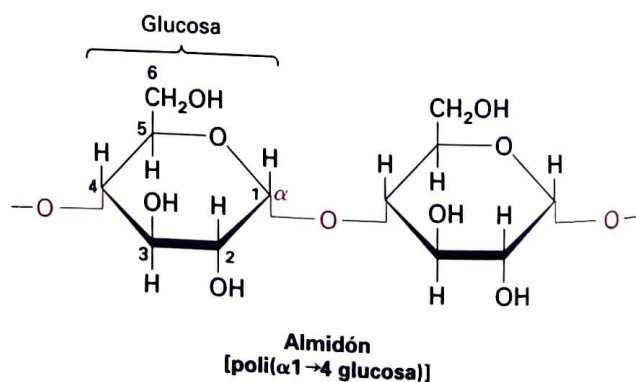


FIGURA 12-30 Estructura de almidón. Este polímero grande de glucosa y el disacárido de sacarosa (véase la Fig. 2-19), son los productos finales principales de la fotosíntesis. Ambos están constituidos por azúcares de seis carbonos (hexosas).

Las membranas tilacoides en los cloroplastos son los sitios de fotosíntesis en las plantas

Los cloroplastos son lenticulares con un diámetro aproximado de 5 μm y con un ancho aproximado de 2,5 μm . Contienen alrededor de 3 000 proteínas diferentes, el 95% de las cuales están codificadas en el núcleo, son sintetizadas en el citosol e importadas dentro del orgánulo y luego transportadas hasta su membrana o espacio adecuado (Cap. 13). Están unidas por dos membranas que no contienen clorofila y no participan directamente en la generación de ATP y NADPH conducido por la luz (Fig. 12-31). Al igual que en las mitocondrias, la membrana externa de los cloroplastos contiene porinas y por lo tanto es permeable a metabolitos de peso molecular pequeño. La membrana interna forma una barrera permeable que contiene proteínas de transporte para la regulación del movimiento de metabolitos dentro y fuera del orgánulo.

A diferencia de las mitocondrias, los cloroplastos contienen una tercera membrana (la *membrana tilacoide*) sobre la cual se produce la generación de ATP conducida por ATP y NADPH. Se cree que la membrana tilacoide de los cloroplastos constituye una lámina única que forma numerosas estructuras aplanadas interconectadas, los **tilacoides**, que comúnmente están dispuestos en pilas llamadas **grana** (Fig. 12-31). Los espacios dentro de todos los tilacoides constituyen un compartimiento continuo único, el **lumen del tilacoide**. La membrana tilacoide contiene una cantidad de proteínas integrales de membrana a las cuales están unidos diversos grupos prostéticos y pigmentos que absorben la luz, el más importante la clorofila. La síntesis del almidón y el almacenamiento se producen en el **estroma**, la fase soluble entre la membrana tilacoide y la membrana interna. En las bacterias fotosintéticas las extensas invaginaciones de la membrana plasmática forman un conjunto de membranas internas, también llamadas membranas tilacoides, donde se produce la fotosíntesis.

Tres de las cuatro etapas en la fotosíntesis se producen solo durante la iluminación

Los procesos fotosintéticos en las plantas se pueden dividir en cuatro etapas (Fig. 12-32), cada una localizada en una zona definida del cloroplasto: (1) absorción de luz, generación de electrones de alta energía y formación de O_2 a partir de H_2O ; (2) transporte de electrones que llevan a la reducción de NADP^+ hasta NADPH y generación de una fuerza protón-motriz; (3) síntesis de ATP; y (4) conversión de CO_2 en hidratos de carbono, comúnmente denominada como **fijación del carbono**. Las cuatro etapas de la fotosíntesis están estrechamente acopladas y controladas de manera tal que se produce la cantidad de hidratos de carbono necesarios para la planta. Todas las reacciones en las etapas 1-3 están catalizadas por complejos multiproteína en la membrana tilacoide. La generación de una pmf y el uso de la pmf para sintetizar ATP se asemeja a las etapas III y IV de la fosforilación oxidativa mitocondrial. Las enzimas que incorporan CO_2 en los intermediarios químicos y luego lo convierten en almidón son constituyentes solubles del estroma de los cloroplastos; las enzimas que forman la sacarosa a partir de los intermediarios de tres carbonos se encuentran en el citosol.

Etapas 1: absorción de energía lumínica, generación de electrones de alta energía y formación de O_2 El paso inicial en la fotosíntesis es la absorción de luz por parte de las clorofilas adheridas a las proteínas

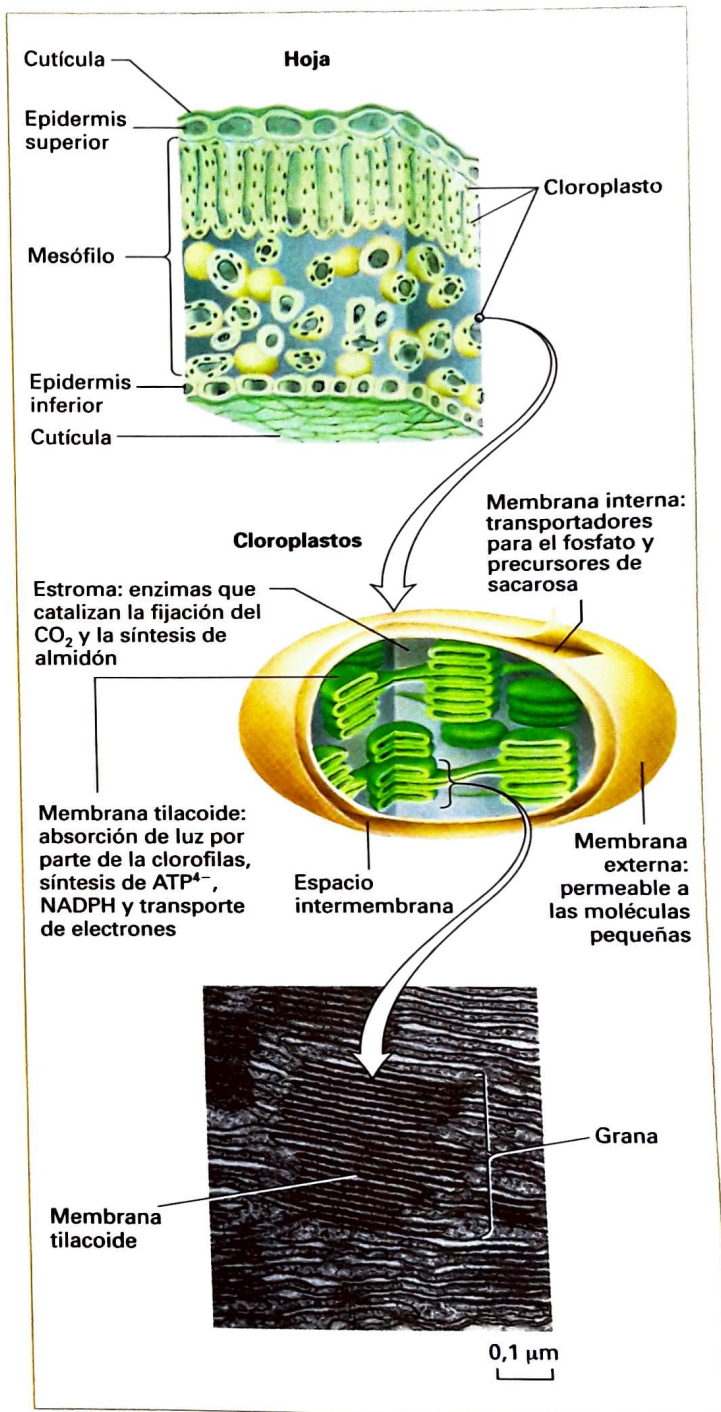


FIGURA 12-31 Estructura celular de una hoja y cloroplasto. Al igual que las mitocondrias, los cloroplastos vegetales están delimitados por una doble membrana separada por un espacio intermembrana. La fotosíntesis se produce sobre una tercera membrana, la membrana tilacoide, que está rodeada por la membrana interna y forma una serie de vesículas aplanadas (tilacoides) que encierran un espacio *luminal* interconectado. El color verde de las plantas se debe al color verde de la clorofila, todas las cuales están localizadas en la membrana tilacoide. Una grana es una pila de tilacoides adyacentes. El estroma es el espacio contenido por la membrana interna y rodeada de tilacoides. (Microfotografías cortesía de Katherine Esau, University of California, Davis).

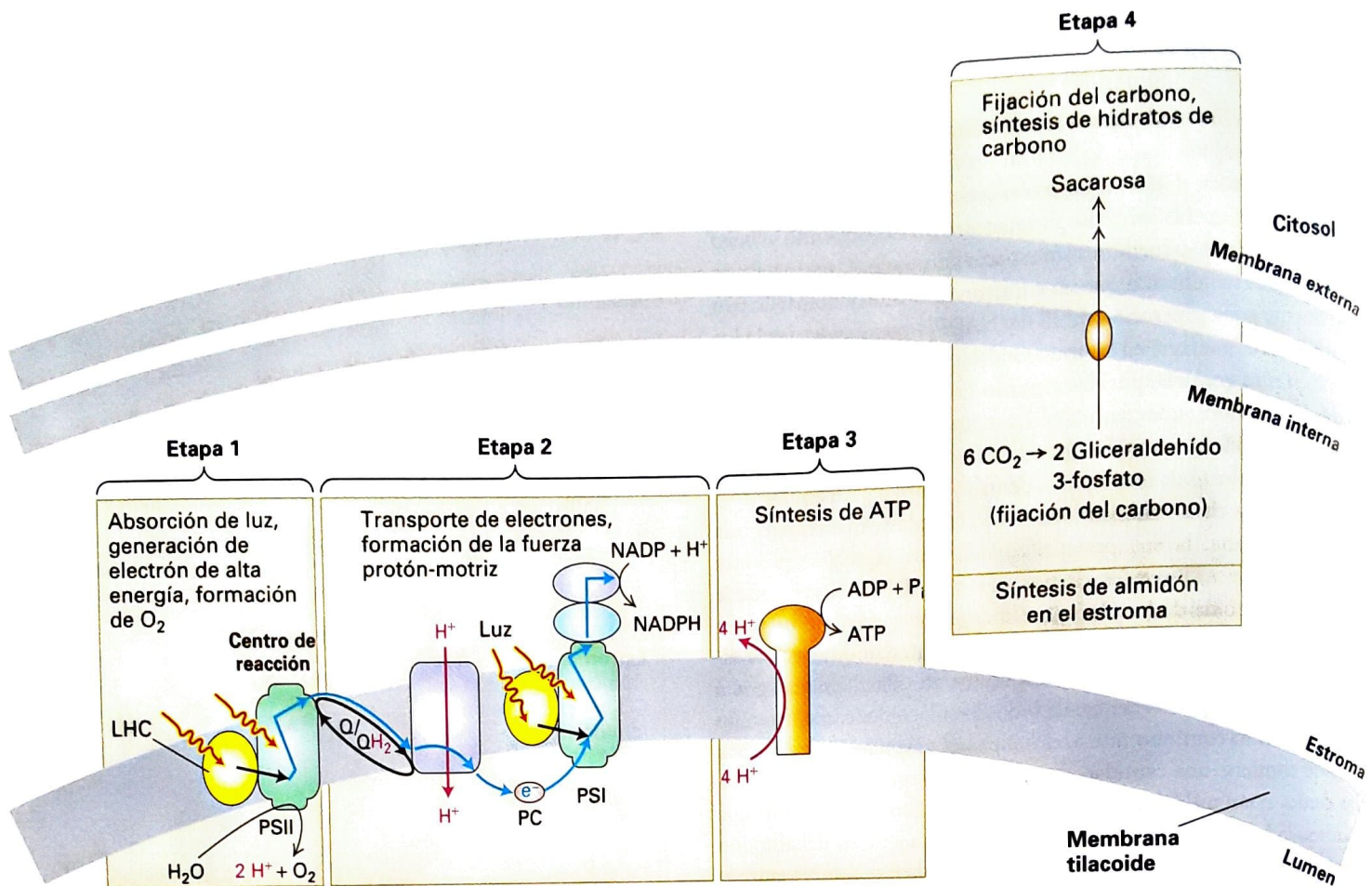
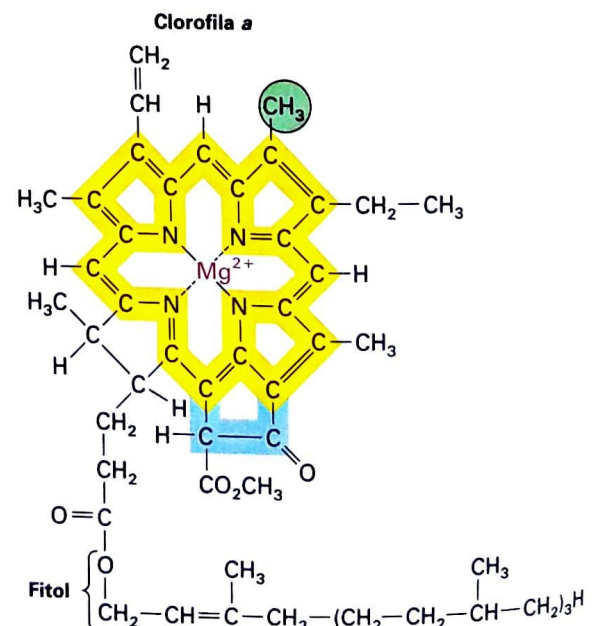


FIGURA 12-32 Panorama general de las cuatro etapas de la fotosíntesis. En la **etapa 1**, la luz absorbida por los complejos captadores de luz (LHC) y el centro de reacción del fotosistema II (PSII). Los LHC transfieren la energía absorbida a los centros de reacción (que la utilizan) o la energía absorbida directamente de un fotón, para oxidar agua a oxígeno molecular y generar electrones de alta energía (las trayectorias de los electrones se muestran mediante flechas azules). En la **etapa 2**, estos electrones se mueven hacia abajo en la cadena de transporte de electrones, que utiliza cualquier transportador de electrones soluble en lípido (Q/QH₂) o soluble en agua (plastocianina, PC) para enviar los electrones entre los múltiples complejos proteicos. A medida que los electrones se mueven descendiendo por la cadena, liberan energía que los complejos utilizan para generar una fuerza

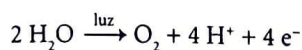
protón-motriz y después la energía es introducida por absorción de luz en el fotosistema I (PSI), a fin de sintetizar el transportador de electrones de alta energía NADPH. En la **etapa 3**, el flujo de protones a favor de sus gradientes de concentración y el gradiente de voltaje a través de la ATP sintasa F₀F₁ llevan a la síntesis de ATP. Las **etapas 1-3** en las plantas ocurren en la membrana tilacoide del cloroplasto. En la **etapa 4**, en el estroma del cloroplasto, la energía almacenada en forma de NADPH y ATP es usada para convertir inicialmente el CO₂ en moléculas de tres carbonos (gliceraldehído 3-fosfato), un proceso conocido como fijación del carbono. Estas moléculas luego son transportadas al citosol de la célula para la conversión a azúcares hexosas en la forma de sacarosa. El gliceraldehído 3-fosfato también es empleado para sintetizar almidón dentro del cloroplasto.

en las membranas tilacoides. Al igual que el componente hemo de los citocromos, las clorofilas consisten en anillos de porfirina adheridos a una cadena lateral hidrocarbonada larga (Fig. 12-33). Al contrario de los hemos (véase la Fig. 12-14), las clorofilas contienen un ion Mg²⁺ central (en lugar de Fe²⁺) y tienen un anillo de cinco miembros adicional. La energía de la luz absorbida se utiliza en última instancia para

FIGURA 12-33 Estructura general de la clorofila *a*, el principal pigmento que atrapa la energía luminosa. Los electrones se deslocalizan entre tres moléculas de clorofila *a* de cuatro anillos centrales (amarillo) y los átomos que los interconectan. En la clorofila, el ion Mg²⁺ (en lugar del ion Fe²⁺ que se encuentra en el hemo) se sitúa en el centro del anillo porfirina y está presente un anillo adicional de cinco miembros (azul); por lo demás, la estructura de la clorofila es similar a la del hemo, encontrada en las moléculas tales como hemoglobina y citocromos (véase la Fig. 12-14a). La "cola" de hidrocarburo fitol facilita la unión de la clorofila a regiones hidrófobas de las proteínas de unión a clorofila. El grupo CH₃ (verde) es reemplazado por un grupo formaldehído en la clorofila *b*.



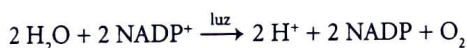
eliminar los electrones desde el donante (agua en el caso de las plantas verdes), formando oxígeno:



Los electrones son transferidos a un *aceptor electrónico primario*, una quinona designada Q, que es similar a la CoQ en las mitocondrias. En las plantas la oxidación del agua tiene lugar en un complejo multiproteico llamado *fotosistema II* (PSII).

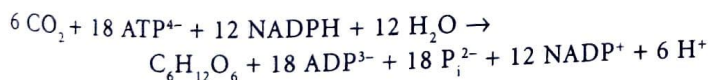
Etapas 2: transporte de electrones y generación de una fuerza protón-motriz Los electrones se mueven desde el aceptor primario de electrones quinona a través de una serie de transportadores de electrones hasta que llegan al aceptor de electrones finales, generalmente la forma oxidada de la **nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP⁺)**, reduciéndola a NADPH. La estructura del NADP⁺ es idéntica al NAD⁺ excepto por la presencia de un grupo fosfato adicional. Ambas moléculas ganan y pierden electrones de la misma manera (véase la Fig. 2-33). En las plantas la reducción del NADP⁺ ocurre en un complejo llamado *fotosistema I* (PSI). El transporte de electroprotones desde el estroma al lumen tilacoide forma un gradiente de pH a través de la membrana ($\text{pH}_{\text{lumen}} < \text{pH}_{\text{estroma}}$). Este proceso es análogo a la generación de una fuerza protón-motriz a través de la membrana mitocondrial interna y en las membranas bacterianas durante el transporte de electrones (véase la Fig. 12-23).

Por lo tanto, la reacción global de las etapas 1 y 2 se puede resumir como



Etapas 3: síntesis de ATP Los protones se mueven a favor de sus gradientes de concentración desde el lumen de los tilacoides hasta el estroma a través del complejo F_0F_1 (ATP sintasa), que acopla el movimiento de protones a la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i . La ATP sintasa de los cloroplastos funciona de manera similar a la sintasa de las mitocondrias y las bacterias (véanse las Figs. 12-26 y 12-27).

Etapas 4: fijación del carbono El NADPH y el ATP generados en las etapas 2 y 3 de la fotosíntesis proporcionan la energía y los electrones que conducen la síntesis de polímeros de azúcares de seis carbonos a partir de CO_2 y H_2O . La ecuación química global se escribe como



Las reacciones que generan ATP y NADPH usadas en la fijación del carbono dependen directamente de la energía lumínica; así, las etapas 1-3 se denominan *reacciones lumínicas* de la fotosíntesis. Las reacciones en la etapa 4 dependen indirectamente de la luz y a veces se las denomina *reacciones oscuras* de la fotosíntesis debido a que pueden producirse en la oscuridad, usando el suministro de ATP y NADPH generado por la energía luminosa. Sin embargo, las reacciones en la etapa 4 no están confinadas a la oscuridad; de hecho, se producen principalmente durante la iluminación.

Cada fotón de luz tiene una cantidad definida de energía

La mecánica cuántica establece que la luz, una forma de radiación electromagnética, tiene propiedades tanto de onda como de partículas. Cuando la luz interactúa con la materia, se comporta como paquetes discretos de energía (cuantos) llamados *fotones*. La energía de un fotón, ϵ , es proporcional a la frecuencia de la onda de luz: $\epsilon = h\nu$, donde h es la constante de Planck ($1,58 \times 10^{-34} \text{ cal} \cdot \text{s}$, o $6,63 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$) y ν es la frecuencia de la onda de luz. En biología es costumbre referirse a la longitud de onda de la onda de luz, λ , en lugar de a su frecuencia, ν . Las dos se relacionan mediante la ecuación simple $\nu = c/\lambda$, donde c es la velocidad de la luz ($3 \times 10^{10} \text{ cm/s}$ en un vacío). Nótese que los fotones de longitud de onda *más corta* tienen energías *más altas*. También, la energía en 1 mol de fotones se puede expresar como $E = N\epsilon$, donde N es el número de Avogadro ($6,02 \times 10^{23}$ moléculas o fotones/mol). Así

$$E = N h \nu = \frac{N h c}{\lambda}$$

La energía de la luz es considerable, como se puede calcular para la luz con una longitud de onda de 550 nm ($550 \times 10^{-7} \text{ cm}$), típica de la luz solar:

$$E = \frac{(6,02 \times 10^{23} \text{ fotones/mol}) (1,58 \times 10^{-34} \text{ cal} \cdot \text{s}) (3 \times 10^{10} \text{ cm/s})}{550 \times 10^{-7} \text{ cm}} \\ = 51,881 \text{ cal/mol}$$

o alrededor de 52 kcal/mol. Esto sería suficiente energía para sintetizar varios moles de ATP a partir de ADP y P_i si toda la energía fuera utilizada para este propósito.

Cada fotón de luz tiene una cantidad definida de energía

La absorción de energía luminosa y su conversión en energía química se produce en complejos multiproteicos llamados **fotosistemas**. Hallados en todos los organismos fotosintéticos, tanto eucariontes como procariontes, los fotosistemas constan de dos componentes estrechamente conectados: un *centro de reacción*, donde se producen los acontecimientos principales de la fotosíntesis (generación de electrones de alta energía); y un complejo antena que consiste en numerosos complejos proteicos, incluyendo las proteínas antena internas dentro del propio fotosistema y los complejos antena externos llamados *complejos de captación de luz* (LHC), constituidos de proteínas especializadas que capturan la energía luminosa y la transmiten al centro de reacción (véase la Fig. 12-32).

Tanto los centros de reacción como las antenas contienen moléculas de pigmento fuertemente unidas que absorben la luz. La clorofila *a* es el principal pigmento involucrado en la fotosíntesis y está presente tanto en los centros de reacción como en las antenas. Además de la clorofila *a*, las antenas contienen otros pigmentos que absorben luz: la *clorofila b* en las plantas vasculares y los *carotenoides* en plantas y bacterias fotosintéticas. Los carotenoides consisten en

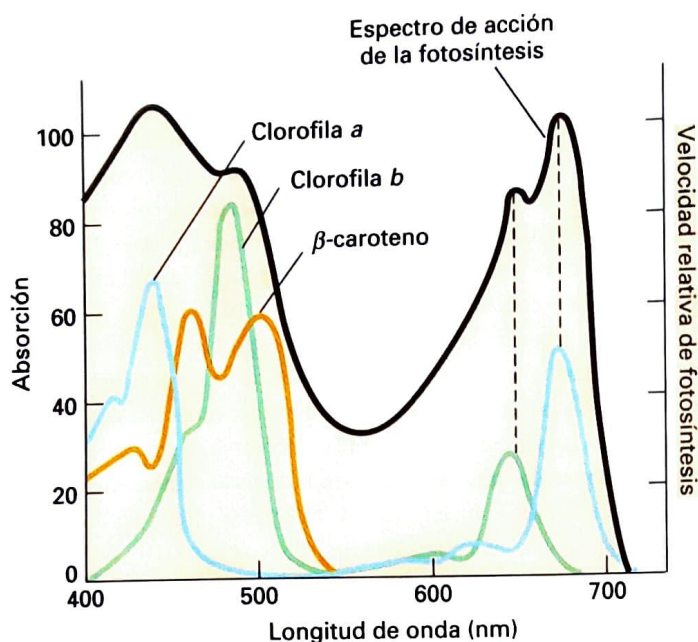


FIGURA EXPERIMENTAL 12-34 La velocidad de la fotosíntesis es mayor a las longitudes de onda de la luz absorbida por los tres pigmentos.

El espectro de acción de la fotosíntesis en las plantas (la capacidad de la luz de diferentes longitudes de onda para llevar a cabo la fotosíntesis) se muestra en negro. La energía de la luz se puede convertir en ATP solo si puede ser absorbida por pigmentos en el cloroplasto. El espectro de absorción (mostrando cuán bien es absorbida la luz de diferentes longitudes de onda) de tres pigmentos presentes en las antenas de los fotosistemas, se muestran en color. La comparación del espectro de acción con el espectro de absorción individual sugiere que la fotosíntesis a 680 nm se debe principalmente a la luz absorbida por la clorofila *a*; a 650 nm, a la luz absorbida por la clorofila *b*; y a longitudes de onda más cortas, a la luz absorbida por las clorofilas *a* y *b* y por los pigmentos carotenoides, incluyendo el β -caroteno.

cadenas hidrocarbonadas largas y ramificadas que alternan enlaces simples y dobles; son similares en estructura al pigmento visual retiniano, que absorbe la luz en el ojo. La presencia de varios pigmentos antena, que absorben la luz a longitudes de onda diferentes, extiende en gran medida el rango de luz que puede absorberse y usarse para la fotosíntesis.

Una de las evidencias más importantes para la participación de las clorofilas y los carotenoides en la fotosíntesis es que el espectro de absorción de estos pigmentos es similar al espectro de absorción de la fotosíntesis (Fig. 12-34). Este último es una medida de la capacidad relativa de la luz de diferentes longitudes de onda de sustentar la fotosíntesis.

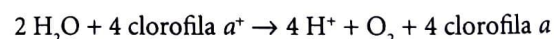
Cuando la clorofila *a* (o cualquiera otra molécula) absorbe la luz visible, la energía lumínica absorbida eleva los electrones en la clorofila *a* hasta un estado de mayor energía (excitado). Este estado difiere del estado basal (no excitado) en gran parte en la distribución de los electrones alrededor de los átomos de C y N del anillo de porfirina. Los estados excitados son inestables y los electrones retornan al estado basal mediante uno de los varios procesos competentes. Para las moléculas de clorofila *a* disueltas en solventes orgánicos como etanol, las principales reacciones que disipan la energía del estado excitado son la emisión de luz (fluorescencia y fosforescencia) y la emisión

térmica (calor). Cuando la misma clorofila *a* está unida en el único ambiente proteico del centro de reacción, la disipación de la energía del estado excitado se produce mediante un proceso bastante diferente que es clave para la fotosíntesis.

El transporte de fotoelectrones desde el centro de reacción energizado de la clorofila *a* produce una separación de carga

La absorción de un fotón de luz de longitud de onda ~680 nm mediante una de las dos moléculas de clorofila *a* del "par especial" en el centro de reacción incrementa la energía de la molécula en 42 kcal/mol (el primer estado excitado). Tal molécula de clorofila *a*, energizada en un centro de reacción de una planta, dona rápidamente un electrón a un aceptor intermediario y el electrón es pasado rápidamente a otro aceptor primario, la quinona Q, cerca de la superficie estromal de la membrana tilacoide (Fig. 12-35). Esta transferencia electrónica de la membrana por luz, llamada **transporte fotoelectrónico**, depende del ambiente único tanto de las clorofilas como del aceptor dentro del centro de reacción. El transporte fotoelectrónico, que se produce casi siempre que un fotón es absorbido, deja una carga positiva sobre la clorofila *a* cercana a la superficie luminal de la membrana tilacoide (lado opuesto al estroma) y genera un aceptor reducido cargado negativamente, (Q^-) cerca de la superficie estromal.

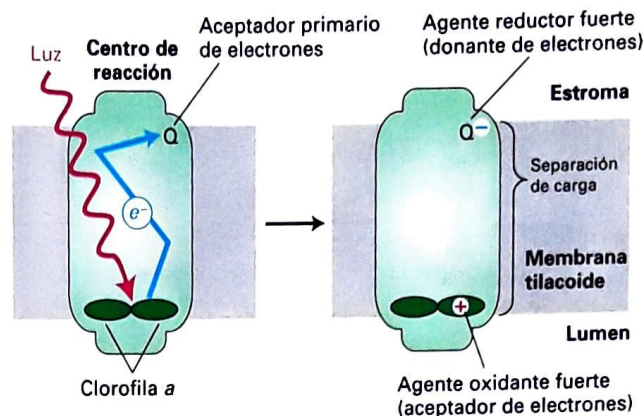
La Q^- producida por el transporte fotoelectrónico es un agente reductor poderoso con una tendencia fuerte a transferir un electrón a otra molécula y finalmente al $NADP^+$. La clorofila a^+ cargada positivamente, un agente oxidante fuerte, atrae un electrón desde un donante de electrones sobre la superficie luminal para regenerar la clorofila *a* original. En las plantas, el poder oxidante de cuatro moléculas de clorofila *a* se utiliza, mediante intermediarios, para eliminar cuatro electrones de 2 moléculas de H_2O unidas a un sitio sobre la superficie luminal para formar O_2 :



Estos reductores y oxidantes biológicos potentes proporcionan la energía necesaria para conducir todas las reacciones subsiguientes de fotosíntesis: el transporte de electrones (etapa 2), la síntesis de ATP (etapa 3) y la fijación de CO_2 (etapa 4).

La clorofila *a* también absorbe luz a longitudes de onda discretas más cortas que 680 nm (véase la Fig. 12-34). Tal absorción eleva a la molécula a uno de los varios estados excitados, cuya energía es más elevada que la del primer estado excitado recién descrito y cuyo decaimiento mediante liberación de energía está dentro de los 2×10^{-12} segundos (2 picosegundos, ps) hasta el primer estado de menor energía con pérdida de energía extra como calor. Debido a que el transporte fotoelectrónico y la separación de cargas resultante se produce solo desde el primer estado excitado de la clorofila *a* del centro de reacción, el rendimiento cuántico (la cantidad de fotosíntesis por fotón absorbido) es el mismo para todas las longitudes de onda de la luz visible más cortas (y por lo tanto de energía más elevada) que 680 nm. Cuán de cerca la longitud de onda de la luz coincide con el espectro de absorción de los pigmentos determina qué tan probable es que el fotón absorba luz. Una vez absorbido,

FIGURA 12-35 Transporte de fotoelectrones, el acontecimiento primario en la fotosíntesis. Después de la absorción de un fotón de luz, una de las moléculas de clorofila *a* del par especial excitado en el centro de reacción (izquierda) dona a través de diversos intermediarios (no mostrados) un electrón a la molécula aceptadora unida laxamente, la quinona *Q*, sobre la superficie estromal de la membrana tilacoide, creando una separación de cargas a través de la membrana (derecha). La subsiguiente transferencia de este electrón libera energía que es utilizada para generar ATP y NADPH (Figs. 12-38 y 12-39). La clorofila *a*⁺ cargada positivamente, generada cuando el electrón excitado por la luz se mueve hasta *Q*, es eventualmente neutralizada por la transferencia de un electrón de otro electrón. En las plantas, la oxidación de agua hasta oxígeno molecular proporciona este electrón neutralizante y ocurre en un complejo multiproteico llamado fotosistema II (Fig. 12-39). El complejo fotosistema I utiliza una vía de transporte fotoelectrónico similar, pero en lugar de oxidar agua recibe un electrón desde un transportador proteico llamado plastocianina para neutralizar la carga positiva de la clorofila *a*⁺ (Fig. 12-39).



la longitud de onda exacta del fotón no es crucial, siempre que al menos sea lo suficientemente energética para impulsar la clorofila al primer estado excitado.

Los complejos de captación de la luz y los complejos antenas internos incrementan la eficiencia de la fotosíntesis

Aunque las moléculas de clorofila *a* dentro de un centro de reacción están involucradas directamente con la separación de cargas y la transferencia de electrones, son capaces de absorber la luz directamente e iniciar la fotosíntesis, ellas en su mayoría son energizadas indirectamente mediante transferencia de energía a partir de otros pigmentos que absorben luz y que transfieren energía. Estos otros pigmentos, que incluyen muchas otras moléculas de clorofila, están involucrados con la absorción de fotones y con el paso de energía a las moléculas de clorofila *a* en el centro de reacción. Algunos están unidos a subunidades proteicas que se consideran son componentes intrínsecos del fotosistema y por lo tanto se denominan antenas internas; otros están ligados a complejos proteicos que los unen pero son distintos a ellos, las proteínas del centro del fotosistema y se denominan complejos de captación de luz (LHC). Incluso a la máxima intensidad de luz encontrada en los organismos fotosintéticos (luz solar tropical de mediodía), cada molécula de clorofila *a* del centro de reacción absorbe solo alrededor de un fotón por segundo, que no es suficiente para sustentar suficiente fotosíntesis para las necesidades de la planta. El involucramiento de las antenas internas y de los LHC incrementa en gran medida la eficiencia de la fotosíntesis, en especial a las intensidades luminosas más típicas, al aumentar la absorción de 680 nm de luz y al extender el rango de longitudes de onda de luz que pueden ser absorbidas por otros pigmentos antena.

Los fotones pueden ser absorbidos por cualquiera de las moléculas en las antenas internas o los LHC. Luego la energía es rápidamente absorbida (en $< 10^{-9}$ segundos) por una de las dos moléculas de clorofila *a* del "par especial" en el centro de reacción asociado, donde promueve la separación de carga fotosintética primaria (Fig. 12-35). Las proteínas centrales del fotosistema y las proteínas LHC mantienen las moléculas de pigmento en la orientación precisa y la posición óptima para la absorción de luz y la transferencia de energía, maximizando así una *transferencia por resonancia* muy rápida y eficaz de la energía, desde los pigmentos antena hasta las clorofilas del centro de reacción. La transferencia de energía por resonancia no involucra la transferencia de un electrón. Los estudios en uno de los dos fotosistemas en las cianobacterias, que son similares a los de las plantas multicelulares que contienen semillas, sugieren que la energía proveniente de la luz absorbida es canalizada primero a una clorofila "puente" en cada LHC y luego al par especial de las clorofilas del centro de reacción (Fig. 12-36a). Sin embargo, sorprendentemente, las estructuras moleculares de los LHC de las plantas y las cianobacterias son completamente diferentes de las en las bacterias verdes y púrpuras, incluso si ambos tipos contienen carotenoides y clorofilas en una disposición agrupada dentro de la membrana. La Figura 12-36b muestra la distribución de los pigmentos de clorofila en el fotosistema I de *Pisum sativum* (guisantes) junto con aquellos de las antenas de los LHC periféricos. La gran cantidad de clorofilas antenas LHC e internas alrededor del centro de reacción permite la transferencia eficaz de la energía luminica absorbida a las clorofilas especiales en el centro de reacción.

Aunque las clorofilas antena de los LHC pueden transferir energía luminica absorbida a partir de un fotón, ellas no pueden liberar un electrón. Como ya vimos, esta función reside en las dos clorofilas del centro de reacción. Para comprender sus capacidades de liberación de electrones, en la siguiente sección analizamos la estructura y función del centro de reacción en los fotosistemas bacterianos y vegetales.

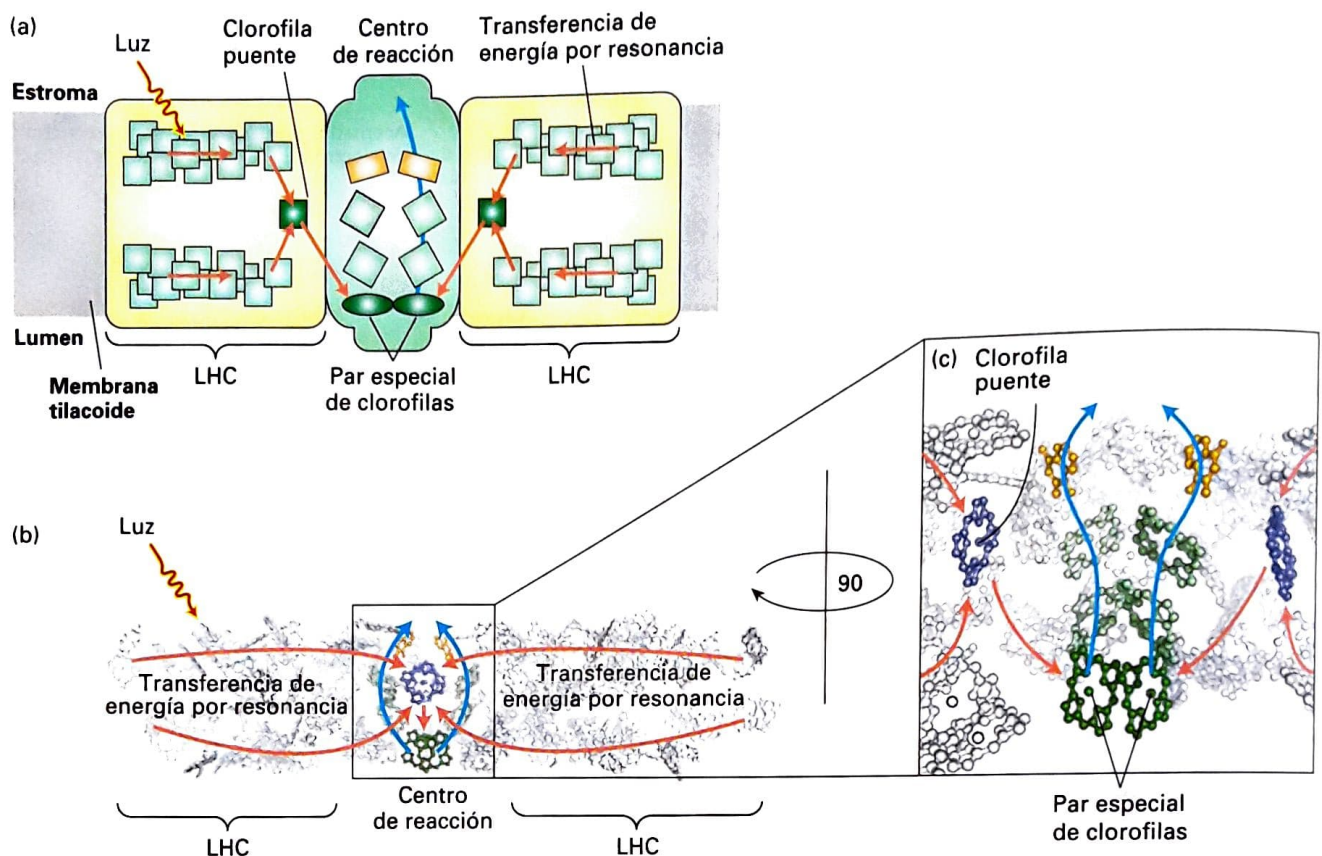


FIGURA 12-36 Complejos de captación de luz y fotosistemas en cianobacterias y plantas. (a) Diagrama de la membrana de una cianobacteria, en la cual los complejos multiproteicos de captación de luz (LHC) contienen 90 moléculas de clorofila (verde) y otras 31 moléculas pequeñas, todas manteniendo una disposición geométrica específica para la absorción óptima de la luz y la transferencia de energía. De las seis moléculas de clorofila en el centro de reacción, dos constituyen las clorofilas del par especial (óvalos, verde oscuro) que pueden iniciar el transporte fotoeléctrico cuando son excitadas (flechas azules). La transferencia de energía por resonancia (flechas rojas) rápidamente se canaliza desde la luz absorbida hasta

una de las dos clorofilas "puente" (cuadrados, verde oscuro) y desde allí hasta las clorofilas en el centro de reacción. (b) La organización tridimensional del fotosistema I (PSI) y los LHC de *Pisum sativum* (guisante), tal como se determina a través de cristalografía de rayos x y vista desde el plano de la membrana. Solo se muestran las clorofilas junto con los transportadores electrónicos del centro de reacción. (c) Vista expandida del centro de reacción de (b), rotada 90° alrededor de un eje vertical. (Parte [a] adaptada de W. Kühlbrandt, 2001, *Nature* 411:896 y P. Jordan y cols., 2001, *Nature* 411:909. Parte [b] y [c] sobre la base de la determinación estructural por A. Ben-Sham y cols., 2003, *Nature* 426:630).

CONCEPTOS CLAVES de la Sección 12.5

Fotosíntesis y pigmentos que absorben la luz

- Los principales productos finales de la fotosíntesis en las plantas son el oxígeno molecular y los polímeros de azúcares de seis carbonos (almidón y sacarosa).
- Las reacciones de la fotosíntesis que generan ATP y capturan luz se producen en la membrana tilacoide dentro de los cloroplastos. La membrana externa permeable y la interna que rodea los cloroplastos no participan directamente en la fotosíntesis (véase la Fig. 12-31).
- Existen cuatro etapas en la fotosíntesis: (1) la absorción de la luz, la generación de electrones de alta energía y la formación de O_2 a partir de H_2O ; (2) el transporte de electrones lleva a la reducción de $NADP^+$ a NADPH y a la generación de una fuerza protón-motriz; (3) síntesis de ATP; y (4) conversión de CO_2 a hidratos de carbono (fijación del carbono).
- En la etapa 1 de la fotosíntesis, la energía lumínica es absorbida por una de las dos moléculas de clorofila a del "par especial" unidas a las

proteínas del centro de reacción en la membrana tilacoide. Las clorofilas energizadas donan, a través de los intermediarios, un electrón a una quinona en el lado opuesto de la membrana, creando una separación de cargas (véase la Fig. 12-35). En las plantas verdes, las clorofilas cargadas positivamente luego eliminan los electrones a partir del agua, formando oxígeno molecular (O_2).

- En la etapa 2, los electrones son transportados a partir de la quinona reducida a través de transportadores en la membrana tilacoide hasta que alcanzan el aceptor final de electrones, en general el $NADP^+$, reduciéndolo a NADPH. El transporte de electrones está acoplado al movimiento de los protones a través de la membrana a partir del estroma hasta el lumen tilacoide, formando un gradiente de pH (fuerza protón-motriz) a través de la membrana tilacoide.
- En la etapa 3, el movimiento de protones en favor de sus gradientes electroquímicos a través de los complejos F_0F_1 (ATP sintasa) impulsa la síntesis de ATP a partir de ADP y P_i .
- En la etapa 4, el NADPH y el ATP generados en la etapa 2 y 3 proporcionan la energía y los electrones para llevar a cabo la fijación de CO_2 .

que da como resultado la síntesis de hidratos de carbono. Estas reacciones tienen lugar en el estroma de tilacoides y en el citosol.

• En asociación con cada centro de reacción se encuentran múltiples antenas internas y complejos de captación de la luz (LHC), que contienen clorofilas *a* y *b*, carotenoides y otros pigmentos que absorben la luz a múltiples longitudes de onda. La energía, pero no un electrón, es transferida desde las moléculas internas y las moléculas de clorofilas de los LHC hasta las clorofilas del centro de reacción mediante transferencia de energía por resonancia (véase la Fig. 12-36).

12.6 Análisis molecular de los fotosistemas

Como se mencionó en las secciones previas, la fotosíntesis en las bacterias verdes y púrpuras no genera oxígeno, mientras que la fotosíntesis en las cianobacterias, las algas y las plantas sí lo hace.* Esta diferencia se atribuye a la presencia de dos tipos de fotosistemas (PS) en los últimos organismos: PSI reduce el NADP⁺ a NADPH y el PSII forma O₂ a partir de H₂O. Por el contrario, las bacterias verdes y púrpuras solo tienen un tipo de fotosistema, el cual no puede formar O₂. Primero veremos el fotosistema más simple de las bacterias púrpuras y luego consideraremos la maquinaria fotosintética más complicada en los cloroplastos.

El único fotosistema de las bacterias púrpuras genera una fuerza protón-motriz pero no O₂

Se han determinado las estructuras tridimensionales de los centros de reacción fotosintéticos, lo que le permite a los científicos trazar en detalles las vías de los electrones durante y después de la absorción de luz. El centro de reacción de las bacterias púrpuras contiene tres subunidades proteicas (L, M y H) localizadas en la membrana plasmática (Figs. 12-37). Unidas a estas proteínas se encuentran los grupos prostéticos que absorben la luz y transportan los electrones durante la fotosíntesis. Los grupos prostéticos incluyen al “par especial” de moléculas de bacterioclorofila *a* equivalente a las moléculas de clorofila *a* del centro de reacción en las plantas, así como varios otros pigmentos y dos quinonas, llamadas Q_A y Q_B, que son estructuralmente similares a las ubiquinonas mitocondriales.

Separación inicial de carga El mecanismo de separación de carga en el fotosistema de las bacterias púrpuras es idéntico al de las plantas descrito anteriormente; es decir, la energía absorbida de la luz se utiliza para despojar un electrón de una molécula de bacterioclorofila *a* del centro de reacción y transferirlo, a través de varios pigmentos diferentes, a un aceptor electrónico primario Q_B, que está unido de manera laxa al lado citosólico de la membrana. La clorofila por lo tanto adquiere

* Un tipo muy diferente de mecanismo utilizado para capturar la energía de la luz, que se produce solo en ciertas archaeobacterias, no se analiza aquí debido a que es muy distinto de los mecanismos del centro de reacción que se describen. En este otro mecanismo, la proteína de membrana plasmática que absorbe un fotón de luz, llamado bacteriorodopsina, también impulsa un protón desde el citosol hasta el espacio extracelular para cada fotón de luz absorbido.

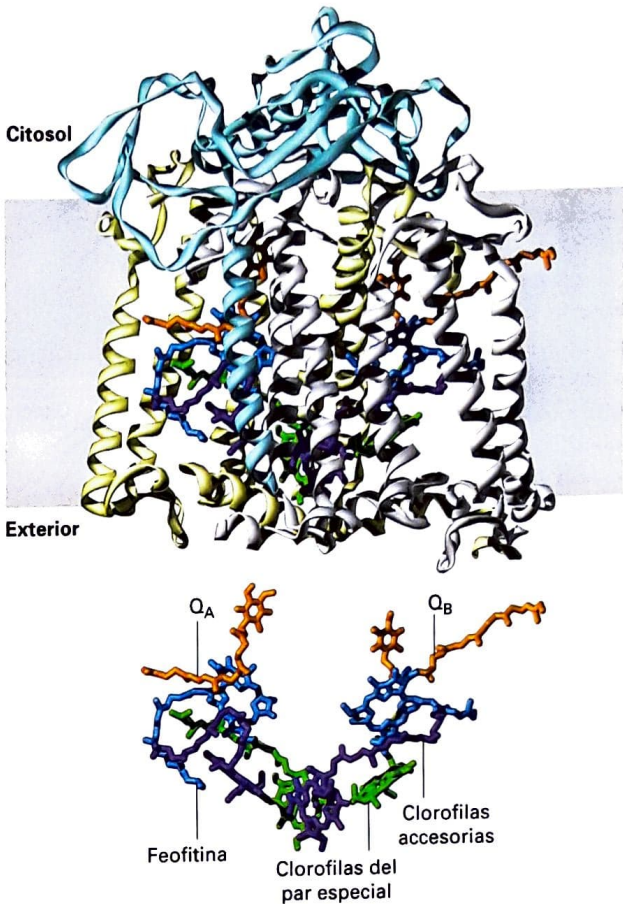


FIGURA 12-37 Estructura tridimensional del centro de reacción fotosintético de la bacteria púrpura *Rhodospirillum rubrum*. (Arriba) Las subunidades L (amarillo) y M (gris), cada una de las cuales está formada por cinco hélices α transmembranas y tienen una estructura global muy similar; la subunidad H (celeste) está anclada a la membrana por una única hélice α transmembrana. Una cuarta subunidad (no mostrada) es una proteína periférica que se une a los segmentos exoplasmáticos de las otras subunidades. (Abajo) Dentro de cada centro de reacción, aunque no es fácilmente distinguible en la imagen de arriba, está un par especial de una molécula de bacterioclorofila *a* (verde), capaz de iniciar el transporte fotoelectrónico; dos clorofilas accesorias (púrpura); dos feofitinas (azul oscuro) y dos quinonas, Q_A y Q_B (naranja). Q_B es el aceptor de electrones primarios durante la fotosíntesis. (De M. H. Stowell y cols., 1997, *Science* **276**:812).

re una carga positiva y Q_B adquiere una carga negativa. Para determinar la vía transversa por electrones a través del centro de reacción bacteriano, los investigadores tomaron ventajas del hecho de que los pigmentos absorben luz de solo ciertas longitudes de onda y su espectro de absorción cambia cuando el mismo posee un electrón extra. Debido a que estos movimientos de electrones se completan en menos de 1 milisegundo (ms), se necesita una técnica especial denominada *espectroscopia de absorción de picosegundo* para monitorear los cambios en el espectro de absorción de los diversos pigmentos como una función del tiempo después de la absorción de un fotón de luz.

Cuando una preparación de vesículas de membrana bacteriana es expuesta a un pulso intenso de luz láser que dura menos de 1 ps, cada centro de reacción absorbe un fotón (Fig. 12-38). La luz absorbida por las moléculas de clorofila *a* en cada centro de reacción las convierte al estado excitado y los subsiguientes procesos de transferencia de electrones están sincronizados en todos los centros de reacción

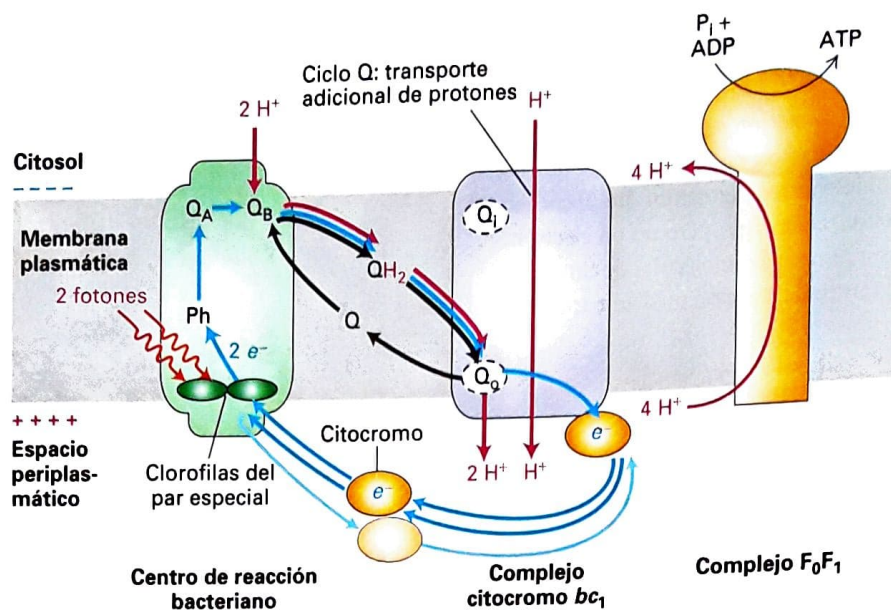


FIGURA 12-38 Flujo electrónico en el único fotosistema de las bacterias púrpuras. El flujo electrónico genera una fuerza protón-motriz, pero no O_2 . Las flechas azules indican el flujo de electrones; las flechas rojas indican el movimiento de protones. (Izquierda) La energía absorbida directamente a partir de la luz o canalizada desde un LHC asociado (no mostrado aquí), energiza una clorofila del par especial en el centro de reacción. El transporte de fotoelectrones a partir de la clorofila energizada a través de una clorofila accesoria, la feofitina (Ph), y la quinona A (Q_A) hasta la quinona B (Q_B), forman la semiquinona $Q^{\cdot-}$ y dejan una carga positiva sobre la clorofila. A continuación de la absorción de un segundo fotón y la transferencia de un segundo electrón a la semiquinona, la quinona rápidamente recolecta dos protones a partir

del citosol para formar QH_2 . (Centro) Después de la difusión a través de la membrana y la unión a los sitios Q_o sobre el lado exoplasmático del complejo citocromo bc_1 , QH_2 dona dos electrones y simultáneamente da dos protones al medio externo en el espacio periplásmico, generando un gradiente electroquímico (fuerza protón-motriz). Los electrones son transportados de regreso a la clorofila del centro de reacción a través de un citocromo soluble, que se difunde en el espacio periplásmico. Véase el camino cíclico de los electrones (azul). El funcionamiento del ciclo Q en el complejo citocromo bc_1 bombea protones adicionales a través de la membrana en el medio externo, como en las mitocondrias. (Adaptado de J. Deisenhofer y H. Michael, 1991, *Ann. Rev. Cell Biol.* 7 1)

en la muestra experimental. Dentro de los 4×10^{-12} segundos (4 ps), un electrón se mueve a través de las clorofilas bacterianas accesorias (véase la Fig. 12-37, *abajo*) como un intermediario de las moléculas feofitina (Ph), dejando una carga positiva en la clorofila a . Este estado existe durante alrededor de 200 ps antes de que el electrón se mueva hacia la Q_A y luego, en el paso más lento, se requiere ~200 ms para que se mueva hasta la Q_B . Esta vía de flujo de electrones se esquematiza en la parte izquierda de la Figura 12-38. Los últimos pasos son más lentos que los movimientos de electrones rápidos debido inherentemente a que involucran cambios conformacionales de proteínas relativamente lentos.

El flujo de electrones y el movimiento de protones acoplado subsiguiente Después de que el aceptor primario de electrones (Q_B) en el centro de reacción bacteriano acepta un electrón, formando $Q_B^{\cdot-}$, acepta un segundo electrón de la misma clorofila del centro de reacción tras su reexcitación (es decir, después de la absorción de un segundo fotón o de la transferencia de energía de las moléculas antenas). La quinona luego une dos protones desde el citosol, formando la quinona reducida (QH_2), que es liberada del centro de reacción (Fig. 12-38). QH_2 se difunde dentro de la membrana bacteriana hasta el sitio Q_o en el lado citoplasmático de un complejo de transporte de electrones de citocromo bc_1 , similar en estructura al complejo III en las mitocondrias. Existe liberación de

dos protones dentro del espacio periplásmico (el espacio entre la membrana plasmática y la pared celular bacteriana). Este proceso mueve protones desde el citosol hacia el exterior de la célula, generando una fuerza protón-motriz a través de la membrana plasmática. Simultáneamente, QH_2 libera sus dos electrones, que se mueven a través del complejo citocromo bc_1 exactamente como se describió para el complejo mitocondrial III ($CoQH_2$ —citocromo c reductasa) en la Figura 12-18. El ciclo Q en el centro de reacción bacteriano, al igual que el ciclo Q en las mitocondrias, bombea protones adicionales desde el citosol hasta el espacio intermembrana, incrementando así la fuerza protón-motriz.

El aceptor de electrones transferidos a través del complejo citocromo bc_1 es un citocromo soluble (un transportador de un electrón) en el espacio periplásmico, que es reducido del estado Fe^{3+} a Fe^{2+} . El citocromo reducido (análogo al citocromo c en las mitocondrias) luego difunde hacia un centro de reacción, donde libera su electrón en una clorofila a^+ positivamente cargada, regresando esa clorofila al estado basal no cargado y el citocromo al estado Fe^{3+} . Este flujo de electrones *cíclico* no genera oxígeno y no reduce coenzimas, pero se genera una fuerza protón-motriz.

Como en otros sistemas, esta fuerza protón-motriz es utilizada por el complejo F_0F_1 localizado en la membrana plasmática bacteriana para sintetizar ATP y también transportar moléculas a través de la membrana en contra de su gradiente de concentración.

Los cloroplastos contienen dos fotosistemas funcional y espacialmente distintos

En la década de 1940, el biofísico R. Emerson descubrió que la tasa de fotosíntesis vegetal generada por la luz de longitud de onda de 700 nm puede aumentar en gran medida por la adición de luz de longitud de onda más corta (energía más alta). Él encontró que una combinación de luz a por ejemplo 600 y 700 nm sustenta una mayor velocidad de fotosíntesis que la suma de las velocidades para las dos longitudes de onda separadas. Esto, denominado *efecto Emerson*, llevó a los investigadores a concluir que la fotosíntesis en las plantas involucra la interacción de dos fotosistemas separados, llamados como *PSI* y *PSII*. *PSI* es impulsado por luz de longitud de onda de 700 nm o menos; *PSII*, solo por luz de longitud de onda más corta (< 680 nm).

En los cloroplastos, las clorofilas del par especial del centro de reacción que inician el transporte fotoelectrónico en *PSI* y *PSII* difieren en sus máximos de absorción de luz debido a diferencias en sus ambientes. Por esta razón, estas clorofilas suelen designarse P_{680} (*PSII*) y P_{700} (*PSI*). Al igual que un centro de reacción bacteriano, cada centro de reacción de cloroplasto está asociado con múltiples antenas internas y complejos captadores de luz (LHC); los LHC asociados con *PSII* (p. ej., LHCII) y *PSI* (p. ej., LHCI) contienen diferentes proteínas.

Los dos fotosistemas también se distribuyen de manera diferente en las membranas tilacoides: *PSII* principalmente en regiones apiladas (grana, véase la Fig. 12-31) y *PSI* en regiones sin apilamientos. El apilamiento de las membranas tilacoides se puede deber a las propiedades de unión de las proteínas asociadas con *PSII*, en especial LHCII. La evi-

dencia de esta distribución proviene de estudios en los cuales las membranas tilacoides se fragmentaron suavemente mediante ultrasonido, para formar vesículas. Las vesículas de tilacoide apiladas y no apiladas luego se fraccionaron por centrifugación en gradiente de densidad. Las fracciones apiladas contenían principalmente proteína *PSII* y las fracciones no apiladas *PSI*.

Por último y lo más importante, los dos fotosistemas de cloroplastos difieren significativamente en sus funciones (Fig. 12-39); solo *PSII* oxida agua para formar oxígeno molecular, mientras que solo *PSI* transfiere electrones hasta el aceptor final, $NADP^+$. La fotosíntesis en los cloroplastos puede seguir una vía lineal o una cíclica. La vía lineal, que analizaremos primero, puede dar lugar a la fijación del carbono así como a la síntesis de ATP. Por el contrario, la vía cíclica solo origina síntesis de ATP y no genera $NADPH$ reducido para ser utilizado en la fijación del carbono. Las cianobacterias y algas fotosintéticas contienen dos fotosistemas análogos a los de los cloroplastos. Proteínas y pigmentos similares componen los fotosistemas I y II de las plantas y las bacterias fotosintéticas.

El flujo lineal de electrones a través de ambos fotosistemas de plantas, *PSII* y *PSI*, generan una fuerza protón-motriz, O_2 y $NADPH$

El flujo de electrones lineal en los cloroplastos involucra el *PSII* y el *PSI* en una serie obligada en la cual los electrones son transferidos desde el H_2O hasta el $NADP^+$. El proceso comienza con la absor-

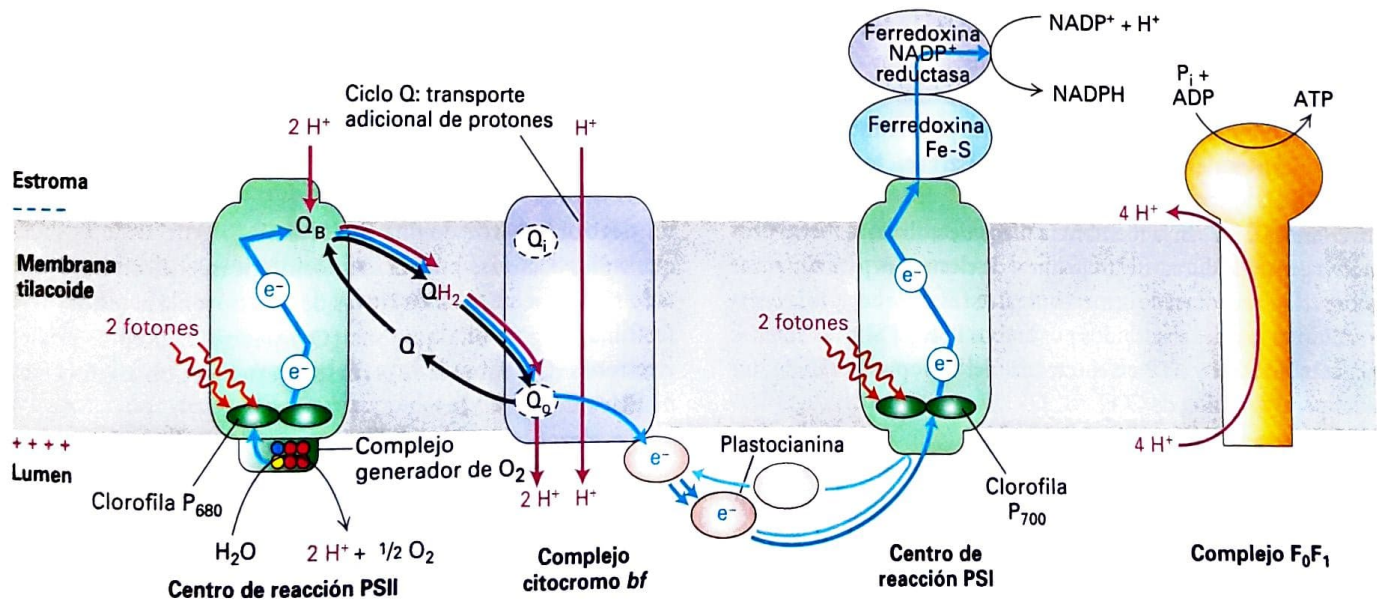


FIGURA 12-39 Flujo lineal de electrones en las plantas, que requiere tanto del fotosistema *PSI* como del *PSII*. Las flechas azules indican el flujo de electrones; las flechas rojas indican el movimiento de protones. Los LHC no se muestran. (Izquierda) En el centro de reacción *PSII*, dos excitaciones sucesivas inducidas por luz de las mismas clorofilas P_{680} da como resultado la reducción del aceptor primario de electrones Q_B a QH_2 . Sobre el lado luminal del *PSII*, los electrones eliminados del H_2O en el lumen tilacoide son transferidos al P_{680}^+ , restaurando las clorofilas del centro de reacción al estado basal y generando O_2 . (Centro) El complejo citocromo *bf* luego acepta los electrones procedentes de QH_2 , acoplado a la liberación de dos protones al lumen. El funcionamiento de un ciclo *Q* en el complejo citocromo *bf*

transloca protones adicionales a través de la membrana del lumen tilacoide, incrementando la fuerza protón-motriz. (Derecha) En el centro de reacción *PSI*, cada electrón liberado a partir de las clorofilas P_{700} excitadas por la luz se mueve a través de una serie de transportadores en el centro de reacción de la superficie estromal, donde la ferredoxina soluble (una proteína *Fe-S*) transfiere el electrón a la ferredoxina- $NADP^+$ reductasa (*FNR*). Esta enzima utiliza el grupo prostético flavina adenina dinucleótido (*FAD*) y un protón para reducir $NADP^+$, formando $NADPH$. P_{700}^+ es restaurado a su estado basal por la adición de un transportador de electrones a través de la vía *PSII* del complejo citocromo *bf* y de la plastocianina, un transportador electrónico soluble.

ción de un fotón por el PSII, causando que un electrón se mueva desde una clorofila *a* del P_{680} hasta un aceptor plastoquinona (Q_B) sobre la superficie estromal (Fig. 12-39). El P_{680}^+ oxidado resultante extrae un electrón del donador renovable H_2O constituyendo un intermediario en la formación de O_2 y un protón, que permanece en el lumen tilacoide y contribuye a la fuerza protón-motriz. Después de que *P* absorbe un segundo fotón, la semiquinona $Q^{\cdot-}$ acepta un segundo electrón y recoge dos protones del espacio estromal, generando QH_2 . Después de la difusión en la membrana, QH_2 se une a un sitio Q_o en un complejo citocromo bc_1 que es análogo al bacteriano y al complejo mitocondrial III. Como sucede en estos sistemas, funciona un ciclo *Q*, incrementando así la fuerza protón-motriz generada por el transporte de electrones. Después de que el complejo citocromo *bf* acepta electrones de QH_2 , los transfiere (de a uno por vez) a la forma Cu^{2+} del transportador de electrones solubles plastocianina (análogo al citocromo *c*), reduciéndolo a la forma Cu^{1+} . La plastocianina luego se difunde en el lumen del tilacoide, llevando el electrón al PSI.

La absorción de un fotón por el PSI lleva a la eliminación de un electrón a partir de la clorofila *a* del centro de reacción, P_{700} (Fig. 12-39). El P_{700}^{+} oxidado resultante es reducido por un electrón pasado a partir del centro de reacción PSII a través del complejo de citocromo *b_f* y la plastocianina. Nuevamente, esto es análogo a la situación en mitocondrias, donde el citocromo *c* actúa como una lanzadera de un único electrón del complejo III al complejo IV (véase la Fig. 12-16). El electrón incorporado en la superficie luminal por el P_{700} energizado por la absorción de un fotón, se mueve dentro del PSI a través de varios transportadores hasta al superficie estromal de la membrana tilacoide, donde es aceptado por la ferredoxina, una proteína hierro-azufre (Fe-S). En el flujo de electrones lineal, los electrones excitados en PSI son transferidos desde la ferredoxina a través de la enzima ferredoxina NADP⁺ reductasa (FNR). Esta enzima utiliza el grupo prostético FAD como un aceptor de electrones para reducir el NADP⁺ formando, junto con un protón tomado del estroma, la molécula reducida NADPH.

Los complejos F_0F_1 en la membrana tilacoide utilizan la fuerza protón-motriz generada durante el flujo lineal de electrones para sintetizar ATP sobre el lado estromal de la membrana. Así esta vía explota la energía de múltiples fotones absorbidos por ambos PSII y PSI y sus antenas para generar NADPH y ATP en el estroma del cloroplasto, donde son utilizados para la fijación de CO_2 .

Un complejo generador de oxígeno está localizado en la superficie luminal del centro de reacción PSII

De manera sorprendente, la estructura del centro de reacción PSII (que elimina electrones del H_2O para formar O_2) se asemeja a la del centro de reacción de las bacterias púrpuras fotosintéticas, que no forman O_2 . Al igual que el centro de reacción bacteriano, el centro de reacción de PSII contiene dos moléculas de clorofila *a* (P_{680}), así como otras dos clorofilas accesorias, dos feofitinas, dos quinonas (Q_A y Q_B) y un átomo de hierro no hemo. Estas moléculas pequeñas están unidas a dos proteínas en el PSII, llamadas D1 y D2, cuyas secuencias son notablemente similares a las secuencias de las subunidades L y M del centro de reacción bacteriano (Fig. 12-37), acreditando sus orígenes evolutivos en común. Cuando el PSII absorbe un fotón con una longitud de onda de $< 680 \text{ nm}$, desencadena la pérdida de

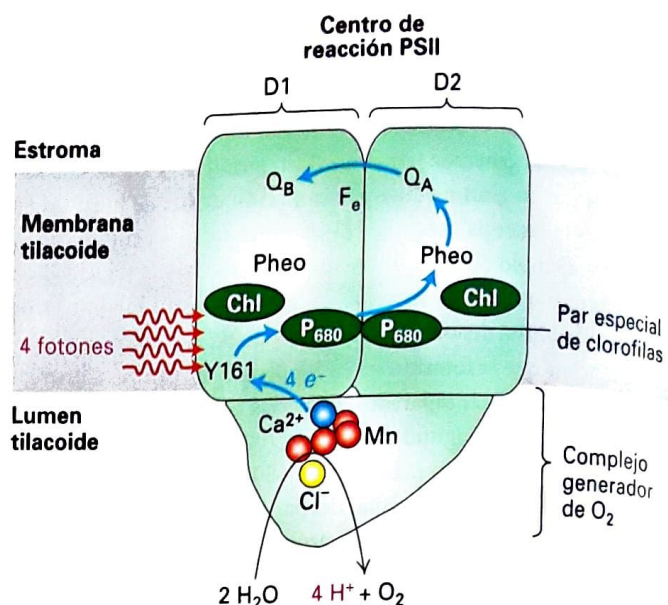


FIGURA 12-40 Flujo de electrones y evolución del O_2 en el PSII de cloroplasto. El centro de reacción de PSII comprende las dos proteínas integrales D1 y D2, las clorofilas del par especial (P_{680}) y otros transportadores electrónicos, y está asociado con un complejo generador de oxígeno sobre la superficie luminal. Unidos a las tres proteínas extrínsecas (33, 23 y 17 kDa) del complejo generador de oxígeno, hay cuatro iones manganesos (Mn, rojo), un ion Ca^{2+} (azul) y un ion Cl^- (amarillo). Estos iones unidos funcionan en el desdoblamiento del H_2O y mantienen el ambiente esencial para las altas velocidades de la generación de O_2 . La tirosina-161 (Y161) del polipéptido D1 conduce los electrones desde los iones Mn hasta la clorofila (P_{680}^-) del centro de reacción oxidado, reduciéndolo a su estado basal P_{680} . (Adaptado de C. Hoganson y G. Babcock, 1997, *Science* **277**:1953)

un electrón a partir de una molécula P_{680} , generando P_{680}^{+} . Al igual que en las bacterias púrpuras fotosintéticas, el electrón es transportado rápidamente, quizá a través de una clorofila accesoria hasta una feofitina, luego a una quinona (Q_A) y luego al aceptor primario de electrones (Q_B) sobre la superficie externa (estromal) de la membrana tilacoide (Figs. 12-39 y 12-40).

La clorofila del centro de reacción fotoquímicamente oxidada del PSII (la P_{680}^{+}) es el oxidante biológico *más fuerte* conocido. El potencial de reducción de P_{680}^{+} es más positivo que el del agua y por lo tanto puede oxidar agua para generar O_2 e iones H^{+} . Las bacterias fotosintéticas no pueden oxidar agua debido a que la clorofila a^{+} excitada en el centro de reacción bacteriano no es un oxidante lo suficientemente fuerte. Así, ellas utilizan otras fuentes de electrones, como el H_2S y el H_2 .

La oxidación de H_2O , que proporciona electrones para la reducción de P_{680}^+ en PSII, está catalizada por un complejo de tres proteínas, el *complejo generador de oxígeno*, localizado sobre la superficie luminal del PSII en la membrana tilacoide. El complejo generador de oxígeno contiene cuatro manganesos (Mn) conectados por átomos de oxígeno que forman puentes, así como iones Cl^- y Ca^{2+} unidos (Fig. 12-40); este es uno de los muy pocos casos en los cuales el manganeso cumple un papel en un sistema biológico. Estos iones manganesos junto con las tres proteínas intrínsecas se pueden eliminar del

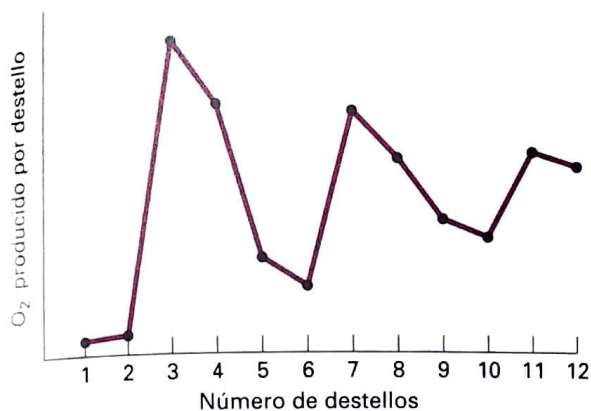


FIGURA EXPERIMENTAL 12-41 Un único PSII absorbe un fotón y transfiere un electrón cuatro veces hasta generar un O₂. Los cloroplastos adaptados a la oscuridad fueron expuestos a una serie de pulsos cortos, brevemente espaciados (5 ms), que activaron virtualmente todos los PSII en la preparación. El pico en la generación del O₂ se produjo después de cada cuarto pulso, indicando que la absorción de cuatro fotones por un PSII es necesaria para generar cada molécula de O₂. Debido a que los cloroplastos adaptados a la oscuridad inicialmente estaban en un estado parcialmente reducido, los picos en la generación de O₂ se produjeron después de destellos a 3, 7 y 11. (De J. Berg y cols., 2002, *Biochemistry*, 5th ed., W. H. Freeman and Company.)

centro de reacción por tratamiento con soluciones de sales concentradas; esto elimina la formación de O₂, pero no afecta la absorción de luz o las etapas iniciales del transporte de electrones.

La oxidación de dos moléculas de H₂O para formar O₂ requiere la eliminación de cuatro electrones, pero la absorción de cada fotón por el PSII da como resultado la transferencia de solo un electrón. Un experimento simple, descrito en la Figura 12-41, resolvió el interrogante de si la formación de O₂ depende de un PSII único o de múltiples fotosistemas que actúan concertadamente. El resultado indicó que un único PSII debe perder un electrón y luego oxidar el complejo generador de oxígeno cuatro veces seguidas para que se forme una molécula de O₂.

Se sabe que el manganeso existe en múltiples estados de oxidación con cargas positivas que van de dos a cinco. En efecto, los estudios espectroscópicos demostraron que los iones Mn unidos en el complejo generador de oxígeno alternan a través de cinco estados de oxidación diferentes, S₀-S₄. En este ciclo S, un total de dos moléculas de H₂O son escindidas para generar cuatro protones, cuatro electrones y una molécula de O₂. Se ha propuesto que los canales en la estructura del complejo que genera oxígeno, sirven como conductos para la distribución de H₂O en el sitio activo y la eliminación de O₂ del mismo a través de las proteínas que rodean el complejo que genera oxígeno. Los electrones liberados del H₂O son transferidos, de uno en uno, a través de los iones Mn y una cadena lateral de tirosina cercana sobre la subunidad D1 hasta el centro de reacción P₆₈₀, donde ellos regeneran la clorofila reducida, P₆₈₀⁻, el estado basal al reemplazar el electrón que fue eliminado por la absorción de luz. Los protones liberados del H₂O permanecen en el lumen tilacoide.

Los herbicidas que inhiben la fotosíntesis no solo son muy importantes en la agricultura sino que también han probado ser útiles en la disección de vías del transporte de fotoelectrones en las plantas. Una de estas clases de herbicidas, la *s*-triazina (p.ej., atrazina), se fija específicamente a la subunidad D1 en el centro de reacción PSII, inhibiendo así la unión de Q_B oxidada a su sitio sobre la superficie estromal de la membrana tilacoide. Cuando se añade a cloroplastos iluminados, la *s*-triazina produce la acumulación de todos los transportadores de electrones corriente abajo hasta acumularse en la forma oxidada, debido a que los electrones pueden ser liberados desde el PSII. En los mutantes resistentes a atrazina, un cambio de un único aminoácido en D1 la convierte en incapaz de fijar el herbicida, por ende la fotosíntesis procede a velocidades normales. Tales malezas resistentes prevalecen y representan un grave problema en la agricultura. ■

Múltiples mecanismos protegen a las células contra el daño de especies de oxígeno reactivas durante el transporte fotoelectrónico

Como hemos visto en el caso de las mitocondrias, las ROS generadas durante el transporte de electrones a través de la cadena de transporte electrónico (véase la Fig. 12-21) pueden servir tanto como señales para regular la función de los orgánulos como para causar daño a una variedad de biomoléculas. Lo mismo se cumple para los cloroplastos. Aunque los fotosistemas PSI y PSII con sus complejos de captación de luz asociados son notablemente eficaces al convertir la energía radiante en energía química útil en la forma de ATP y NADPH, estos no son perfectos. Dependiendo de la intensidad de la luz y de las condiciones fisiológicas de las células, una cantidad pequeña (pero significativa) de energía absorbida por las clorofilas en las antenas de captación de luz y en los centros de reacción resulta en clorofila que es convertida al estado excitado, llamado clorofila "triplete". En este estado, la clorofila puede transferir parte de su energía al oxígeno molecular (O₂), convirtiéndolo de su forma normal, el estado basal *relativamente* no reactivo llamado ³O₂, a una forma de estado singulete (ROS) extremadamente reactivo: ¹O₂. Parte de este ¹O₂ se puede utilizar para señalización del núcleo a fin de comunicarle el estado metabólico del cloroplasto al resto de la célula. Sin embargo, si la mayoría del ¹O₂ no es extinguido rápidamente mediante su reacción con las "moléculas barrederas" especializadas en ¹O₂, este reaccionará con moléculas cercanas y las dañará. Este daño puede eliminar la eficiencia de la actividad tilacoide y se denomina fotoinhibición. Los carotenoides (polímeros de grupos isoprenos insaturados, incluyendo el betacaroteno que le da a las zanahorias su color anaranjado) y el α-tocoferol (una forma de vitamina E) son moléculas pequeñas hidrófobas que cumplen funciones importantes como extintores de ¹O₂ para proteger las plantas. Por ejemplo, la inhibición de tocoferol en el alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* mediante el herbicida pirazolinato puede dar como resultado una mayor fotoinhibición inducida por luz. Los carotenoides, que son desviadores muy eficaces de la energía de la clorofila triplete dañina cuando se encuentran en la proximidad, son las moléculas más importantes desde el punto de vista cuantitativo para la prevención de la formación de ¹O₂. Existen alrededor de 11 moléculas de carotenoides y 35 clorofilas en el monómero PSII de la cianobacteria *Thermosynechococcus elongatus*.

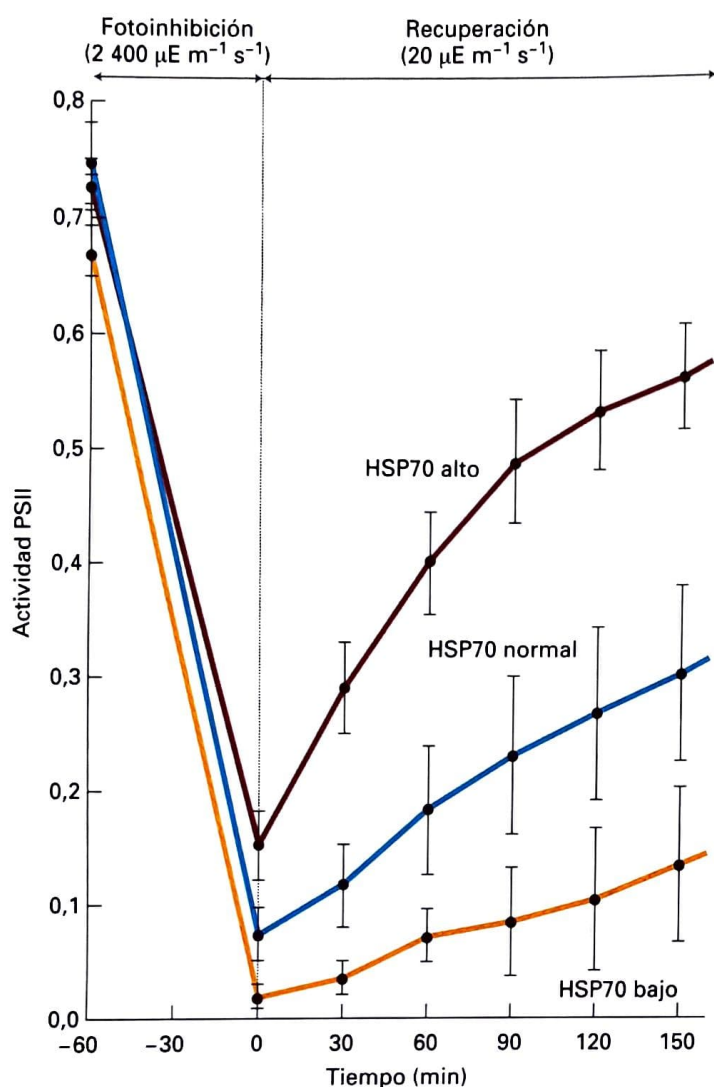


FIGURA EXPERIMENTAL 12-42 La chaperona HSP70B ayuda al PSII a recuperarse de la fotoinhibición después de la exposición a luz intensa.

El alga verde unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* fue genéticamente modificada, de manera tal que tuvo concentraciones anormalmente bajas o altas de la proteína chaperona HSP70B. Las cepas normales, las altas y las bajas fueron luego expuestas a luz de alta intensidad ($2400 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante 60 minutos para inducir la fotoinhibición seguida por la exposición a luz baja ($20 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante hasta 150 minutos. Los efectos de la fotoinhibición por la luz de alta intensidad y la capacidad del PSII de recuperarse de la fotoinhibición fueron medidos usando espectroscopia de fluorescencia para determinar la actividad de PSII. La capacidad de las células para recuperar la actividad de PSII depende de las concentraciones de HSP70B (cuanto más HSP70B disponible, más rápida es la recuperación), debido a la protección de HSP70B del PSII de los centros de reacción que habían resistido el daño de la subunidad D1 inducido por el $^1\text{O}_2$. (De Schroda y cols., 1999, *Plant Cell* 11:1 165).

En condiciones de iluminación intensa, el fotosistema PSII es en especial propenso a la generación de $^1\text{O}_2$, mientras que el PSI producirá otros ROS, incluyendo superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilos. La subunidad D1 en el centro de reacción de PSII (véase la Fig. 12-40) está, incluso en condiciones de poca luz, sometida a daño casi constante mediado por $^1\text{O}_2$. Un centro de reacción dañado se mueve desde la grana hasta las regiones no apiladas

del tilacoide, donde la subunidad D1 es degradada por una proteasa y reemplazada por una proteína D1 recién sintetizada en lo que se denomina ciclo de daño-reparación de la proteína D1. El reemplazo rápido de D1 dañada, que requiere una velocidad alta de síntesis de D1, contribuye a recuperar el PSII de la fotoinactivación y mantiene suficiente actividad. El experimento en la Figura 12-42 muestra que un componente importante en el ciclo de daño-reparación es la proteína chaperona HSP70B (véase el Cap. 3), que se une al PSII dañado y contribuye a evitar la pérdida de otros componentes del complejo a medida que la subunidad D1 es reemplazada. La extensión de la fotoinhibición puede depender de la cantidad de HSP70B disponible en los cloroplastos.

El flujo cíclico de electrones a través de PSI genera una fuerza protón-motriz, pero no NADPH ni O_2

Como ya hemos visto, los electrones de la ferredoxina reducida en PSI son transferidos al NADP^+ durante el flujo lineal de electrones, dando como resultado la producción de NADPH (véase la Fig. 12-39). En algunas circunstancias, tales como sequía, intensidad de luz alta o concentraciones de dióxido de carbono bajas, las células deben generar cantidades relativamente mayores de ATP en relación al NADPH de las producidas por el flujo cíclico de electrones. Para realizar esto, ellas producen fotosintéticamente ATP a partir de PSI sin producción de NADPH concomitante. Esto se logra usando un proceso independiente de PSII llamado *fotofosforilación cíclica* o *flujo cíclico de electrones*. En este proceso los electrones realizan un ciclo entre PSI, ferredoxina, plastoquinona (Q) y el complejo citocromo *bf* (Figura 12-43); de esta forma no se genera NADPH neto y no existe la necesidad de oxidar agua y producir O_2 . Existen dos vías de flujo cíclico de electrones: la *NAD(P)H deshidrogenasa (Ndh)-dependiente* (mostrada en la Fig. 12-43) y la *Ndh-independiente*. La Ndh es un complejo enzimático, muy similar al complejo mitocondrial I (véase la Fig. 12-16), que oxida NADPH o NADH mientras reduce Q a QH_2 y así contribuye a la fuerza protón-motriz mediante el transporte de protones. Durante el flujo cíclico de electrones, el sustrato para la Ndh es el NADPH generado por la absorción de luz por el PSI, la ferredoxina y la ferredoxina-NADP reductasa (FNR). El QH_2 formado por la Ndh luego difunde a través de la membrana tilacoide hasta el sitio de unión Q_0 sobre la superficie luminal del complejo citocromo *bf*. Se liberan dos electrones al complejo citocromo *bf* y dos protones al lumen tilacoide, generando una fuerza protón-motriz. Al igual que en el flujo lineal de electrones, estos electrones retornan al PSI a través de la plastocianina. Este flujo cíclico de electrones es similar al proceso cíclico que se produce en el único fotosistema de las bacterias púrpuras (véase la Fig. 12-38). Un ciclo Q funciona en el complejo citocromo *bf* durante el flujo cíclico de electrones, llevando al transporte de dos protones adicionales al lumen por cada par de electrones transportados y una mayor fuerza protón-motriz.

En el flujo cíclico de electrones Ndh-independiente, mecanismo que no ha sido completamente definido, los electrones de la ferredoxina se utilizan para reducir Q, ya sea a través de una hipotética membrana-asociada a la ferredoxina:plastoquinona oxidorreductasa (FQR) o a través del sitio Q_0 , que es parte del ciclo Q en el complejo citocromo *bf*. El análisis genético de *Arabidopsis thaliana* ha identificado diversos genes involucrados en el flujo cíclico de

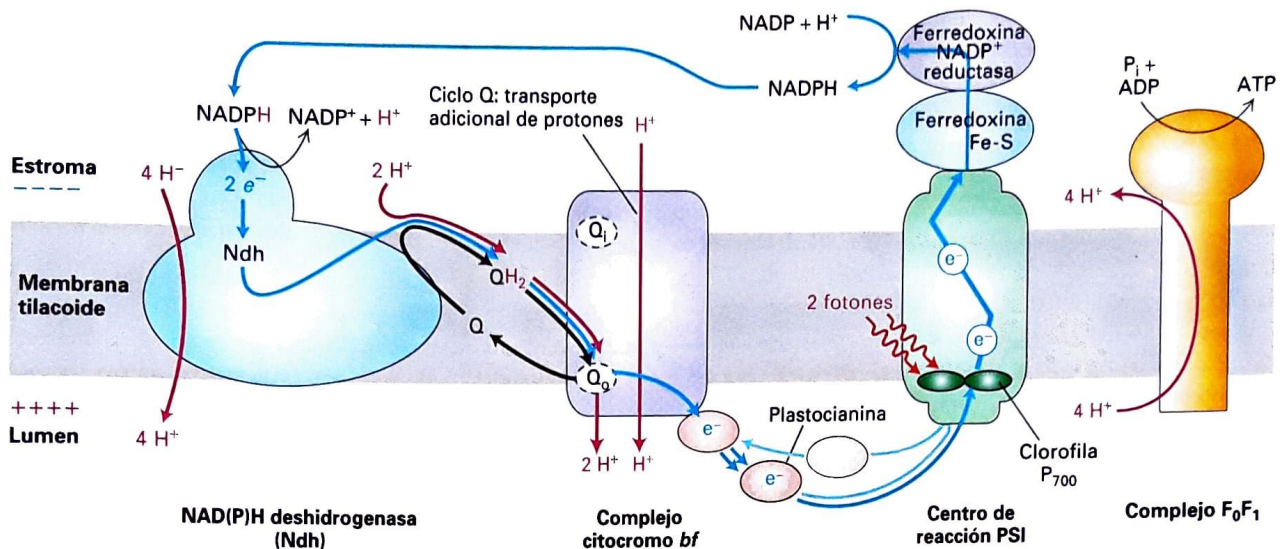


FIGURA 12-43 El flujo cíclico de electrones en las plantas, genera una fuerza protón-motriz y ATP, pero no oxígeno o NADPH neto. En la vía dependiente de NAD(P)H-deshidrogenasa (Ndh) para el flujo electrónico cíclico, la energía luminosa es utilizada por el PSI para transportar los electrones en un ciclo a fin de generar una fuerza protón-motriz y ATP sin oxidar agua. El NADPH formado por la vía del PSI/ferredoxina/FNR (en lugar de ser usado para

fixar carbono) es oxidado por Ndh. Los electrones liberados son transferidos hasta la plastocianina (Q) dentro de la membrana para generar QH₂, que luego transfiere los electrones hasta el complejo citocromo bf, después hasta la plastocianina y finalmente vuelven al PSI, como es el caso para el recorrido del flujo lineal de electrones (véase la Fig. 12-39).

electrones Ndh-independiente, incluyendo la proteína integral de membrana PGRL1.

La actividad relativa de los fotosistemas I y II está regulada

Para que el PSII, que se localiza preferentemente en la grana apilada y el PSI, que se localiza de manera predominante en la membrana tilacoide no apilada, actúen en secuencia durante el flujo lineal de electrones, se debe controlar la cantidad de energía lumínica distribuida a estos dos centros de reacción de manera tal que cada centro active la misma cantidad de electrones. Esta condición equilibrada se denomina estado 1 (Fig. 12-44a). Si los dos fotosistemas no son excitados por igual, entonces el flujo de electrones cíclico que se produce en el PSI y PSII se torna menos activo (estado 2). Variaciones en las longitudes de onda e intensidades en la luz ambiente (como consecuencia de momento del día, la nubosidad, etc.) pueden cambiar la activación relativa de los dos fotosistemas perturbando potencialmente las cantidades relativas del flujo lineal y cíclico necesarias para la producción de relaciones óptimas de ATP y NADPH.

Un mecanismo para la regulación de las contribuciones relativas de PSI y PSII, en respuesta a la variación en las condiciones de iluminación y por ende en las cantidades relativas de flujo lineal y cíclico de electrones, comprende la redistribución del complejo de captación de luz LHCII entre los dos fotosistemas. Cuanto más LHCII esté asociado con un fotosistema particular, más eficientemente será activado ese sistema por la luz y mayor será su contribución al flujo electrónico. La distribución del LHCII entre PSI y PSII está mediada por la fosforilación reversible y la desfosforilación del LHCII mediante una cinasa regulada asociada a la membrana y una fosfatasa

en apariencia constitutivamente activa. La forma desfosforilada de LHCII se asocia preferentemente con el PSII y la forma fosforilada se difunde en la membrana tilacoide a partir de la grana hasta la región no apilada y se asocia con el PSI más que la forma desfosforilada. Las condiciones de iluminación en las cuales existe absorción preferencial de luz por parte del PSII resultan en la producción de concentraciones elevadas de QH₂ que se unen al complejo citocromo bf (véase la Fig. 12-39). Los cambios conformacionales consecuentes en este complejo son aparentemente responsables de la activación de la cinasa LHCII, aumentando la fosforilación de LHCII, la actividad compensatoria incrementada del PSI en relación al PSII y por lo tanto, generando un incremento en el flujo cíclico de electrones en el estado 2 (Fig. 12-44a). Cuando el alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* fue forzada a entrar en el estado 2, se hizo posible aislar un "supercomplejo" conteniendo PSI, LHCI, LHCII, Cyt bf, ferredoxina (Fd), NADPH oxidorreductasa (FNR) y la proteína integral de membrana PGRL1 que participa en el flujo cíclico de electrones independiente de Ndh (Fig. 12-44b). Así, parece ser que el funcionamiento eficaz de las cadenas de transporte de electrones ha involucrado la evolución de complejos funcionales de tamaño y complejidad creciente, a partir de proteínas individuales a complejos, a supercomplejos y a supersupercomplejos.

La regulación de la organización supramolecular de los fotosistemas en plantas tiene el efecto de dirigirlos hacia la producción de ATP (estado 2) o hacia la generación de equivalentes reducidos (NADPH) y ATP (estado 1), dependiendo de las condiciones de iluminación del ambiente y de las necesidades metabólicas de la planta. Tanto el NADPH como el ATP son necesarios para la conversión de CO₂ a sacarosa o almidón, la cuarta etapa en la fotosíntesis, que se tratará en la última sección de este capítulo.

(a)

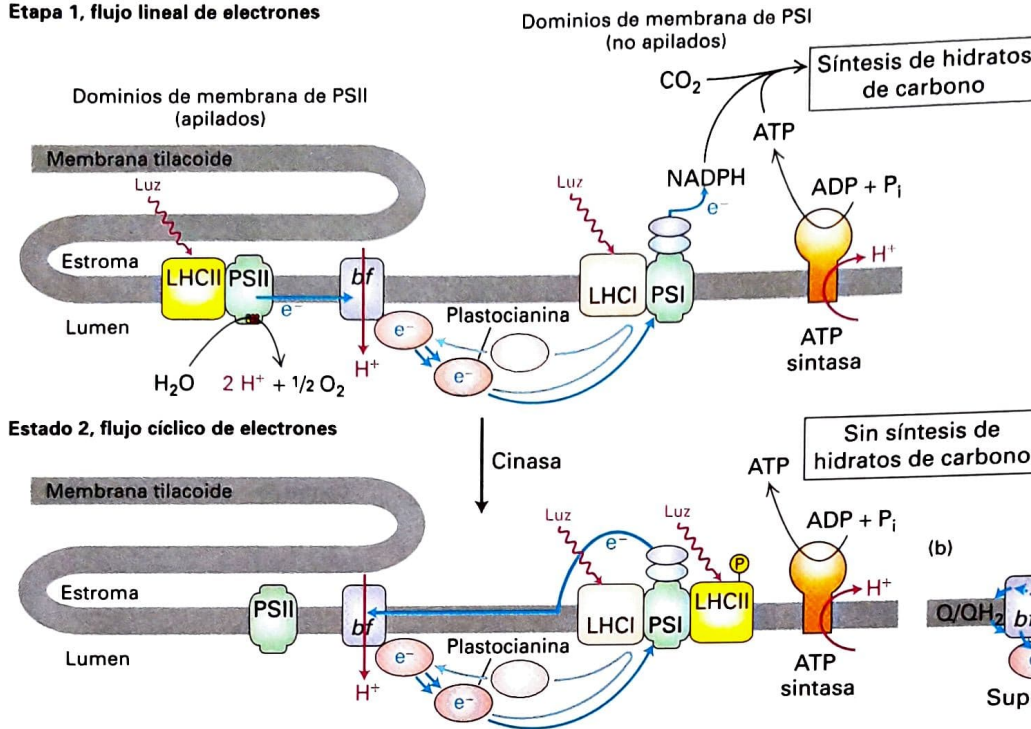
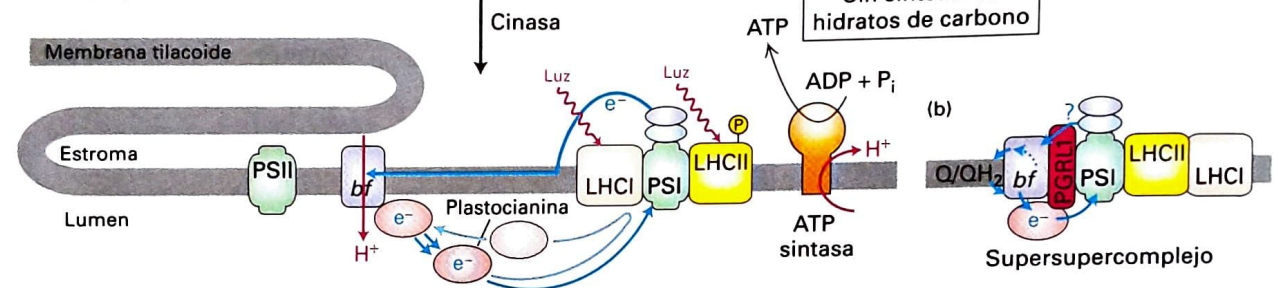
Etapla 1, flujo lineal de electrones**Estado 2, flujo cíclico de electrones**

FIGURA 12-44 Fosforilación del LHCII y regulación del flujo de electrones lineal vs. el cíclico. (a, arriba) En luz solar normal, el PSI y PSII se activan por igual y los fotosistemas están organizados en estado 1. En este ordenamiento, el complejo de captación de luz (LHCII) no está fosforilado y seis copias de LHCII junto con varias otras proteínas captadoras de luz encierran un centro de reacción PSII dimérico, en un supercomplejo asociado fuertemente en la grana (para mayor claridad, no se muestran los detalles moleculares del supercomplejo). Como resultado, el PSII y el PSI pueden funcionar en paralelo en el flujo lineal de electrones. (a, abajo) Cuando la excitación de la luz de los dos fotosistemas está desequilibrada (p. ej., demasiado a través del PSII), LHC se fosforila, se disocia del PSII y se difunde hasta las membranas no apiladas,

donde se asocia con el PSI y está permanentemente asociado con LHCI. En esta organización supramolecular alternativa (estado 2), la mayoría de la energía luminosa absorbida es transferida al PSI, dando sustento al flujo cíclico de electrones y a la producción de ATP, pero no a la formación de NADPH y por ende tampoco a la fijación del CO_2 . (b) Modelo de un "supersupercomplejo" PSI involucrado con el flujo cíclico de electrones independiente de Ndh, aislado a partir de las algas verdes en la etapa 2. El supersupercomplejo contiene múltiples complejos que incluyen la proteína integral de membrana PGRL1, el cual fue identificado por análisis genético (Adaptado de F. A. Wollman, 2001, *EMBO J.* 20:3 623; y M. Iwai, y cols., 2010, *Nature* 464:1 210-1 213.)

CONCEPTOS CLAVES de la Sección 12.6**Análisis molecular de los fotosistemas**

- En el único fotosistema de las bacterias púrpuras, el flujo cíclico de electrones de las moléculas de clorofila *a* del par especial (excitadas por la luz en el centro de reacción) genera una fuerza protón-motriz, la cual es utilizada principalmente para impulsar la síntesis de ATP mediante el complejo F_0F_1 en la membrana plasmática (véase la Fig. 12-38).
- Las plantas contienen dos fotosistemas, PSI y PSII, que tienen funciones diferentes y están físicamente separados en la membrana tilacoide. El PSII convierte el H_2O en O_2 y el PSI reduce el NADP^+ a NADPH. Las cianobacterias tienen dos fotosistemas análogos.
- En los cloroplastos, la energía lumínica absorbida por los complejos de captación de luz (LHC) es transferida a las moléculas de clorofila *a* en los centros de reacción (P_{680} en el PSII y P_{700} en el PSI).
- Los electrones fluyen a través del PSII a través de los mismos transportadores que están presentes en el fotosistema bacteriano. En contraste

con el sistema bacteriano, el P_{680}^+ oxidado fotoquímicamente en el PSII es regenerado a P_{680} mediante electrones derivados de la evolución del O_2 a partir de H_2O (véase la Fig. 12-39, izquierda).

- En el flujo de electrones, el P_{700}^+ oxidado fotoquímicamente en el PSI es reducido regenerando P_{700} , mediante electrones transferidos a partir del PSII a través del complejo citocromo *bf* y la plastocianina soluble. Los electrones liberados desde el P_{700} después de la excitación del PSI son transportados a través de diversos transportadores hasta que finalmente llegan a NADP^+ , generando NADPH (véase la Fig. 12-39, derecha).
- La absorción de luz por parte de los pigmentos en el cloroplasto puede generar especies reactivas de oxígeno (ROS), que incluyen oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). En cantidades pequeñas no son tóxicas y se utilizan como moléculas de señalización intracelular para controlar el metabolismo celular. En cantidades más grandes pueden tornarse tóxicas. Las pequeñas moléculas barrenderas y las enzimas antioxidantes contribuyen a proteger contra el daño inducido por las ROS; sin embargo, aún se produce el daño del oxígeno.

no singlete a la subunidad D1 de PSII, causando fotoinhibición. Una chaperona HSP70 contribuye a la recuperación del daño.

• Al contrario del flujo lineal de electrones, que requiere tanto el PSII como el PSI, el flujo cíclico de electrones en las plantas involucra solo al PSI. En esta vía, no se forma ni NADPH ni O_2 , aunque se genera una fuerza protón-motriz. Supercomplejos muy grandes pueden estar involucrados en el flujo cíclico de electrones.

• La fotofosforilación reversible y la desfosforilación del complejo de captación de luz II (LHCII) controlan la organización funcional del aparato fotosintético en las membranas tilacoides. El estado 1 favorece el flujo lineal de electrones, mientras que el estado 2 favorece el flujo cíclico de electrones (véase la Fig. 12-44).

12.7 Metabolismo del CO_2 durante la fotosíntesis

Los cloroplastos llevan a cabo muchas reacciones metabólicas en las hojas verdes. Además de la fijación del CO_2 (la incorporación de CO_2 gaseoso a moléculas orgánicas pequeñas y otros azúcares), la síntesis de casi todos los aminoácidos, de todos los ácidos grasos y carotenos, de todas las pirimidinas y probablemente de todas las purinas, se produce en los cloroplastos. Sin embargo, la síntesis de azúcares a partir de CO_2 es la vía bioquímica más extensamente estudiada en las células vegetales. Primero consideraremos la única vía, conocida como **ciclo de Calvin** (por su descubridor Melvin Calvin), que fija el CO_2 en compuestos de tres carbonos, impulsado por la energía liberada durante la hidrólisis de ATP y la oxidación de NADPH.

La rubisco fija el CO_2 en el estroma del cloroplasto

La enzima **ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa**, o **rubisco**, fija el CO_2 en moléculas precursoras que son posteriormente convertidas a hidratos de carbonos. La rubisco se localiza en el espacio estromal del cloroplasto. Esta enzima añade CO_2 al azúcar de cinco carbonos ribulosa 1,5-bifosfato para formar dos moléculas de tres carbonos conteniendo 3-fosfoglicerato (Fig. 12-45). La rubisco es una enzima grande (~ 500

kDa), con la forma más común compuesta de ocho subunidades grandes idénticas y ocho pequeñas idénticas. Una subunidad está codificada en el DNA del cloroplasto; la otra, en el DNA nuclear. Debido a que la velocidad catalítica de la rubisco es bastante lenta, se necesitan muchas copias de la enzima para fijar suficiente CO_2 . En efecto, esta enzima constituye casi el 50% de la proteína soluble del cloroplasto y se cree que es la proteína más abundante sobre la tierra. Se estima que la rubisco fija más de 10^{11} toneladas de CO_2 atmosférico cada año.

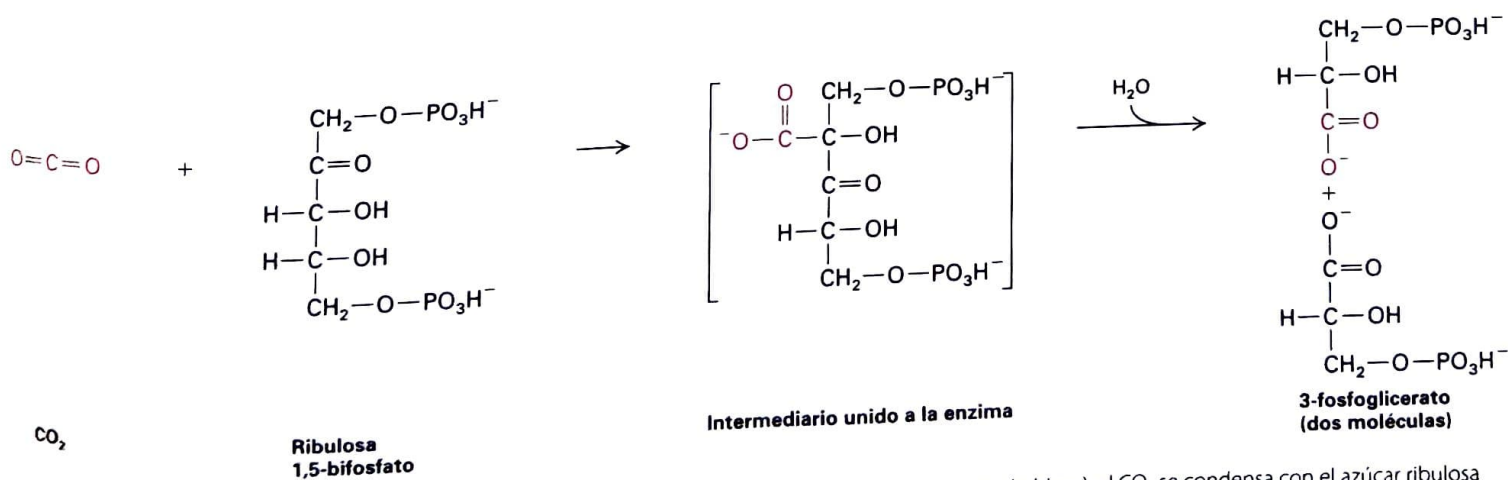
Cuando las algas fotosintéticas son expuestas a un pulso breve de CO_2 marcado con ^{14}C y las células luego son rápidamente disgregadas, el 3-fosfoglicerato es el que más rápido adquiere una marca radioactiva y toda la radioactividad se encuentra en el grupo carboxilo. Debido a que el CO_2 es inicialmente incorporado a un compuesto de tres carbonos, el ciclo de Calvin también se denomina *vía C_3* de la fijación del carbono (Fig. 12-46).

El destino del 3-fosfoglicerato formado por la rubisco es complejo: parte es convertido a hexosas incorporadas en el almidón de la sacarosa, pero parte es utilizada para regenerar ribulosa 1,5-bifosfato. Se necesitan al menos nueve enzimas para regenerar ribulosa 1,5-bifosfato a partir de 3-fosfoglicerato. Cuantitativamente, por cada 12 moléculas de 3-fosfoglicerato generado por la rubisco (un total de 36 átomos de C), dos de ellos (6 átomos de C) son convertidos a dos moléculas de gliceraldehído 3 fosfato (y luego a una hexosa), mientras 10 moléculas (30 átomos de C) son convertidos a seis moléculas de ribulosa 1,5 bifosfato (Fig. 12-46, arriba). La fijación de seis moléculas de CO_2 y la formación neta de dos gliceraldehído 3-fosfato requiere el consumo de 18 ATP y 12 NADPH, generados por los procesos de la fotosíntesis que requieren luz.

La síntesis de sacarosa usando CO_2 fijado se completa en el citosol

Después de su formación en el estroma del cloroplasto, el gliceraldehído 3-fosfato es transportado al citosol en intercambio por el fosfato. Los pasos finales de la síntesis de sacarosa (Fig. 12-46, arriba) se producen en el citosol de las células de las hojas.

Una proteína transportadora antiportadora en la membrana del cloroplasto trae CO_2 fijado (como gliceraldehído 3-fosfato) al citosol



1,5-bifosfato carboxilasa (rubisco), el CO_2 se condensa con el azúcar ribulosa 1,5-bifosfato. Los productos son dos moléculas de 3-fosfoglicerato.

FIGURA 12-45 La reacción inicial de la rubisco que fija CO_2 en compuestos orgánicos. En esta reacción, catalizada por la rubulosa

FIGURA 12-46 La vía del carbono durante la fotosíntesis. (Arriba) Seis moléculas de CO_2 son convertidas en dos moléculas de gliceraldehído 3-fosfato. Estas reacciones, que constituyen el ciclo de Calvin, se producen en el estroma del cloroplasto. Vía del antiportador fosfato/triosa fosfato; parte del gliceraldehído 3-fosfato es transportado al citosol en intercambio con fosfatos. (Abajo) En el citosol, una serie exergónica de reacciones convierte el gliceraldehído 3-fosfato en fructosa 1,6-bisfosfato. Las dos moléculas de fructosa 1,6-bisfosfato son utilizadas para sintetizar uno de los disacáridos sacarosa. Parte del gliceraldehído 3-fosfato (aquí no se muestra) también es convertido a aminoácidos y grasas, compuestos esenciales para el crecimiento de las plantas.

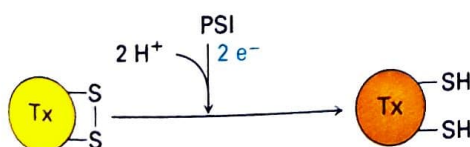
cuando la célula está exportando vigorosamente. Ningún CO_2 fijado deja el cloroplasto a menos que el mismo sea provisto con fosfato para reemplazar el fosfato llevado a cabo del estroma en la forma de gliceraldehído 3-fosfato. Durante la síntesis de sacarosa a partir de gliceraldehído 3-fosfato, se liberan los grupos de fosfato inorgánico (Fig. 12-46, parte inferior izquierda). Por lo tanto, la síntesis de sacarosa facilita el transporte de gliceraldehído 3-fosfato desde el cloroplasto hasta el citosol mediante provisión de fosfato para el antiporte. Cabe destacar que el gliceraldehído 3-fosfato es un intermediario glucolítico y que el mecanismo de la conversión de gliceraldehído 3-fosfato a hexosas es casi la inversa de esto en la glucólisis.

La síntesis de almidón es más compleja. El monómero clave más grande utilizado para construir los polímeros de almidón es la ADP-glucosa. Esta polimerización ocurre en el estroma y los polímeros de almidón están almacenados en agregados cristalinos densamente empaquetados llamados gránulos. Las enzimas que generan ADP-glucosa a partir de glucosa 1-fosfato y ATP se encuentran ambas en el estroma y en el citosol, indicando que las hexosas de varias estructuras en el citosol son importadas al estroma para la síntesis del almidón.

La luz y la rubisco activasa estimulan la fijación del CO_2

Las enzimas del ciclo de Calvin que catalizan la fijación del CO_2 son rápidamente inactivadas en la oscuridad, conservando así el ATP que es generado en esta (por ejemplo por la degradación del almidón) para otras reacciones sintéticas, tales como la biosíntesis de lípidos y aminoácidos. Un mecanismo que contribuye a este control es la dependencia de pH de diversas enzimas del ciclo de Calvin. Debido a que los protones son transportados desde el estroma al interior del lumen tilacoide durante el transporte fotoelectrónico (véase la Fig. 12-39), el pH del estroma se incrementa desde ~ 7 en la oscuridad, hasta ~ 8 en la luz. La actividad incrementada de diversas enzimas del ciclo de Calvin al pH más alto estimula la fijación del CO_2 en la luz.

Una proteína estromal llamada *tiorredoxina* (Tx) también cumple una función en el control de algunas enzimas del ciclo de Calvin. En la oscuridad, la tiorredoxina contiene un enlace disulfuro; en la luz, los electrones son transferidos desde el PSI a través de la ferredoxina hasta la tiorredoxina, reduciendo su enlace disulfuro:



La tiorredoxina reducida luego activa diversas enzimas del ciclo de Calvin mediante la reducción de sus enlaces disulfuro. En la oscuridad, cuando la tiorredoxina se vuelve a oxidar, estas enzimas se reoxidan y se inactivan. Así, estas enzimas son sensibles al estado redox del estroma que a su vez es sensible a la luz: un mecanismo sofisticado para la regulación de la actividad enzimática por la luz.

La rubisco es una de tales enzimas sensibles a la luz/redox, aunque su regulación es muy compleja e incluso no ha sido comprendida por completo. La rubisco es activada espontáneamente en presencia de concentraciones elevadas de CO_2 y Mg^{2+} . La reacción de activación comprende la adición covalente de CO_2 al grupo amino de la cadena lateral de una lisina en el sitio activo, formando un grupo carbamato que luego une un ion Mg^{2+} necesario para la actividad enzimática. Sin embargo en condiciones normales, con niveles de CO_2 , la reacción es lenta y suele requerir catálisis por parte de la *rubisco activasa*, un miembro de la AAA+ familia de las ATPasas. La rubisco activasa hidroliza ATP y utiliza la energía liberada para despejar el sitio activo de la rubisco, de manera tal que el CO_2 se pueda añadir al sitio activo de lisina. La rubisco activasa también acelera un cambio conformacional activante en la rubisco (de un estado cerrado-inactivo a uno abierto-activo). La regulación de la rubisco activasa por la tiorredoxina es, al menos en parte en algunas especies, responsable de la actividad de la activasa es sensible a la relación ATP:ADP. Si la proporción es baja (ADP relativamente alta), en consecuencia la activasa no activará la rubisco (y de esta manera la célula gastará menos de su escaso ATP para fijar el carbono). La fotosíntesis es sensible a una variedad de tensiones típicas de las plantas: calor moderado, temperaturas frías, sequía (agua limitada), alta salinidad, alta intensidad de luz y radiación UV. Al menos parte de esto influye en la fijación de CO_2 al reducir la actividad de la rubisco activasa y por ende la rubisco. La inhibición de la fijación de CO_2 reduce el consumo de NADPH. En condiciones de luz fuerte la relación en exceso de NADPH/NADP⁺ puede reducir el flujo de electrones al NADP⁺ e incrementar la fuga de O_2 , dando como resultado la formación de ROS aumentada, que puede interferir con una variedad de procesos celulares. Dada la función clave de la rubisco en el control de la utilización de la energía y la afluencia de carbono (ambos en un cloroplasto individual y, en un sentido, a través de la biosfera entera) no es sorprendente que su actividad esté fuertemente regulada.

La fotorrespiración compite con la fijación del carbono y está reducida en las plantas C_4

Como se mencionó anteriormente, la rubisco cataliza la incorporación de CO_2 en la ribulosa 1,5-bisfosfato como parte de la fotosíntesis. Puede catalizar una segunda reacción *competitiva*, diferente, con los mismos sustratos (ribulosa 1,5-bisfosfato) pero con O_2 en lugar de CO_2 como un segundo sustrato, en un proceso conocido como **fotorrespiración** (Fig. 12-47). Los productos de la segunda reacción son una molécula de 3-fosfoglicerato y una molécula de fosfoglicolato compuesta por dos carbonos. La reacción de fijación del carbono está favorecida cuando la concentración de CO_2 ambiental es relativamente alta, mientras que la fotorrespiración está favorecida cuando el CO_2 es bajo y el O_2 relativamente alto. La fotorrespiración ocurre en presencia de luz, consume O_2 y convierte la ribulosa 1,5-bisfosfato en parte a CO_2 . Como se muestra en la Figura 12-47, la

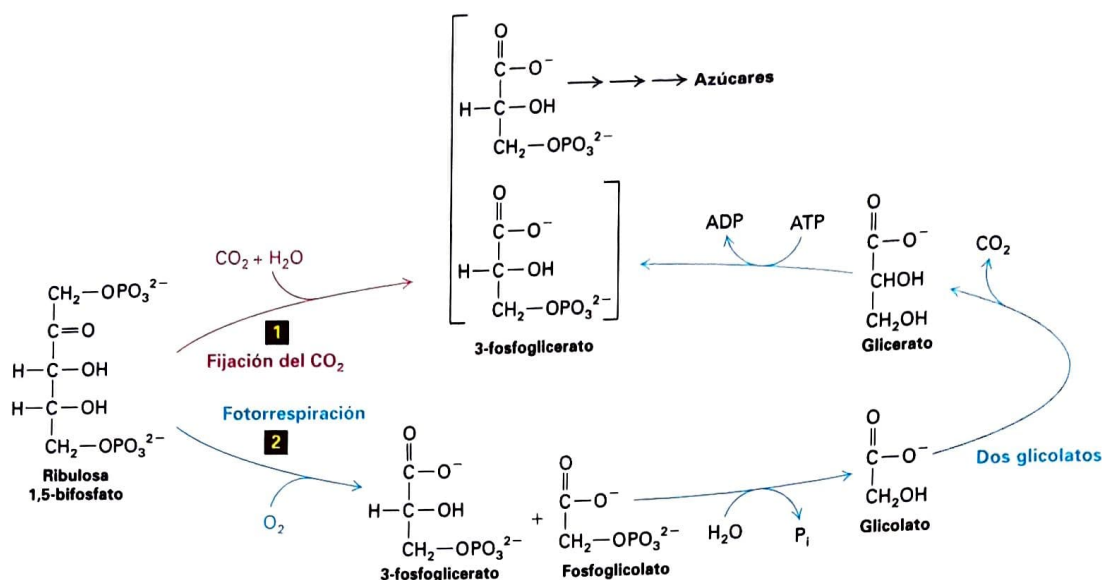


FIGURA 12-47 Fijación del CO_2 y fotorrespiración. Estas vías competitivas son ambas iniciadas por la ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa (rubisco) y ambas utilizan la ribulosa 1,5-bisfosfato. La fijación del CO_2 , la vía 1, está favorecida por presiones elevadas de CO_2 y bajas de O_2 ; la fotorrespiración, vía 2, se produce a presiones bajas de CO_2 y altas de O_2 (esto es, en condiciones atmosféricas normales). El fosfoglicerato es reciclado a través de un grupo complejo de

reacciones que ocurren en los peroxisomas y las mitocondrias, así como también en los cloroplastos. El resultado neto: por cada dos moléculas de fosfoglicerato formado por la fotorrespiración (cuatro átomos de C), finalmente se forma y se recicla una molécula de 3-fosfoglicerato y se pierde una molécula de CO_2 .

fotorrespiración es derrochadora para la economía energética de la planta: consume ATP y O_2 , además de generar CO_2 sin fijar carbono. En efecto, cuando el CO_2 es bajo y el O_2 es alto, mucho del CO_2 fijado por el ciclo de Calvin se pierde como resultado de la fotorrespiración. Estudios recientes sugieren que esta reacción alternativa sorprendentemente derrochadora catalizada por la rubisco, puede ser una consecuencia de la inherente dificultad que tiene la enzima en unir de manera específica las moléculas de CO_2 relativamente sin rasgos distintivos y de la capacidad tanto del CO_2 como del O_2 en reaccionar y formar productos diferentes, con el mismo intermediario inicial enzima/ribulosa 1,5-bisfosfato.

El exceso de fotorrespiración podría tornarse un problema para las plantas en un ambiente cálido y seco, debido a que deben mantener cerrados mucho tiempo los poros que intercambian gases (estomas) en sus hojas, para evitar la pérdida excesiva de humedad. Como consecuencia, la concentración de CO_2 dentro de la hoja puede descender por debajo de la K_m de la rubisco para el CO_2 . En estas condiciones, la velocidad de la fotosíntesis disminuye, la fotorrespiración se ve en gran medida favorecida y la planta podría estar en peligro de fijar cantidades inadecuadas de CO_2 . El maíz, la caña de azúcar, la grama y otras plantas que crecen en ambientes cálidos y secos, han desarrollado una vía para evitar este problema mediante la utilización de una vía de dos pasos de fijación del CO_2 , en la cual el paso de acumulación de CO_2 precede al ciclo de Calvin. La vía se denomina *vía C_4* dado que la marcación con ^{14}C demostró que las primeras moléculas radioactivas formadas durante la fotosíntesis en esta vía son compuestos de cuatro carbonos, como el oxalacetato y el malato, en lugar de las moléculas de tres carbonos que inician el ciclo de Calvin (*vía C_3*).

La vía C_4 involucra dos tipos de células: las *células mesófilas*, que están adyacentes a los espacios aéreos en el interior de la hoja y las

células de la vaina fascicular, que rodean el tejido vascular y son secuestradas lejos de las concentraciones altas de O_2 a las cuales están expuestas las células mesófilas (Fig. 12-48a). En las células mesófilas de las plantas C_4 , el fosfoenolpiruvato (una molécula de tres carbonos derivada del piruvato) reacciona con el CO_2 para generar oxalacetato, un compuesto de cuatro carbonos (Fig. 12-48b). La enzima que cataliza esta reacción, la *fosfoenolpiruvato carboxilasa*, se encuentra casi exclusivamente en las plantas C_4 y a diferencia de la rubisco es insensible al O_2 . La reacción global desde piruvato hasta oxalacetato involucra la hidrólisis de ATP y tiene un ΔG negativo. Por lo tanto, la fijación de CO_2 procederá incluso cuando la concentración de CO_2 es baja. El oxalacetato formado en las células mesófilas es reducido a malato, el cual es transferido por un transportador especial hasta las células de la vaina fascicular, donde el CO_2 liberado por descarboxilación entra en el Ciclo de Calvin (Fig. 12-48b).

Debido al transporte de CO_2 desde las células mesófilas, la concentración de CO_2 en las células de la vaina fascicular de las plantas C_4 es mucho más alta que la existente en la atmósfera normal. Las células de la vaina fascicular también son inusuales en el sentido de que carecen de PSII y llevan a cabo solo flujo cíclico de electrones catalizado por PSI, de manera tal que no se produce O_2 . Las concentraciones altas de CO_2 y reducidas de O_2 en las células de la vaina fascicular favorecen la fijación de CO_2 por parte de la rubisco, a fin de formar 3-fosfoglicerato e inhibe la utilización de ribulosa 1,5-bisfosfato en la fotorrespiración.

Por el contrario, la alta concentración de O_2 en la atmósfera favorece la fotorrespiración en las células mesófilas de las plantas C_3 (vía 2 en la Fig. 12-47); como resultado, hasta el 50% del carbono fijado por la rubisco puede ser oxidado a CO_2 en las plantas C_3 . Las plantas C_4 son superiores a las plantas C_3 al utilizar el CO_2 disponible, debido

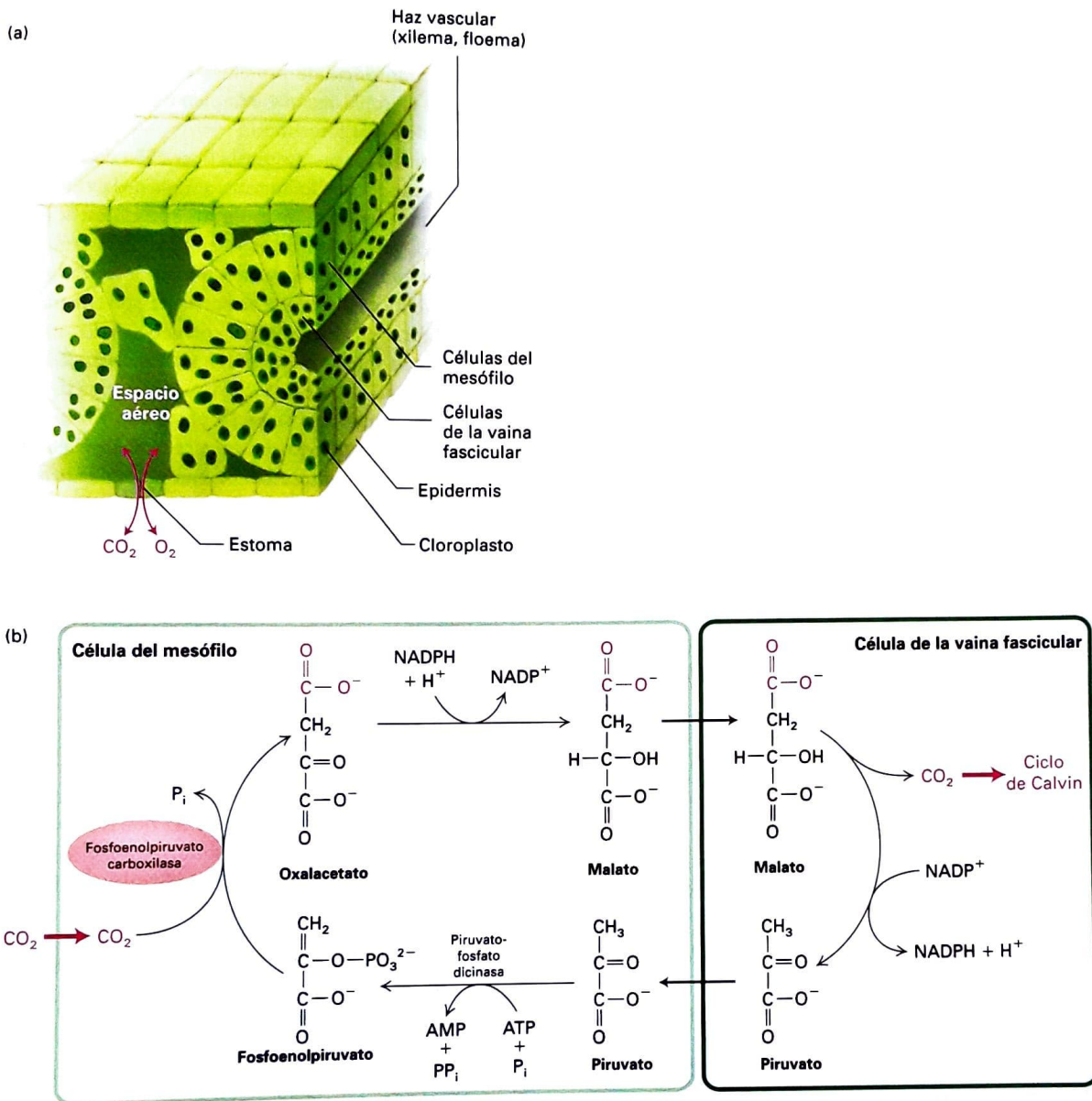


FIGURA 12-48 Anatomía de la hoja de las plantas C_4 y la vía C_4 . (a) En las plantas C_4 , las células de la vaina fascicular se alinean en haces vasculares que contienen el xilema y el floema. Las células mesófilas, que están adyacentes a los espacios aéreos subestromales, pueden asimilar el CO_2 y formar moléculas de cuatro carbonos a bajo CO_2 ambiental y llevarlo al interior de las células de la vaina fascicular. Las células de la vaina fascicular contienen abundantes cloroplastos y son los sitios de fotosíntesis y sacarosa. La sacarosa es llevada al

resto de la planta a través del floema. En las plantas C_3 , que carecen de células de la vaina fascicular, el ciclo de Calvin funciona en las células mesófilas para fijar CO_2 . (b) La enzima clave en la vía C_4 es la fosfoenolpiruvato carboxilasa, que asimila el CO_2 para formar el oxalacetato en las células mesófilas. La descarboxilación del malato u otros intermediarios C_4 en las células de la vaina fascicular liberan CO_2 , que entra en el ciclo de Calvin estándar (véase la Fig. 12-46, arriba).

a que la enzima de C_4 fosfoenolpiruvato carboxilasa tiene una mayor afinidad por el CO_2 que la rubisco en el ciclo de Calvin. Sin embargo, en el proceso cíclico de C_4 , un ATP es convertido a un AMP (para generar fosfoenolpiruvato a partir de piruvato); así, la eficiencia general de la producción fotosintética de azúcares a partir de NADPH y ATP es menor que la existente en las plantas C_3 , que utilizan solo el ciclo de Calvin para la fijación de CO_2 . No obstante, las velocidades netas de fotosíntesis para las plantas C_4 , tales como el maíz o la caña de azúcar,

pueden ser dos a tres veces las velocidades de las plantas C_3 como el trigo, el arroz o la avena, debido a la eliminación de las pérdidas de la fotorrespiración.

De los dos productos de hidratos de carbono de la fotosíntesis, el almidón permanece en las células mesófilas de las plantas C_3 y de las células de la vaina fascicular en las plantas C_4 . En estas células el almidón es sometido a glucólisis, principalmente en la oscuridad, formando ATP, NADH y pequeñas moléculas que son usadas como monómeros

para la síntesis de aminoácidos, lípidos y otros constituyentes celulares. La sacarosa, por el contrario, es exportada de las células fotosintéticas y transportadas a través de toda la planta.

CONCEPTOS CLAVES de la Sección 12.7

Metabolismo del CO_2 durante la fotosíntesis

- En el ciclo de Calvin, el CO_2 se fija en moléculas orgánicas en una serie de reacciones que se producen en el estroma de los cloroplastos. La reacción inicial, catalizada por la rubisco, forma un intermediario de tres carbonos. Algunos de los gliceraldehídos 3-fosfato generados en el ciclo son transportados al citosol y convertidos en sacarosa (véase la Fig. 12-46).
- La activación dependiente de la luz de diversas enzimas del ciclo de Calvin y otros mecanismos, incrementa la fijación de CO_2 en la luz. El estado redox del estroma cumple un papel en esta regulación tal como lo es la regulación de la actividad de la rubisco por parte de la rubisco activasa.
- En la planta C_3 , una fracción sustancial del CO_2 fijado por el Ciclo de Calvin se puede perder como consecuencia de la fotorrespiración, una reacción derrochadora catalizada por la rubisco que está favorecida a concentraciones bajas de CO_2 y altas de O_2 (véase la Fig. 12-47).
- En las plantas C_4 , el CO_2 es fijado inicialmente en las células mesófilas externas por reacción con el fosfoenolpiruvato. Las moléculas de cuatro carbonos así generadas son enviadas al interior de las células de la vaina fascicular, donde el CO_2 es liberado y luego usado en el ciclo de Calvin. La velocidad de la fotorrespiración en las plantas C_4 es mucho menor que la de las plantas C_3 .

Perspectivas para el futuro

Aunque los procesos generales de fotosíntesis y oxidación mitocondrial son bien comprendidos, faltan por descubrirse muchos detalles importantes. Por ejemplo, mientras que se está comenzando a determinar de manera creciente estructuras de alta resolución de los complejos y de los supercomplejos, quedan por ser establecidos muchos de los detalles mecánicos que subyacen a la función y regulación de las cadenas de transporte de electrones y sus reacciones asociadas (translocación de protones, generación de oxígeno, etc.). El movimiento más allá de este cuadro estático de estas estructuras notablemente complejas requiere de análisis biofísicos adicionales sobre la dinámica que subyace a sus actividades. Por ejemplo, no sabemos con certeza la vía que toman los protones durante el bombeo de protones de algunos complejos transportadores de electrones.

Aunque el mecanismo de unión-cambio para la síntesis de ATP por parte del complejo F_0F_1 es aceptado en la actualidad, no se sabe con precisión cómo están acoplados los cambios conformacionales en cada subunidad β a la unión cíclica del ADP y P_i , la formación del ATP y luego a la liberación del ATP. Tampoco se han definido los de-

talles de la vía de movimiento de protones a través del anillo c. Además, quedan muchos interrogantes acerca del mecanismo de acción preciso del transporte de proteínas en la membrana mitocondrial interna y de cloroplastos que cumplen funciones clave en la fosforilación oxidativa y la fotosíntesis.

En la actualidad, se sabe que la liberación del citocromo c y otras proteínas desde el espacio intermembrana de la mitocondria hacia el citosol cumple una función importante en el desencadenamiento de la apoptosis (Cap. 21). Ciertos miembros de la familia Bcl-2 de las proteínas apoptóticas y los canales iónicos localizados en parte en la membrana mitocondrial externa participan de este proceso. Las consecuencias entre el metabolismo energético y los mecanismos que subyacen a la apoptosis permanecen sin ser clarificados.

El reconocimiento de la década pasada acerca de la importancia de las dinámicas mitocondriales (p. ej., fusión y fisión) de la función mitocondrial ha sentado las bases para el análisis genético molecular detallado de estos procesos. Se han identificado varios de estos elementos clave en la fisión y la fusión, pero queda por descubrir muchos componentes adicionales y el mecanismo de estos procesos complejos, como la fusión coordinada de las membranas internas entre sí y de las membranas externas entre sí, aguarda ser elucidado.

La función de las especies reactivas del oxígeno (ROS) constituye un área activa de investigación en biología. Actualmente se cree que el estrés celular mediado por ROS cumple una función en muchas enfermedades y continuará siendo un área importante de investigación en los años entrantes. Además de su función en el estrés oxidativo celular, las ROS también pueden servir como moléculas de señalización que alteran la expresión de genes nucleares, a veces llamado señalización retrógrada. Parece ser que ROS y otras moléculas pequeñas liberadas a partir de la mitocondria y los cloroplastos se pueden usar para informar al núcleo acerca del estado metabólico de cada orgánulo y así permitir la regulación adecuada de la expresión génica en respuesta. En algunos casos esto involucra la activación compensatoria de genes de protección. En otros, puede involucrar el incremento o la disminución de la producción de proteínas codificadas en el núcleo para asegurar el adecuado funcionamiento del orgánulo. Queda por determinar los mecanismos de estas vías de señalización, que en algunos casos implica reacciones redox con tioles sobre moléculas de señalización.

Como comprendemos mejor los mecanismos que subyacen a la fotosíntesis, en particular la acción de la rubisco (tanto su regulación y su influencia sobre la fotosíntesis y el metabolismo general del cloroplasto), es probable que seamos capaces de explotar estas ideas para mejorar los rendimientos de los cultivos a fin de proporcionar alimento abundante y económico a todos los que lo necesitan.

Palabras clave

oxidación aeróbica 517
ATP sintasa 544
mecanismo de
cambio-unión 547
ciclo de Calvin 567
fijación del carbono 553

catabolismo 520
vía C_4 570
quimiosmosis 518
clorofilas 552
cloroplasto 552
ciclo del ácido cítrico 520

coenzima Q 535	transporte fotoelectrónico 556
citocromo 535	fotorrespiración 569
transportador de electrones 529	fotosíntesis 517
cadena de transporte de electrones 519	fotosistema 555
hipótesis endosimbiótica 545	grupo prostético 534
fermentación 522	fuerza protón-motriz 519
flavina adenina dinucleótido (FAD) 520	ciclo Q 538
complejo F_0F_1 544	especies reactivas de oxígeno 541
glucólisis 520	potencial de reducción 539
mitocondria 524	respiración 519
membrana mitocondrial interna	control respiratorio 551
nicotinamida adenina dinucleótido (NAD ⁺) 520	rubisco 567
fosforilación oxidativa 519	fosforilación a nivel de sustrato 520
oxidación peroxisómica 531	tilacoides 553
	desacoplante 551

Revisión de los conceptos

1. La fuerza protón-motriz (pmf) es esencial para la función de las mitocondrias y de los cloroplastos. ¿Qué produce la pmf y cuál es la relación con el ATP? El compuesto 2,4-dinitrofenol (DNP), que se utilizó en las píldoras para adelgazar en la década de 1930 pero que más tarde se demostró que tienen efectos colaterales nocivos, permite a los protones difundir a través de la membrana. ¿Por qué es peligroso consumir DNP?

2. La membrana mitocondrial interna presenta todas las características fundamentales de la membrana celular, pero también tiene varias características únicas que están muy asociadas con su función en la fosforilación oxidativa. ¿Cuáles son estas características únicas? ¿Cómo contribuyen a la función de la membrana interna?

3. La producción máxima de ATP a partir de glucosa involucra las reacciones de la glucólisis, el ciclo del ácido cítrico y la cadena de transporte de electrones. ¿Cuáles de estas reacciones requieren O_2 y por qué? ¿Cuáles, en ciertos organismos o trastornos fisiológicos, pueden proceder en ausencia de O_2 ?

4. La fermentación permite la extracción continua de energía a partir de la glucosa, en ausencia de oxígeno. Si el catabolismo de la glucosa es anaerobio, ¿por qué la fermentación es necesaria para que la glucólisis continúe?

5. Describa el proceso paso a paso por el cual los electrones, a partir del catabolismo de la glucosa en el citoplasma, son transferidos a la cadena de transporte de electrones en la membrana mitocondrial interna. En su respuesta, note si la transferencia de electrones en cada paso es directa o indirecta.

6. La oxidación mitocondrial de los ácidos grasos es la principal fuente de ATP, incluso los ácidos grasos se pueden oxidar en cualquier lugar. ¿Qué otro orgánulo, además de la mitocondria, puede oxidar los ácidos grasos? ¿Cuál es la diferencia fundamental entre la oxidación que se produce en este orgánulo y la oxidación mitocondrial?

7. Cada uno de los citocromos en la mitocondria contiene grupos prostéticos. ¿Qué es un grupo prostético? ¿Qué tipo de grupo prostético está asociado con los citocromos? ¿Qué propiedad de los diversos cromos-

mas asegura el flujo electrónico unidireccional a lo largo de la cadena de transporte de electrones?

8. La cadena de transporte de electrones consiste en una cantidad de complejos multiproteicos, que funcionan en conjunción para pasar los electrones desde un aceptor de electrones como el NADH hasta el O_2 . ¿Cuál es la función de estos complejos en la síntesis de ATP? Se ha demostrado que los supercomplejos de la respiración contienen todos los componentes proteicos necesarios para la respiración. ¿Por qué esto es beneficioso para la síntesis de ATP y cuál es una de las formas en que se demuestra experimentalmente la existencia de los supercomplejos? La coenzima Q (CoQ) no es una proteína, pero es una molécula hidrófoba pequeña. ¿Por qué es importante para el funcionamiento de la cadena de transporte de electrones que el CoQ sea una molécula hidrófoba?

9. Se estima que cada par de electrones donados por el NADPH lleva a la síntesis de aproximadamente tres moléculas de ATP, mientras que cada par de electrones donados por el $FADH_2$ lleva a la síntesis de aproximadamente dos moléculas de ATP. ¿Cuál es la razón subyacente en la diferencia de rendimiento para los electrones donados por el $FADH_2$ versus el NADH?

10. Describa las principales funciones de los diferentes componentes de la enzima ATP sintasa en la mitocondria. Una enzima estructuralmente similar es responsable de la acidificación de los lisosomas y los endosomas. Sobre la base de lo que usted conoce acerca del mecanismo de la síntesis de ATP, explique cómo podría ocurrir esta acidificación.

11. Gran parte de lo que se sabe acerca de la ATP sintasa proviene de la investigación sobre las bacterias aerobias. ¿Qué es lo que hace a estos organismos útiles para esta investigación? ¿Dónde ocurren las reacciones de la glucólisis, el ciclo del ácido cítrico y la cadena de transporte de electrones en estos organismos? ¿Dónde se genera la pmf en las bacterias aerobias? ¿Qué otros procesos celulares dependen de la pmf en estos organismos?

12. Una función importante de la membrana mitocondrial interna es la de proporcionar una barrera selectivamente permeable al movimiento de moléculas solubles en agua y así generar diferentes ambientes químicos sobre el lado de la membrana. Sin embargo, muchos de los sustratos y productos de la fosforilación oxidativa son solubles en agua y deben cruzar la membrana interna. ¿Cómo se produce este transporte?

13. El ciclo Q cumple una función importante en la cadena de transporte de electrones de las mitocondrias, los cloroplastos y las bacterias. ¿Cuál es la función del ciclo Q y por qué el mismo lleva a cabo su función? ¿Qué componentes del transporte de electrones participan en el ciclo Q en las mitocondrias, en las bacterias púrpuras y en los cloroplastos?

14. Verdadero o Falso: Como el ATP es generado en los cloroplastos, las células capaces de sufrir fotosíntesis no necesitan mitocondrias. Explique. Nombre y describa la idea que explica cómo las mitocondrias y los cloroplastos se cree que se originaron en las células eucariotes.

15. Escriba las reacciones generales de la fotosíntesis generadora de oxígeno. Explique la siguiente afirmación: el O_2 generado por la fotosíntesis es simplemente un subproducto de la vía que genera los hidratos de carbonos y el ATP.

16. La fotosíntesis se puede dividir en múltiples etapas. ¿Cuáles son las etapas de la fotosíntesis y dónde se produce cada una dentro del cloroplasto? ¿Dónde se genera la sacarosa producida por la fotosíntesis?

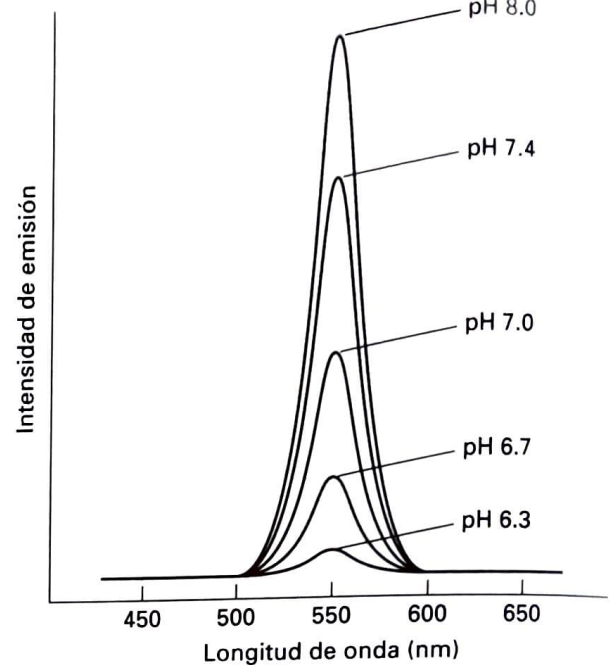
17. Los fotosistemas responsables de la absorción de energía luminosa están compuestos cada uno de dos componentes conectados, el centro de reacción y un complejo antena. ¿Cuál es la composición de los pigmentos y la función de cada componente en el proceso de absorción de luz? ¿Qué evidencia existe acerca de que los pigmentos encontrados en estos componentes están involucrados en la fotosíntesis?

18. La fotosíntesis en las bacterias púrpuras y verdes no produce O_2 . ¿Por qué? ¿De qué forma estos organismos aún utilizan la fotosíntesis para producir ATP? ¿Qué moléculas sirven como donantes en estos organismos?

19. Los cloroplastos contienen dos fotosistemas. ¿Cuál es la función de cada uno? Para que el flujo lineal de electrones, haga un diagrama del flujo de electrones desde la absorción de un fotón hasta la formación de NADPH. ¿Qué se sintetiza con la energía almacenada en la forma de NADPH?

20. Las reacciones del ciclo de Calvin que fijan CO_2 no funcionan en la oscuridad. ¿Cuáles son las razones posibles para esto? ¿Cómo es que estas reacciones son reguladas por la luz?

21. La rubisco, que puede ser la proteína más abundante sobre la tierra, cumple una función en la síntesis de hidratos de carbono en los organismos que utilizan fotosíntesis. ¿Qué es la rubisco, dónde se localiza y qué función cumple?



involucre al BCECF. En este caso ¿de qué membrana estaría rodeado el BCECF? ¿Cómo sería el cambio de fluorescencia con la adición de luz, ADP y P_i ?

Análisis de los datos

Un gradiente de protones se puede analizar con colorantes fluorescentes cuyos perfiles de intensidad de emisión dependen del pH. Uno de los colorantes más útiles para medir el gradiente de pH a través de las membranas mitocondriales es el fluorocromo insoluble al agua, impermeable a las membranas 2',7'-bis-(2-carboxietil)-5(6)-carboxifluoresceína (BCECF). El efecto del pH sobre la intensidad de emisión del BCECF, excitado a 505 nm, se muestra en la figura que acompaña. En un estudio, las vesículas selladas conteniendo este compuesto se prepararon mezclando membranas mitocondriales internas aisladas, sin sellar con BCECF; después de resellar las membranas, se recolectaron las vesículas por centrifugación y se las volvió a suspender en un medio no fluorescente.

a. Cuando estas vesículas se incuban en un buffer fisiológico conteniendo NADH, ADP, P_i y O_2 , la fluorescencia de BCECF atrapada adentro gradualmente disminuía en intensidad. ¿Qué sugiere esta disminución en intensidad de fluorescencia acerca de dicha preparación vesicular?

b. ¿Cómo espera usted que las concentraciones de ADP, P_i y O_2 cambien durante el transcurso del experimento descrito en la parte a? ¿Por qué?

c. Después de que las vesículas se incubaron en *buffer* conteniendo ADP, P_i y O_2 durante un período de tiempo, la adición de dinitrofenol causó un incremento en la fluorescencia de BCECF. Por el contrario, la adición de valinomicina produjo solo un efecto transitorio. Explique estos hallazgos.

d. ¿Qué resultados esperaría ver si la fuente de la membrana mitocondrial fuera la mitocondria de la grasa parda? Explicar.

e. Los cloroplastos también se podrían utilizar como una fuente de membranas en un experimento similar (como en la parte a) que

Bibliografía

Primer paso de la captura de energía de la glucosa: glucólisis

Berg, J., J. Tymoczko, and L. Stryer. 2002. *Biochemistry*, 5th ed. W. H. Freeman and Company, chaps. 16 and 17.

Depre, C. M., M. Rider, and L. Hue. 1998. Mechanisms of control of heart glycolysis. *Eur. J. Biochem.* **258**:277-290.

Fersht, A. 1999. *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*. W. H. Freeman and Company.

Fothergill-Gilmore, L. A., and P. A. Michels. 1993. Evolution of glycolysis. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **59**:105-135.

Nelson, D. L., and M. M. Cox. 2000. *Lehninger Principles of Biochemistry*. Worth, chaps. 14-17, 19.

Pilkis, S. J., T. H. Claus, I. J. Kurland, and A. J. Lange. 1995. 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: a metabolic signaling enzyme. *Ann. Rev. Biochem.* **64**:799-835.

Mitocondrias y ciclo del ácido cítrico

Canfield, D. E. 2005. The early history of atmospheric oxygen: homage to Robert M. Garrels. *Annu. Rev. Earth Planet. Sci.* **33**:1-36.

Chan, D. C. 2006. Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* **125**(7):1241-1252.

Eaton, S., K. Bartlett, and M. Pourfarzam. 1996. Mammalian mitochondrial beta-oxidation. *Biochem. J.* **320** (Part 2):345-557.

Guest, J. R., and G. C. Russell. 1992. Complexes and complexities of the citric acid cycle in *Escherichia coli*. *Curr. Top. Cell Reg.* **33**:231-247.

Krebs, H. A. 1970. The history of the tricarboxylic acid cycle. *Perspect. Biol. Med.* **14**:154-170.

Rasmussen, B., and R. Wolfe. 1999. Regulation of fatty acid oxidation in skeletal muscle. *Ann. Rev. Nutrition* 19:463-484.

Velot, C., M. Mixon, M. Teige, and P. Srere. 1997. Model of a quinary structure between Krebs TCA cycle enzymes: a model for the metabolon. *Biochemistry* 36:14271-14276.

Wanders, R. J., and H. R. Waterham. 2006. Biochemistry of mammalian peroxisomes revisited. *Annu. Rev. Biochem.* 75:295-332.

Cadena de transporte de electrones y generación de la fuerza protón-motriz

Acín-Pérez, R., P. Fernandez-Silva, M. L. Peleato, A. Pérez-Martos, and J. A. Enriquez. 2008. Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol. Cell* 32:529-539.

Babcock, G. 1999. How oxygen is activated and reduced in respiration. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 96:12971-12973.

Beinert, H., R. Holm, and E. Münck. 1997. Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science* 277:653-659.

Brandt, U. 2006. Energy Converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I). *Annu. Rev. Biochem.* 75:165-187.

Brandt, U., and B. Trumpower. 1994. The protonmotive Q cycle in mitochondria and bacteria. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 29:165-197.

Daiber, A. 2010. Redox signaling (cross-talk) from and to mitochondria involves mitochondrial pores and reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta* 6-7:897-906.

Darrouzet, E., C. Moser, P. L. Dutton, and F. Daldal. 2001. Large scale domain movement in cytochrome bc₁: a new device for electron transfer in proteins. *Trends Biochem. Sci.* 26:445-451.

Dickinson, B. C., D. Srikun, and C. J. Chang. 2010. Mitochondrial-targeted fluorescent probes for reactive oxygen species. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14:50-56.

Efremov, R. G., R. Baradaran, and L. A. Sazanov. 2010. The architecture of respiratory complex I. *Nature* 465:441-445.

Finkel, T. 2011. Signal transduction by reactive oxygen species. *Journal Cell Biology* 194:7-15.

Grigorieff, N. 1999. Structure of the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9:476-483.

Hosier, J. P., S. Ferguson-Miller, and D. A. Mills. 2006. Energy transduction: proton transfer through the respiratory complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 75:165-187.

Hunte, C., V. Zickermann, and U. Brandt. 2010. Functional modules and structural basis of conformational coupling in mitochondrial complex I. *Science* 329:448-451.

Hyde, B. B., G. Twig, and O. S. Shirihai. 2010. Organellar vs cellular control of mitochondrial dynamics. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21:575-581.

Koopman, W. J., et al. 2010. Mammalian mitochondrial complex I: biogenesis, regulation, and reactive oxygen species generation. *Antioxid. Redox Signal.* 12:1431-1470.

Michel, H., J. Behr, A. Harrenga, and A. Kannt. 1998. Cytochrome c oxidase. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 27:329-356.

Mitchell, P. 1979. Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences. *Science* 206:1148-1159. (Nobel Prize Lecture.)

Murphy, M. P. 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417:1-13.

Ramirez, B. E., B. Malmström, J. R. Winkler, and H. B. Gray. 1995. The currents of life: the terminal electron-transfer complex of respiration. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 92:11949-11951.

Ruitenbergh, M., et al. 2002. Reduction of cytochrome c oxidase by a second electron leads to proton translocation. *Nature* 417:99-102.

Saraste, M. 1999. Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science* 283:1488-1492.

Schafer, E., et al. 2006. Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes. *J. Biol. Chem.* 281(22):15370-15375.

Schultz, B., and S. Chan. 2001. Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 30:23-65.

Sheeran, F. L., and S. Pepe. 2006. Energy deficiency in the failing heart: linking increased reactive oxygen species and disruption of oxidative phosphorylation rate. *Biochim. Biophys. Acta* 1757(5-6):543-552.

Tsukihara, T., et al. 1996. The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* 272:1136-1144.

Walker, J. E. 1995. Determination of the structures of respiratory enzyme complexes from mammalian mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1271:221-227.

Wallace, D. C. 2005. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu. Rev. Genet.* 39:359-407.

Xia, D., et al. 1997. Crystal structure of the cytochrome bc₁ complex from bovine heart mitochondria. *Science* 277:60-66.

Zaslavsky, D., and R. Gennis. 2000. Proton pumping by cytochrome oxidase: progress and postulates. *Biochim. Biophys. Acta* 1458:164-179.

Zhang, M., E. Milevskaya, and W. Dowhan. 2005. Cardiolipin is essential for organization of complexes III and IV into a supercomplex in intact yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* 280(33):29403-29408.

Zhang, Z., et al. 1998. Electron transfer by domain movement in cytochrome bc₁. *Nature* 392:677-684.

Aprovechamiento de la fuerza protón-motriz para sintetizar ATP

Aksimentiev, A., I. A. Balabin, R. H. Fillingame, and K. Schulten. 2004. Insights into the molecular mechanism of rotation in the F₀ sector of ATP synthase. *Biophys. J.* 86(3):1332-1344.

Bianchet, M. A., J. Hullihen, P. Pedersen, and M. Amzel. 1998. The 2.8 Å structure of rat liver F₁-ATPase: configuration of a critical intermediate in ATP synthesis/hydrolysis. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 95:11065-11070.

Boyer, P. D. 1997. The ATP synthase—a splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem.* 66:717-749.

Capaldi, R., and R. Aggeler. 2002. Mechanism of the F₀F₁-type ATP synthase—a biological rotary motor. *Trends Biochem. Sci.* 27:154-160.

Elston, T., H. Wang, and G. Oster. 1998. Energy transduction in ATP synthase. *Nature* 391:510-512.

Hinkle, P. C. 2005. P/O ratios of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* 1706(1-2):1-11.

Junge, W., S. Hendrik, and S. Engelbrecht. 2009. Torque generation and elastic power transmission in the rotary F₀F₁-ATPase. *Nature* 459:364-370.

Kinosita, K., et al. 1998. F₁-ATPase: a rotary motor made of a single molecule. *Cell* 93:21-24.

Klingenberg, M., and S. Huang. 1999. Structure and function of the uncoupling protein from brown adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta* 1415:271-296.

Nury, H., et al. 2006. Relations between structure and function of the mitochondrial ADP/ATP carrier. *Annu. Rev. Biochem.* 75:713-741.

Tsunoda, S., R. Aggeler, M. Yoshida, and R. Capaldi. 2001. Rotation of the c subunit oligomer in fully functional F₀F₁ ATP synthase. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 98:898-902.

Vercesi, A. E., et al. 2006. Plant uncoupling mitochondrial proteins. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57:383-404.

von Ballmoos, C., A. Wiedenmann, and P. Dimroth. 2009. Essentials for ATP synthesis by F₁F₀ ATP synthases. *Annu. Rev. Biochem.* 78:649-672.

Yasuda, R., et al. 2001. Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F₁-ATPase. *Nature* 410:898-904.

Fotosíntesis y pigmentos que absorben la luz

- Ben-Shem, A., F. Frolow, and N. Nelson. 2003. Crystal structure of plant photosystem I. *Nature* **426**(6967):630-635.
- Blankenship, R. E. 2002. *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*. Blackwell.
- Deisenhofer, J., and J. R. Norris, eds. 1993. *The Photosynthetic Reaction Center*, vols. 1 and 2. Academic Press.
- McDermott, G., et al. 1995. Crystal structure of an integral membrane light-harvesting complex from photosynthetic bacteria. *Nature* **364**:517.
- Nelson, N., and C. F. Yocum. 2006. Structure and function of photosystems I and II. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**:521-565.
- Prince, R. 1996. Photosynthesis: the Z-scheme revisited. *Trends Biochem. Sci.* **21**:121-122.
- Wollman, F. A. 2001. State transitions reveal the dynamics and flexibility of the photosynthetic apparatus. *EMBO J.* **20**:3623-3630.

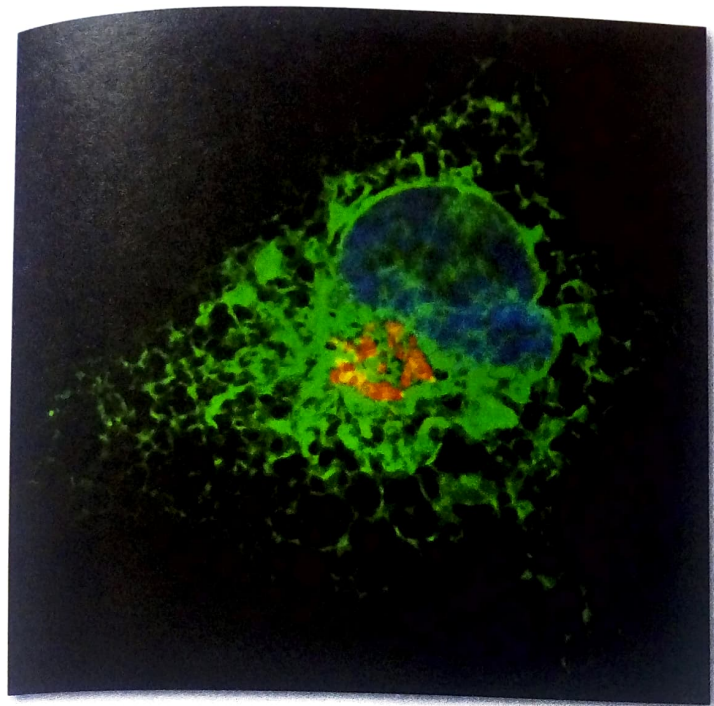
Análisis molecular de los fotosistemas

- Allen, J. F. 2002. Photosynthesis of ATP—electrons, proton pumps, rotors, and poise. *Cell* **110**:273-276.
- Amunts, A., H. Toporik, A. Borovikova, and N. Nelson. 2010. Structure determination and improved model of plant photosystem I. *J. Biol. Chem.* **285**:3478-3486.
- Aro, E. M., I. Virgin, and B. Andersson. 1993. Photoinhibition of photosystem II: Inactivation, protein damage, and turnover. *Biochim. Biophys. Acta* **1143**:113-134.
- Deisenhofer, J., and H. Michel. 1989. The photosynthetic reaction center from the purple bacterium *Rhodospseudomonas viridis*. *Science* **245**:1463-1473. (Nobel Prize Lecture.)
- Deisenhofer, J., and H. Michel. 1991. Structures of bacterial photosynthetic reaction centers. *Annu. Rev. Cell Biol.* **7**:1-23.
- Dekker, J. P., and E. J. Boekema. 2005. Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochim. Biophys. Acta* **1706**(1-2):12-39.
- Finazzi, G. 2005. The central role of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* in revealing the mechanism of state transitions. *J. Exp. Bot.* **56**(411):383-388.
- Guskov, A., et al. 2010. Recent progress in the crystallographic studies of photosystem II. *Chemphyschem.* **11**(6):1160-1171.
- Haldrup, A., P. Jensen, C. Lunde, and H. Scheller. 2001. Balance of power: a view of the mechanism of photosynthetic state transitions. *Trends Plant Sci.* **6**:301-305.
- Hankamer, B., J. Barber, and E. Boekema. 1997. Structure and membrane organization of photosystem II from green plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**:641-672.

- Heathcote, P., P. Fyfe, and M. Jones. 2002. Reaction centres: the structure and evolution of biological solar power. *Trends Biochem. Sci.* **27**:79-87.
- Horton, P., A. Ruban, and R. Walters. 1996. Regulation of light harvesting in green plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**:655-684.
- Iwai, M., et al. 2010. Isolation of the elusive supercomplex that drives cyclic electron flow in photosynthesis. *Nature* **464**:1210-1213.
- Joliot, P., and A. Joliot. 2005. Quantification of cyclic and linear flows in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**(13):4913-4918.
- Jordan, P., et al. 2001. Three-dimensional structure of cyano-bacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature* **411**:909-917.
- Kühlbrandt, W. 2001. Chlorophylls galore. *Nature* **411**:896-898.
- Martin, J. L., and M. H. Vos. 1992. Femtosecond biology. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21**:199-222.
- Penner-Hahn, J. 1998. Structural characterization of the Mn site in the photosynthetic oxygen-evolving complex. *Struct. Bonding* **90**:1-36.
- Tommos, C., and G. Babcock. 1998. Oxygen production in nature: a light-driven metalloradical enzyme process. *Acc. Chem. Res.* **31**:18-25.

Metabolismo del CO₂ durante la fotosíntesis

- Buchanan, B. B. 1991. Regulation of CO₂ assimilation in oxygenic photosynthesis: the ferredoxin/thioredoxin system. Perspective on its discovery, present status, and future development. *Arch. Biochem. Biophys.* **288**:1-9.
- Gutteridge, S., and J. Pierce. 2006. A unified theory for the basis of the limitations of the primary reaction of photosynthetic CO₂ fixation: was Dr. Pangloss right? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:7203-7204.
- Portis, A. 1992. Regulation of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **43**:415-437.
- Rawsthorne, S. 1992. Towards an understanding of C₃-C₄ photosynthesis. *Essays Biochem.* **27**:135-146.
- Rokka, A., I. Zhang, and E.-M. Aro. 2001. Rubisco activase: an enzyme with a temperature-dependent dual function? *Plant J.* **25**:463-472.
- Sage, R., and J. Colemana. 2001. Effects of low atmospheric CO₂ on plants: more than a thing of the past. *Trends Plant Sci.* **6**:18-24.
- Schneider, G., Y. Lindqvist, and C. I. Branden. 1992. Rubisco: structure and mechanism. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21**:119-153.
- Tcherkez, G. G., G. D. Farquhar, and T. J. Andrews. 2006. Despite slow catalysis and confused substrate specificity, all ribulose bisphosphate carboxylases may be nearly perfectly optimized. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**(19):7246-7251.
- Wolosiuk, R. A., M. A. Ballicora, and K. Hagelin. 1993. The reductive pentose phosphate cycle for photosynthetic CO₂ assimilation: enzyme modulation. *FASEB J.* **7**:622-637.



Fotomicrografía de fluorescencia de una célula de mamífero en cultivo (COS-7) que muestra la distribución del retículo endoplasmático (verde), el aparato de Golgi (rojo) y el núcleo (azul). Las proteínas de secreción recién sintetizadas primero se dirigen hacia el RE, donde se pliegan y se modifican antes de ser exportadas al Golgi, para su clasificación a destinos corriente abajo. (Cortesía de Jennifer Lippincott-Schwartz y Prasanna Satpute.)

El movimiento de proteínas en membranas y orgánulos

Una célula de mamífero típica contiene hasta 10 000 tipos de proteínas diferentes; una levadura, aproximadamente 5 000. La gran mayoría de estas proteínas son sintetizadas por ribosomas citosólicos, y muchas permanecen dentro del citosol (Cap. 4). Sin embargo, hasta la mitad de las diferentes clases de proteínas producidas en una célula típica son enviadas a uno u otro de los diferentes orgánulos rodeados por membrana dentro de la célula o a la superficie celular. Por ejemplo, muchas proteínas receptoras y proteínas transportadoras deben ser enviadas a la membrana plasmática, algunas enzimas hidrosolubles, como las RNA y las DNA polimerasas, deben ser dirigidas al núcleo; y los componentes de la matriz extracelular, así como las enzimas digestivas y las moléculas de señalización polipeptídicas, deben dirigirse a la superficie celular para ser secretadas desde la célula. Éstas y todas las otras proteínas producidas por una célula deberán alcanzar sus ubicaciones correctas para que la célula funcione adecuadamente.

El envío de proteínas recién sintetizadas a sus destinos celulares adecuados, habitualmente conocida como *direccionamiento* o *clasificación de proteínas*, comprende dos tipos de procesos muy distintos: un direccionamiento basado en señales y un tránsito basado en vesículas.

El primer proceso general implica el direccionamiento de una proteína recién sintetizada desde el citoplasma a un orgánulo intracelular. Esto puede ocurrir durante la traducción o poco después de que se haya completado la síntesis de la proteína. Para las proteínas de membrana, el direccionamiento conduce a la inserción de la proteína dentro de la bicapa lipídica de la membrana, mientras que en las proteínas hidrosolubles el direccionamiento lleva a la translocación de la proteína completa a través de la membrana al interior acuoso del orgánulo. Las proteínas son clasificadas al retículo endoplasmático (RE), las mitocondrias, los cloroplastos, los peroxisomas y el núcleo mediante este proceso general (Fig. 13-1).

El segundo proceso general de clasificación se conoce como la *vía secretora* e implica el transporte de proteínas desde el RE a su destino final, dentro de las vesículas rodeadas por membrana. Para muchas proteínas, incluso las que constituyen la matriz extracelular, el destino final es el exterior de la célula (de allí el nombre); las proteínas integrales de la membrana también son transportadas al Golgi, los lisosomas y la membrana plasmática mediante este proceso. La vía secretora comienza en el RE; así, todas las proteínas que han sido

CONTENIDO

13.1	Direccionamiento de las proteínas hacia la membrana del RE y a través de ésta	579
13.2	Inserción de las proteínas de la membrana dentro del RE	587
13.3	Modificaciones, plegamiento y control de calidad de las proteínas en el RE	594

13.4	Direccionamiento de las proteínas hacia las mitocondrias y los cloroplastos	601
13.5	Direccionamiento de las proteínas a los peroxisomas	612
13.6	Transporte hacia el interior y el exterior del núcleo	615

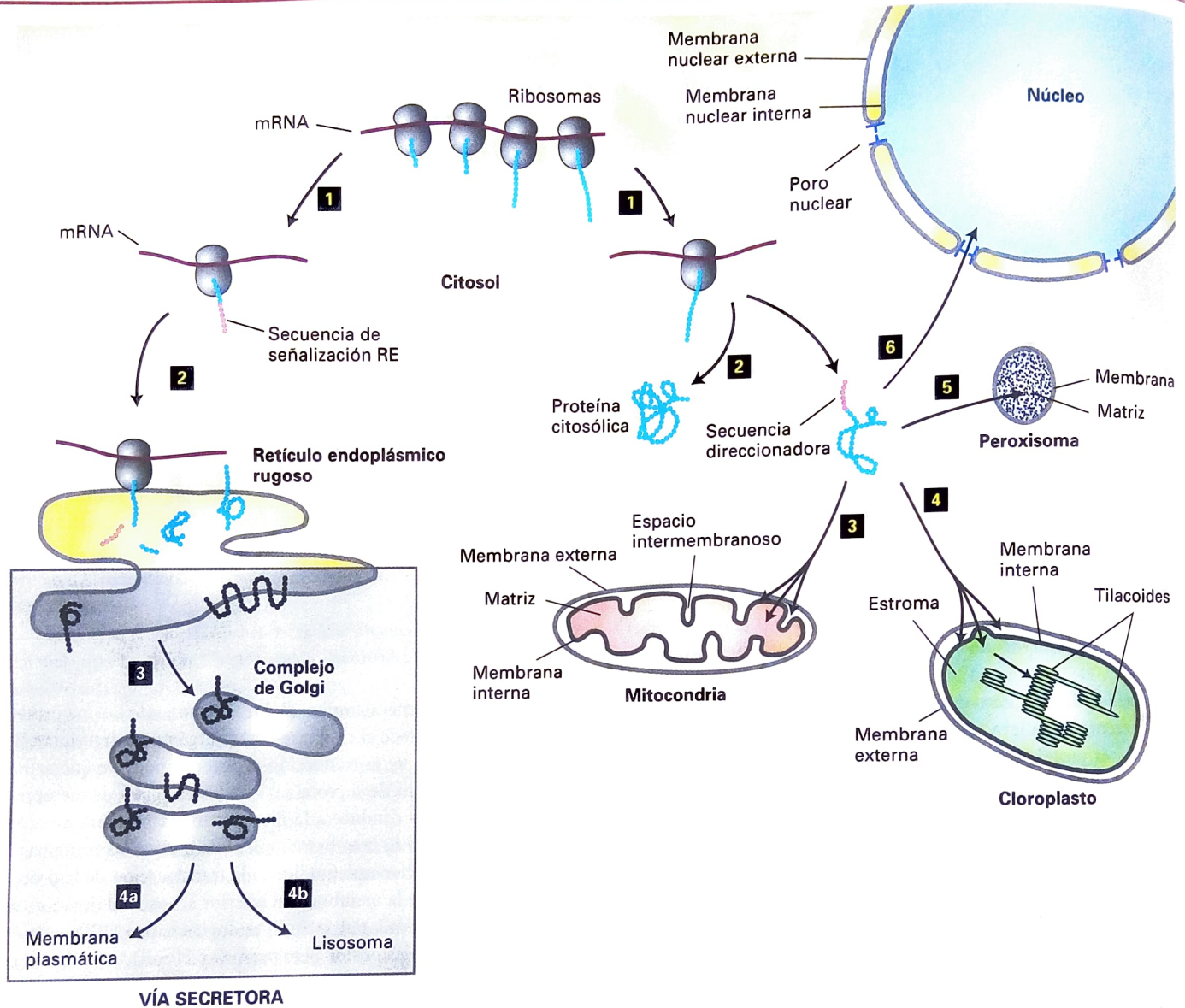


Figura 13-1 Resumen de las principales vías de clasificación de las proteínas en los eucariotes. Todos los mRNA codificados en el núcleo se traducen en ribosomas citosólicos. *Derecha (vías no secretoras):* la síntesis de proteínas que carecen de una secuencia de señalización RE se completa en los ribosomas libres (paso 1). Las proteínas que no contienen secuencia de direccionamiento son liberadas en el citosol y permanecen allí (paso 2). Las proteínas con una secuencia específica para orgánulo (rosado) primero son liberadas al citosol (paso 2) y luego son importadas a las mitocondrias, cloroplastos, peroxisomas o el núcleo (pasos 3-6). Las proteínas de las mitocondrias y de los cloroplastos típicamente atraviesan las membranas externa e interna para ingresar en la matriz o en el espacio del estroma, respectivamente. Otras

proteínas son seleccionadas para otros subcompartimentos de estos orgánulos por pasos adicionales de clasificación. Las proteínas nucleares entran y salen a través de poros visibles en la envoltura nuclear. *Izquierda (vía de secreción):* Los ribosomas que sintetizan proteínas nacientes en la vía secretora se dirigen hacia el retículo endoplásmico (RE) rugoso por una secuencia de señalización (rosado; pasos 1, 2). Después de que se ha completado la traducción sobre el RE, estas proteínas pueden desplazarse por medio de vesículas de transporte hacia el complejo de Golgi (paso 3). La clasificación adicional envía proteínas a la membrana plasmática o a los lisosomas (pasos 4a, 4b). Los procesos que emplean vesículas corresponden a la vía secretora (pasos 3, 4, recuadro sombreado) y se analizan en el Capítulo 14.

seleccionadas para ingresar en la vía secretora, inicialmente, están direccionadas hacia ese orgánulo.

El direccionamiento hacia el RE, por lo general, incluye las proteínas *nacientes* aún en proceso de síntesis, en un ribosoma. Las proteínas recién sintetizadas son expulsadas desde el ribosoma directamente al interior de la membrana del RE. Una vez translocadas a través de la membrana del RE, las proteínas se ensamblan en su conformación

nativa mediante los catalizadores del plegamiento proteico presentes en la luz del RE. De hecho, el RE es la localización en la que aproximadamente un tercio de las proteínas de una célula típica se pliega a sus conformaciones nativas, y la mayoría de las proteínas residentes del RE —de un modo directo o indirecto— contribuyen al proceso de plegamiento. Como parte de dicho proceso, las proteínas también sufren modificaciones postraduccionales específicas en el RE. Estos procesos

son cuidadosamente controlados y solo después de que se han completado el plegamiento y el ensamblaje, las proteínas son transportadas al exterior del RE hacia otros destinos. Aquellas cuyo destino final es el Golgi, los lisosomas, la membrana plasmática o el exterior celular son transportadas a lo largo de la vía secretora mediante la acción de pequeñas vesículas que brotan desde la membrana de un orgánulo y, luego, se fusionan con la membrana de otro (véase la Fig. 13-1, *recuadro sombreado*). En el siguiente capítulo, analizaremos el tránsito de proteínas mediante vesículas porque su mecánica difiere significativamente del direccionamiento de proteínas que no depende de vesículas al interior de los orgánulos intracelulares.

En este capítulo, examinamos el modo en que las proteínas se dirigen hacia cinco orgánulos intracelulares: el RE, las mitocondrias, los cloroplastos, los peroxisomas y el núcleo. Dos características de este proceso de direccionamiento de las proteínas, inicialmente, fueron bastante desconcertantes: de qué manera una proteína determinada podía dirigirse solo a una membrana específica y de qué modo las moléculas proteicas hidrófilas relativamente grandes podían ser translocadas a través de una membrana hidrofóbica sin romper la bicapa como barrera para los iones y las moléculas pequeñas. Empleando una combinación de métodos bioquímicos de purificación y técnicas de detección genética para identificar mutantes incapaces de ejecutar pasos de translocación particulares, los biólogos celulares han identificado muchos de los componentes celulares necesarios para la translocación a través de cada una de las diferentes membranas intracelulares. Además, numerosos procesos de translocación centrales de la célula se han reconstituido con el empleo de componentes proteicos purificados incorporados a bicapas lipídicas artificiales. Estos sistemas *in vitro* pueden ser manipulados experimentalmente con libertad.

Estos estudios han mostrado que, a pesar de ciertas variaciones, los mismos mecanismos básicos rigen la clasificación de todas las proteínas en todos los orgánulos intracelulares. Sabemos ahora, por ejemplo, que la información para dirigir una proteína a un destino particular en un orgánulo está codificada en la secuencia de aminoácidos de la propia proteína, por lo general, dentro de las secuencias de aproximadamente 20 aminoácidos, conocidas genéricamente como **secuencias señal** (véase la Fig. 13-1); éstas también se denominan *secuencias de captación-direccionamiento* o *péptido señal*. Estas secuencias de direccionamiento habitualmente se presentan en el extremo N-terminal de una proteína, que es la primera parte de una proteína en ser sintetizada. Más raramente, las secuencias de direccionamiento pueden presentarse en el extremo C-terminal o en el interior de una secuencia proteica. Cada orgánulo lleva un conjunto de proteínas receptoras que se unen solamente a los sitios específicos de secuencias señal, lo que asegura que la información codificada en la secuencia señal gobierna la especificidad del direccionamiento. Una vez que una proteína que contiene una secuencia señal ha interactuado con el receptor correspondiente, la cadena proteica es transferida a cierto tipo de *canal de translocación* que permite que la proteína pase hacia el interior o a través de la bicapa de la membrana. La transferencia unidireccional de una proteína al interior de un orgánulo, sin volver al citoplasma, habitualmente se logra al acoplar la translocación a un proceso energéticamente favorable, como la hidrólisis del GTP o del ATP. Después, algunas proteínas se clasifican adicionalmente para alcanzar un subcompartimento dentro del orgánulo diana; esta clasificación depende también de otras secuencias señal y de otras proteínas receptoras. Finalmente, las secuencias señal, con frecuencia, son eliminadas desde la proteína madura por proteasas específicas, una vez que se ha completado la translocación a través de la membrana.

Para cada uno de los eventos de direccionamiento de las proteínas analizados en este capítulo, buscaremos una respuesta a cuatro preguntas fundamentales:

1. ¿Cuál es la naturaleza de la *secuencia señal* y qué la distingue de otros tipos de secuencias señal?
2. ¿Cuál es el *receptor* para la secuencia señal?
3. ¿Cuál es la estructura del *canal de translocación* que permite la transferencia de las proteínas a través de la bicapa de la membrana? En particular, ¿el canal es tan estrecho que las proteínas pueden pasar a través de éste solo en estado no plegado o acomoda dominios de proteínas plegadas?
4. ¿Cuál es la fuente de la *energía* que impulsa la transferencia unidireccional a través de la membrana?

En la primera parte del capítulo, cubrimos el direccionamiento de las proteínas al RE, incluidas las modificaciones postraduccionales que experimentan las proteínas a medida que ingresan en la vía secretora. El direccionamiento de las proteínas hacia el RE es el ejemplo mejor comprendido de direccionamiento proteico y servirá como patrón del proceso en general. Luego, describiremos el direccionamiento de las proteínas hacia las mitocondrias, cloroplastos y peroxisomas. Finalmente, cubriremos el transporte de las proteínas hacia el interior y al exterior del núcleo a través de los poros nucleares.

13.1 Direccionamiento de las proteínas hacia la membrana del RE y a través de ésta

Todas las células eucarióticas poseen un retículo endoplasmático. El RE es un orgánulo grande, con convoluciones, constituido por túbulos y sacos aplanados, cuya membrana se continúa con la membrana nuclear. La membrana del RE es el lugar de síntesis de los lípidos celulares (Cap. 10), y el RE es el sitio en el que se ensamblan la mayoría de las proteínas de la membrana, incluso las de la membrana plasmática y las de la membrana de los lisosomas, el RE y el Golgi. Además, todas las proteínas solubles que finalmente serán secretadas por la célula —así como aquellas destinadas a la luz del RE, el Golgi o los lisosomas— son inicialmente enviadas a la luz del RE (véase la Fig. 13-1). Como el RE desempeña una función tan importante en la secreción de las proteínas, nos referimos a la vía del tránsito de proteínas que fluye a través del RE como la “vía secretora”. Para simplificar, nos referiremos a todas las proteínas inicialmente direccionadas hacia el RE como “proteínas de secreción”, *pero* tendremos en mente que, en realidad, no todas las proteínas direccionadas hacia el RE son secretadas desde la célula.

En esta primera sección, analizaremos el modo en el que las proteínas son inicialmente identificadas como proteínas de secreción, y de qué forma estas proteínas son translocadas a través de la membrana del RE. Nos ocuparemos primero de las proteínas solubles —aquellas que recorren el camino a través de la membrana del RE, dentro de la luz de éste—. En la siguiente sección, analizaremos las proteínas integrales de membrana, aquellas que se insertan en la membrana del RE.

Los experimentos de marcado con pulsos con membranas purificadas del RE demostraron que las proteínas secretadas atraviesan la membrana del RE

Aunque todas las células secretan una diversidad de proteínas (p. ej., las proteínas de la matriz extracelular), ciertos tipos de células están especializadas para secretar grandes cantidades de proteínas específicas. Las

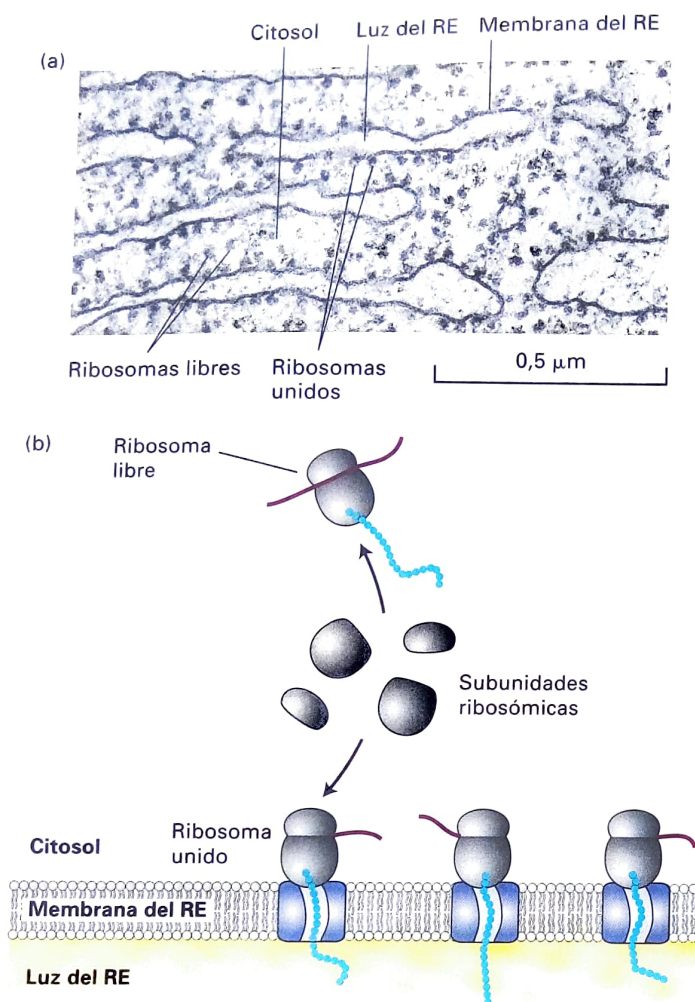


FIGURA 13-2 Estructura del RE rugoso. (a) La fotomicrografía electrónica de ribosomas unidos al RE rugoso, en una célula acinar del páncreas. La mayoría de las proteínas sintetizadas por este tipo de células serán secretadas y se forman sobre los ribosomas unidos a la membrana. Son evidentes unos pocos ribosomas no unidos a la membrana (libres); supuestamente, están sintetizando proteínas del citosol u otras proteínas que no se secretan. (b) Representación esquemática de la síntesis de proteínas en el RE. Nótese que los ribosomas unidos a la membrana y los libres en el citosol son idénticos. Los ribosomas unidos a la membrana se reclutan en el retículo endoplásmico durante la síntesis proteica de un polipéptido que contiene una secuencia de señalización RE. (La parte [a] es cortesía de G. Palade.)

células acinares del páncreas, por ejemplo, sintetizan una gran cantidad de algunas enzimas digestivas que son secretadas en conductos que las conducen al intestino. Como estas células secretoras contienen los orgánulos de la vía secretora (p. ej., RE y Golgi) en gran abundancia, han sido ampliamente utilizadas para estudiar esta vía, incluso los pasos iniciales que tienen lugar en la membrana del RE.

La secuencia de eventos que se producen inmediatamente después de la síntesis de una proteína secretora fueron comprendidos, inicialmente, mediante experimentos de marcado con pulsos, con células acinares pancreáticas. En estas células, los aminoácidos marcados con material radiactivo son incorporados a las proteínas secretadas, a medida que son sintetizadas en los ribosomas unidos a la superficie del RE. La porción del RE que recibe las proteínas que ingresan a la vía secretora

se conoce como *RE rugoso* porque está tan densamente tachonado con ribosomas que la morfología de su superficie se ve distinta de otras membranas del RE (Fig. 13-2). A partir de estos experimentos, se esclareció que durante la síntesis en el ribosoma o inmediatamente después de ésta, las proteínas que serán secretadas se translocan a través de la membrana del RE a la luz del RE.

Para delinear los pasos del proceso de translocación, fue necesario aislar el RE del resto de la célula. El aislamiento del RE intacto, con su delicada estructura a modo de un fino encaje y su interconexión con otros orgánulos, no es posible. Sin embargo, los científicos descubrieron que, después de que las células son homogeneizadas, el RE rugoso se rompe en pequeñas vesículas cerradas con ribosomas en su exterior, que se denominan *microsomos rugosos*; éstos retienen la mayoría de las propiedades bioquímicas del RE, incluso la capacidad de translocar proteínas. Los experimentos ilustrados en la Figura 13-3, en los cuales los microsomos aislados de células marcadas con pulsos fueron tratados con una proteasa, demuestran que aunque las proteínas de secreción sean sintetizadas en ribosomas unidos a la cara citosólica de la membrana del RE, los polipéptidos producidos por estos ribosomas terminan dentro de la luz de las vesículas del RE. Gracias a este tipo de experimento, surgió la inquietud acerca de cómo los polipéptidos son reconocidos como proteínas que serán secretadas poco después que su síntesis comienza y cómo una proteína naciente que será secretada es enhebrada a través de la membrana del RE.

Una secuencia de señalización N-terminal hidrófoba dirige las proteínas secretoras nacientes hacia el RE

Después de que comienza la síntesis de una proteína secretora en un ribosoma libre en el citosol, una secuencia de señalización de 16 a 30 residuos, en la cadena naciente de la proteína, dirige el ribosoma hacia la membrana del RE e inicia la translocación del polipéptido creciente a través de la membrana del RE (véase la Fig. 13-1, *izquierda*). Una secuencia de señalización de RE típicamente se localiza en el extremo N-terminal de la proteína, la primera parte de la proteína que se sintetiza. Todas las secuencias de señalización de diferentes proteínas secretoras contienen uno o más aminoácidos con carga positiva adyacentes a un tramo continuo de 6 a 12 residuos hidrófobos (conocidos como núcleo hidrófobo); pero, por lo demás, tienen poco en común. En la mayor parte de las proteínas destinadas a la secreción, la secuencia de señalización es escindida de la proteína mientras ésta todavía está creciendo en el ribosoma; de modo tal que las secuencias de señalización casi nunca están presentes en las proteínas “maduras” que se encuentran en las células.

El núcleo hidrófobo en las secuencias de señalización hacia el RE es esencial para su función. Por ejemplo, la delección específica de varios de los aminoácidos hidrófobos de una secuencia de señalización o la introducción de aminoácidos cargados en el núcleo hidrófobo por mutación puede abolir la capacidad del extremo N-terminal de una proteína para funcionar como secuencia de señalización. Como consecuencia, la proteína modificada permanece en el citosol, incapaz de atravesar la membrana del RE hacia su luz. Inversamente, las secuencias de señalización pueden ser añadidas a proteínas que normalmente se encuentran en el citosol, con el empleo de técnicas de DNA recombinante. Siempre que la secuencia añadida sea lo suficientemente larga e hidrófoba, esta proteína citosólica modificada adquirirá la capacidad de ser translocada hacia la luz del RE. De este modo, los residuos hidró-

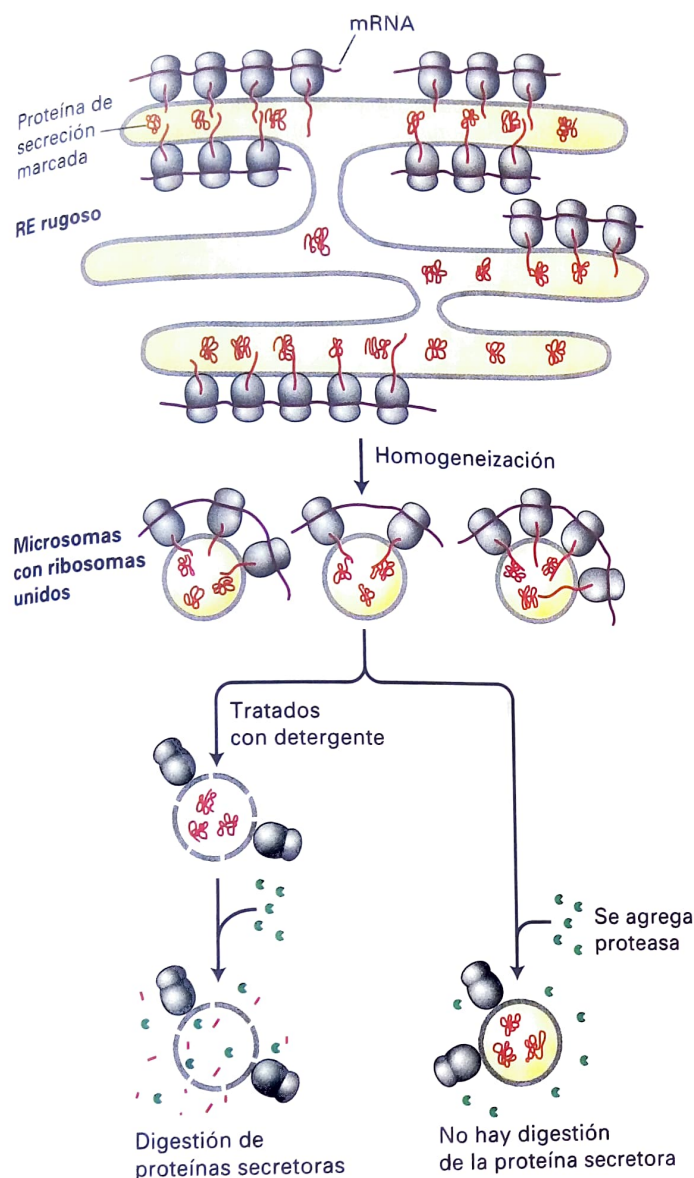
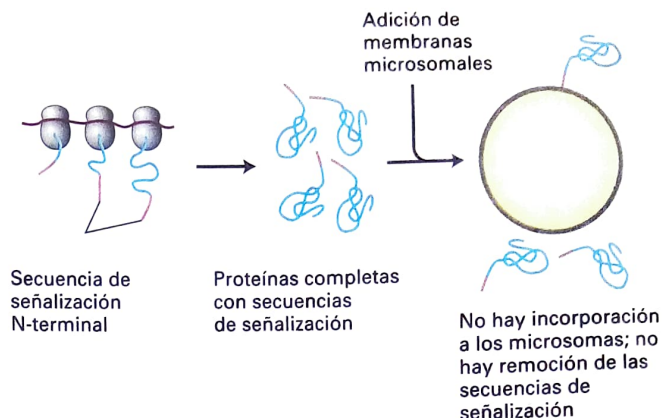


FIGURA EXPERIMENTAL 13-3 Las proteínas secretoras ingresan en el RE. El marcaje de las proteínas demuestra que las proteínas secretoras se localizan en la luz del RE, poco después de su síntesis. Las células se incuban durante un lapso breve con aminoácidos radiomarcados, de modo tal que solo las proteínas recién sintetizadas quedan marcadas. Luego, las células se homogeneizan, se fractura la membrana plasmática y se corta el RE rugoso en vesículas pequeñas denominadas *microsomas*. Puesto que poseen ribosomas unidos, los microsomas tienen una densidad de flotación mucho mayor que otros orgánulos con membrana y pueden separarse de éstos mediante una combinación de centrifugación diferencial y centrifugación por densidad, en gradiente de sacarosa (Cap. 9). Los microsomas purificados son tratados con una proteasa, en presencia de un detergente o sin éste. Las proteínas secretoras marcadas, asociadas con los microsomas, son digeridas por la proteasa solo si, primero, la barrera de permeabilidad de la membrana de los microsomas se destruye por tratamiento con el detergente. Este hallazgo indica que las proteínas recién sintetizadas se encuentran dentro de los microsomas, el equivalente a la luz del RE rugoso.

fobos en el núcleo de las secuencias de señalización hacia el RE forman un sitio de unión que resulta crítico para la interacción de las secuencias de señalización con la maquinaria causante del direccionamiento de la proteína hacia la membrana del RE.

(a) Síntesis de proteína libre de células; sin microsomas presentes



(b) Síntesis de proteínas libres de células; microsomas presentes

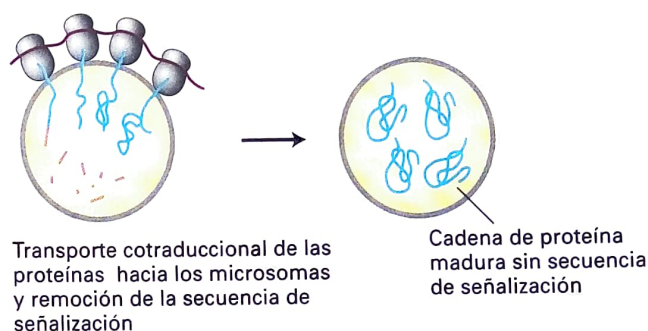


FIGURA EXPERIMENTAL 13-4 La traducción y la translocación se producen simultáneamente. Los experimentos libres de célula demuestran que la translocación de las proteínas secretoras en los microsomas está acoplada a la traducción. El tratamiento de los microsomas con EDTA, que quela los iones Mg^{2+} , los separa de los ribosomas a los que están asociados, lo que permite el aislamiento de microsomas sin ribosomas, que son equivalentes a las membranas del RE (véase la Fig. 13-3). La síntesis proteica es llevada a cabo en un sistema libre de células que contiene ribosomas funcionales, tRNA, ATP, GTP y enzimas citosólicas a las cuales se añade mRNA que codifica una proteína secretora. La proteína se sintetizará en ausencia de microsomas (a), pero se translocará a través de la membrana de las vesículas y perderá su secuencia de señalización (esto da como resultado una disminución del peso molecular) solo si hay microsomas presentes durante la síntesis proteica (b).

Los estudios bioquímicos que utilizan el sistema de síntesis de proteínas libre de células, el mRNA que codifica una proteína que será secretada y los microsomas desnudos de sus ribosomas unidos han permitido discernir la función y el destino de las secuencias de señalización del RE. Los experimentos iniciales, realizados en este sistema, demostraron que una proteína típica que será secretada está incorporada a los microsomas y que su secuencia de señalización es eliminada solo si los microsomas están presentes durante la síntesis proteica. Si los microsomas se añaden al sistema después de que se ha completado la síntesis de la proteína, no hay transporte de la proteína hacia el interior de los microsomas (Fig. 13-4). Posteriormente, se diseñaron experimentos para determinar la etapa precisa de la síntesis de proteínas en la cual deben estar presentes los microsomas para que se produzca la translocación. En estos experimentos, se añadieron microsomas a la mezcla de reacción en diferentes momentos, después de que se había iniciado la síntesis de proteínas. Dichos experimentos mostraron que los microsomas deben añadirse antes de que se hayan traducido aproximadamente

FIGURA 13-5 Estructura de la partícula de reconocimiento de la señal (PRS).

(a) Dominio de unión a la secuencia de señalización: la proteína bacteriana Ffh es homóloga a la porción de P54 que une las secuencias de señalización del RE. Este modelo de superficie muestra el dominio de unión en la Ffh, que contiene una gran hendidura tapizada con aminoácidos hidrófobos (púrpura) cuyas cadenas laterales interactúan con las secuencias de señalización. (b) Dominio que une GTP y receptor: la estructura del GTP unido a FtsY (el homólogo bacteriano de la subunidad α del receptor PRS) y las proteínas Ffh ilustra el modo en el que la interacción entre estas proteínas está controlada por la unión de GTP y su hidrólisis. Tanto Ffh como FtsY pueden unirse a una molécula de GTP y, cuando la Ffh y la FtsY se unen entre sí, las dos moléculas de GTP unidas encajan en la interfase, entre las subunidades proteicas, y estabilizan el dímero. El ensamblado de este dímero semisimétrico permite la formación de dos sitios activos para la hidrólisis de ambas moléculas de GTP unidas. La hidrólisis de GDP desestabiliza la interfase, lo que provoca el desensamblaje del dímero. (La parte [a] adaptada de R. J. Keenan y cols., 1998, *Cell* **94**:181. La parte [b] adaptada de P. J. Focia y cols., 2004, *Science* **303**:373.)

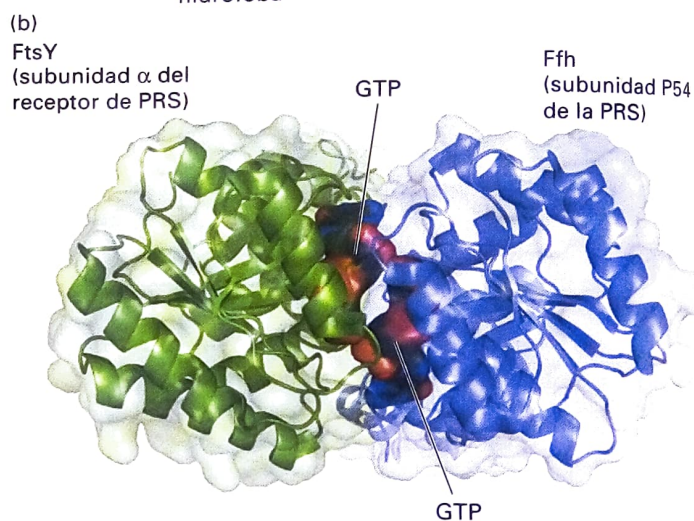
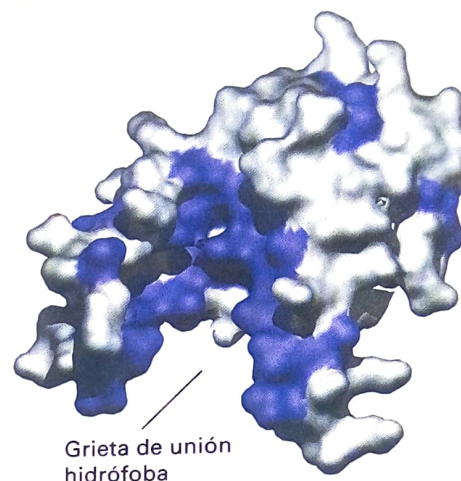
los primeros 70 aminoácidos para que la proteína que será secretada se localice en la luz del microsoma. En ese momento, los primeros 40 aminoácidos sobresalen del ribosoma, incluso la secuencia de señalización que posteriormente será cortada, y aproximadamente los 30 aminoácidos restantes aún se encuentran dentro de un canal del ribosoma (véase la Fig. 4-26). Así, el transporte de la mayor parte de las proteínas que serán secretadas en la luz del RE comienza mientras la proteína, aún sintetizada de forma incompleta (naciente), se encuentra todavía unida al ribosoma, un proceso denominado **translocación cotraduccional**.

La translocación cotraduccional se inicia con dos proteínas que hidrolizan GTP

Como las proteínas que serán secretadas se sintetizan en asociación con la membrana del RE, pero no con otra membrana celular, debe haber un mecanismo de reconocimiento de la secuencia de señalización que las dirija hacia allí. Los dos componentes clave en este direccionamiento son la **partícula de reconocimiento de señal (PRS)** y su receptor, localizado en la membrana del RE. La partícula de reconocimiento de señal es una partícula ribonucleoproteica citosólica que, de manera transitoria, se une tanto a la secuencia de señalización del RE de una proteína naciente como a la subunidad ribosómica grande y forma un complejo grande; luego, la partícula de reconocimiento de señal direcciona el complejo proteína naciente-ribosoma hacia la membrana del RE, al unirse al receptor de la partícula de reconocimiento de señal de la membrana.

La partícula de reconocimiento de señal está constituida por seis proteínas unidas a un RNA de 300 nucleótidos, que actúa como un andamio para un hexámero. Una de las proteínas de la partícula de reconocimiento de señal (P54) puede entrecruzarse químicamente con las secuencias de señalización del RE, lo que indica que ésta es la subunidad que se une a la secuencia de señalización en la proteína naciente que será secretada. Una región de la P54 denominada dominio M, que contiene mucha metionina y otros residuos de aminoácido con cadenas laterales hidrófobas, presenta una grieta cuya superficie interna está tapizada con cadenas laterales hidrófobas (Fig. 13-5a). El núcleo hidrófobo del péptido señal se une a esta grieta por medio de interacciones hidrófobas. Otros polipéptidos de la partícula de reconocimiento de señal interactúan con el ribosoma o son necesarios para la translocación de la proteína a la luz del RE.

(a) Dominio de unión a la secuencia de señalización Ffh (relacionado con la subunidad P54 de la PRS)



La partícula de reconocimiento de señal lleva el complejo cadena naciente-ribosoma hacia la membrana del RE al fijarse al receptor de dicha partícula, una proteína integral de la membrana del RE constituida por dos subunidades: una subunidad α y una subunidad β , más pequeña. La interacción del complejo partícula de reconocimiento de señal/cadena naciente-ribosoma con el receptor de la partícula de reconocimiento de señal se ve reforzada, tanto por la subunidad P54 de la partícula de reconocimiento de señal como por la subunidad α del receptor de dicha partícula, cuando se unen al GTP. La estructura de la subunidad P54 y el receptor de la subunidad α (FtsY) de la partícula de reconocimiento de señal, en la arqueobacteria *Thermus aquaticus*, aporta conocimiento acerca de cómo un ciclo de unión de GTP y su hidrólisis puede impulsar la unión y la disociación de estas proteínas. La Figura 13-5b muestra que P54 y FtsY se unen, cada uno, a una molécula única de GTP para formar un heterodímero pseudosimétrico. Ninguna subunidad sola contiene un sitio activo completo para la hidrólisis de GTP, pero cuando las dos proteínas se juntan, forman dos sitios activos completos capaces de hidrolizar ambas moléculas de GTP unidas.



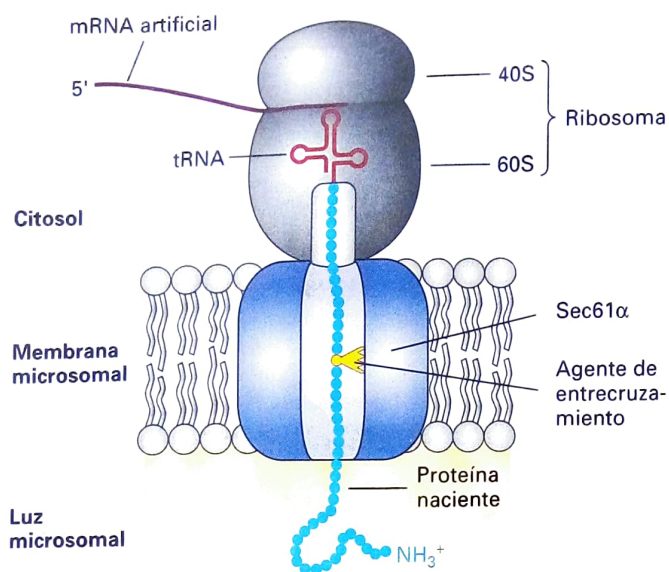


FIGURA EXPERIMENTAL 13-7 La Sec61 α es un componente del translocón. Los experimentos de entrecruzamiento muestran que la Sec61 α es un componente del translocón que contacta las proteínas de secreción nacientes, a medida que pasan a la luz del RE. Un mRNA que codifica los 70 aminoácidos N-terminales de la proteína de secreción prolactina fue traducido en un sistema libre de células que contenía microsomas (véase la Fig. 13-4b). El mRNA carecía de codón de terminación de la cadena y contenía un codón de lisina cerca de la mitad de la secuencia. Las reacciones contenían un lisil-tRNA modificado químicamente, en el cual un reactivo de entrecruzamiento activado por la luz se encontraba unido a la cadena lateral de la lisina. Aunque se tradujo todo el mRNA, el polipéptido completo no pudo ser liberado del ribosoma sin un codón de terminación de la cadena y, de esta manera, quedó "atascado", mientras atravesaba la membrana del RE. Luego, las mezclas de reacción fueron expuestas a una luz intensa que hizo que la cadena naciente se uniera en forma covalente a toda proteína cercana, en el translocón. Cuando el experimento se llevó a cabo con el empleo de microsomas de células de mamífero, la cadena naciente se unió de modo covalente a la Sec61 α . Se crearon diferentes versiones del mRNA de prolactina, de modo tal que el residuo de lisina modificado se ubicara a diferentes distancias desde el ribosoma; el entrecruzamiento con la Sec61 α se observó solo cuando la lisina modificada se ubicaba dentro del canal de translocación. (Adaptado de T. A. Rapoport, 1992, *Science* **258**:931 y D. Görlich y T. A. Rapoport, 1993, *Cell* **75**:615.)

mostraron que la cadena polipeptídica en translocación se pone en contacto con la proteína Sec61 α , lo que confirmaba su identidad como poro del translocón (Fig. 13-7).

Cuando los microsomas del sistema de translocación libre de células se reemplazaron por vesículas fosfolipídicas reconstituidas que contenían solo el receptor de la partícula de reconocimiento de señal y el complejo Sec61, la proteína de secreción naciente fue translocada desde su complejo partícula de reconocimiento de señal/ribosoma hacia el interior de las vesículas. Este hallazgo indica que el receptor partícula de reconocimiento de señal y el complejo Sec61 son las únicas proteínas de la membrana del RE absolutamente necesarias para la translocación. Como ninguna de éstas puede hidrolizar ATP o proporcionar de otro modo la energía necesaria para impulsar la translocación, la energía derivada de la elongación en el ribosoma

parece ser suficiente para impulsar la cadena polipeptídica a través de la membrana, en una sola dirección.

El translocón debe ser capaz de permitir el paso de una gran variedad de secuencias polipeptídicas mientras permanece sellado para pequeñas moléculas, como el ATP, para mantener la barrera de permeabilidad de la membrana del RE. Más aún, debe haber algún modo de regular el translocón para que permanezca cerrado en su estado estándar y se abra solo cuando se le une una cadena naciente unida a un ribosoma. Una estructura de alta resolución del complejo de la Sec61 de una arqueobacteria muestra el modo en el que el translocón preserva la integridad de la membrana (Fig. 13-8). Las 10 hélices transmembrana de la Sec61 α forman un canal central a través del cual pasa la cadena peptídica en translocación. Un estrechamiento en el medio del poro central está tapizado con los residuos hidrófobos de isoleucina, en efecto, forman un tapón alrededor del péptido que está translocándose. El modelo estructural del complejo de Sec61 que fue aislado sin un péptido en translocación y, por lo tanto, se supone que está en conformación cerrada, revela un péptido helicoidal corto que taponera el canal central. Los estudios bioquímicos del complejo Sec61 han mostrado que, en ausencia de un polipéptido en translocación, el péptido que forma el tapón efectivamente sella el translocón para evitar el paso de iones y moléculas pequeñas. Una vez que el péptido en translocación ingresa en el canal, el péptido tapón se mueve para permitir que se produzca la translocación.

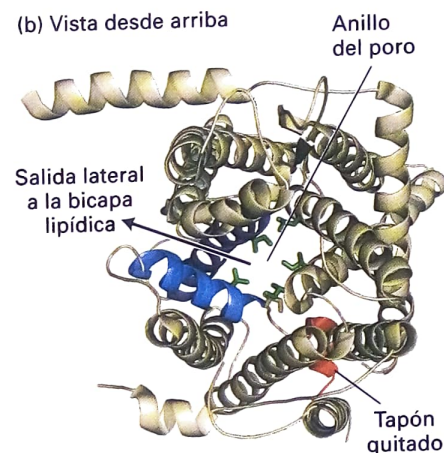
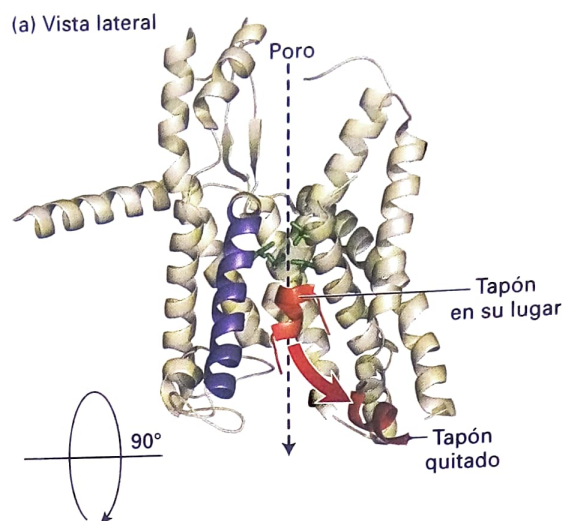
A medida que la cadena polipeptídica creciente entra en la luz del RE, la secuencia de señalización es escindida por la *peptidasa de señal*, que es una proteína RE transmembrana asociada con el translocón (véase la Fig. 13-6, paso 5). La peptidasa de señal reconoce una secuencia en el lado C-terminal del núcleo hidrófobo del péptido señal y corta la cadena específicamente en esta secuencia, una vez que ha surgido al espacio luminal del RE. Después de que la de señalización ha sido cortada, el polipéptido creciente se mueve a través del translocón hacia la luz del RE. El translocón permanece abierto hasta que se haya completado la traducción y la cadena polipeptídica completa se haya movido hacia la luz del RE. Después de que la translocación se ha completado, la hélice tapón vuelve al poro para sellar, nuevamente, el canal del translocón.

La hidrólisis del ATP impulsa la translocación postraducciona de ciertas proteínas secretoras en las levaduras

En la mayoría de los eucariontes, las proteínas secretoras ingresan en el RE por translocación cotraducciona. Sin embargo, en las levaduras, algunas proteínas secretoras ingresan en la luz del RE después de que se ha completado su traducción. En esta *translocación postraducciona*, la proteína translocada pasa a través del mismo translocón Sec61 usado en la translocación cotraducciona. Sin embargo, la partícula de reconocimiento de señal y su receptor no están involucrados en la translocación postraducciona y, en estos casos, la interacción directa entre el translocón y la secuencia de señalización de la proteína completa parece ser suficiente para direccionarla hacia la membrana del RE. Además, la fuerza impulsora para la translocación unidireccional, a través de la membrana del RE, es proporcionada por un complejo proteico adicional conocido como *complejo Sec63* y un miembro de la familia Hsc70 de las *chaperonas moleculares* conocido como *BiP* (véase el Cap. 3 para un análisis adicional de las chaperonas moleculares). El complejo

FIGURA EXPERIMENTAL 13-8 Estructura de un complejo bacteriano

Sec61. La estructura del complejo Sec61, solubilizado por detergente, de la arqueobacteria *M. jannaschii* (conocido también como complejo SecY) fue determinado por cristalografía de rayos X. (a) Una vista lateral muestra el canal, con forma de reloj de arena, a través del centro del poro. Un anillo de residuos de isoleucina en la cintura estrechada del poro forma un tapón que mantiene el canal sellado ante pequeñas moléculas, aun cuando el polipéptido que se transloca pase a través del canal. Cuando no hay un péptido presente en la translocación, el canal queda cerrado por un tapón helicoidal corto (rojo). Este tapón se desplaza hacia afuera del canal durante la translocación. En esta vista, la mitad anterior de la proteína ha sido retirada para mostrar mejor el poro. (b) Una vista que muestra, a través del centro del canal, la región (en la mitad izquierda) donde las hélices pueden separarse, lo que permite el paso lateral del dominio hidrófobo transmembrana a la bicapa lipídica. (Adaptado de A. R. Osborne y cols., 2005, *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 21:529.)



tetramérico Sec63 está incluido en la membrana del RE en la cercanía del translocón, mientras que el BiP se encuentra en la luz del RE. Al igual que otros miembros de la familia Hsc70, el BiP tiene un dominio que une péptidos y un dominio ATPasa. Estas chaperonas se unen a las proteínas no plegadas o parcialmente plegadas y las estabilizan (véase la Fig. 3-16).

El modelo actual para la translocación postraduccional de una proteína dentro del RE se esquematiza en la Figura 13-9. Una vez que el segmento N-terminal de la proteína ingresa en la luz del RE, la peptidasa señal corta la secuencia de señalización de la misma forma que en la translocación cotraduccional (paso 1). La interacción de BiP-ATP con la porción luminal del complejo Sec63 produce la hidrólisis del ATP unido, lo que genera un cambio de conformación en la BiP, que promueve su unión a una cadena polipeptídica expuesta (paso 2). Como el complejo Sec63 está localizado cerca del translocón, el BiP es activado en los sitios en los que los polipéptidos nacientes pueden entrar en el RE. Ciertos experimentos sugieren que, en ausencia de unión al BiP, un polipéptido no plegado se desliza hacia adelante y hacia atrás dentro del canal del translocón. Estos movimientos de deslizamiento al azar, en raras ocasiones, hacen que el polipéptido completo atraviese la membrana del RE. La unión de una molécula de BiP-ADP a la porción luminal del polipéptido evita el retroceso del polipéptido hacia el exterior del RE. A medida que el deslizamiento al azar hacia adentro expone una proporción mayor del polipéptido al lado luminal de la membrana del RE, la unión sucesiva de moléculas de BiP-ADP a la cadena del polipéptido actúa como un trinquete y, finalmente, produce la tracción del polipéptido completo hacia el interior del RE en el lapso de unos pocos segundos (pasos 3 y 4). En una escala temporal más lenta, las moléculas BiP espontáneamente intercambian su ADP más lento, las moléculas BiP espontáneamente intercambian su ADP unido por ATP y liberan el polipéptido, que luego puede plegarse a su conformación nativa (pasos 5 y 6). El BiP-ATP reciclado, entonces, está listo para otra interacción con Sec63. El BiP y el complejo Sec63 están listos para otra interacción con Sec63. El BiP y el complejo Sec63 están listos para otra interacción con Sec63. Los detalles de su función en este proceso no se comprenden con claridad, pero se cree que actúan en una etapa temprana, como el encaje del péptido señal en el poro del translocón.

La reacción completa llevada a cabo por el BiP es un ejemplo importante del modo en el que la energía química liberada por la hidrólisis del ATP puede impulsar el movimiento mecánico de una proteína a través de la membrana. Las bacterias también emplean un proceso impulsado por ATP para translocar las proteínas finalizadas a través de la membrana plasmática —en este caso, para ser liberadas desde la célula—. En las bacterias, la fuerza impulsora para la translocación proviene de una ATPasa citosólica, conocida como proteína SecA. La SecA se une a la cara citoplasmática del translocón e hidroliza el ATP citosólico. Mediante un mecanismo que recuerda a la aguja en una máquina de coser, la proteína SecA empuja segmentos de un polipéptido a través de la membrana, en un ciclo mecánico acoplado a la hidrólisis del ATP.

Como veremos, la translocación de las proteínas a través de otras membranas de orgánulos eucarióticos, como las de las mitocondrias y cloroplastos, también se producen, de manera característica, por translocación postraduccional. Esto explica por qué los ribosomas no están unidos a estos otros orgánulos como lo están al RE rugoso.

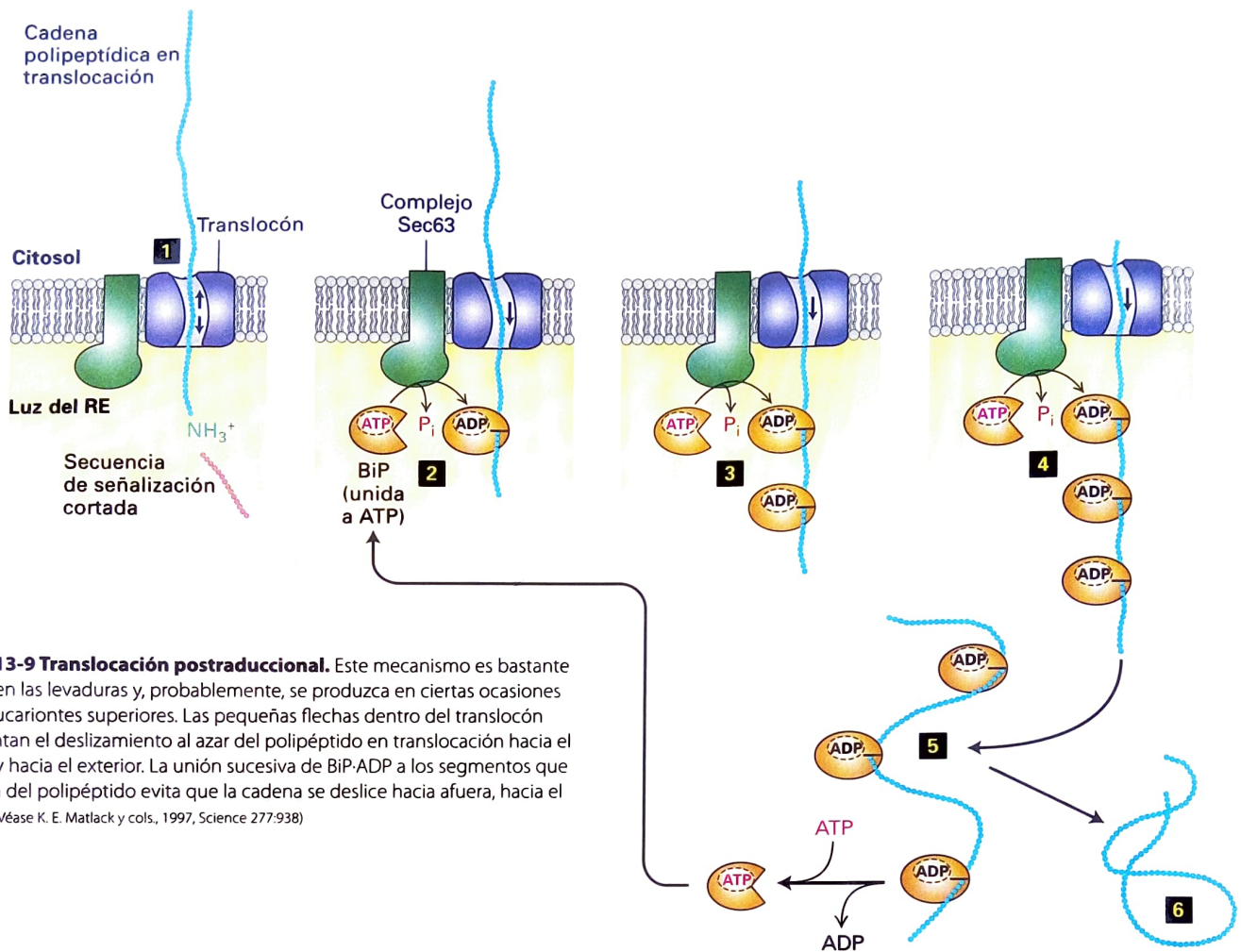


Figura 13-9 Translocación postraduccional. Este mecanismo es bastante común en las levaduras y, probablemente, se produzca en ciertas ocasiones en los eucariontes superiores. Las pequeñas flechas dentro del translocón representan el deslizamiento al azar del polipéptido en translocación hacia el interior y hacia el exterior. La unión sucesiva de BiP-ADP a los segmentos que ingresan del polipéptido evita que la cadena se deslice hacia afuera, hacia el citosol. (Véase K. E. Matlack y cols., 1997, Science 277:938)

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 13.1

Direccionamiento de las proteínas hacia de la membrana del RE y a través de esta

- La síntesis de las proteínas secretadas, las proteínas integrales de la membrana plasmática y las destinadas al RE, el complejo de Golgi o los lisosomas se inicia sobre los lisosomas del citosol, que se unen a la membrana del RE y constituyen el RE rugoso (véase la Fig. 13-1, izquierda).
- La secuencia señal de RE sobre una proteína de secreción naciente consiste en un segmento de aminoácidos hidrófobos localizados en el extremo N-terminal.
- En la translocación cotraduccional, la partícula de reconocimiento de la señal (PRS) reconoce inicialmente la señal RE de una proteína de secreción naciente; se une a ésta y, a su vez, es unida por un receptor de PRS a la membrana del RE; de este modo, se dirige el complejo ribosoma/cadena naciente hacia el RE.
- Luego, la PRS y el receptor de PRS median la inserción de la proteína secretora naciente dentro de translocón (complejo Sec61). La hidrólisis de dos moléculas de GTP por la PRS y su receptor provocan la disocia-

ción de la PRS (véanse las Figs. 13-5 y 13-6). A medida que el ribosoma unido al translocón continúa la traducción, la cadena proteica no plegada es expulsada hacia la luz del RE. No se requiere energía adicional para la translocación.

- El translocón contiene un canal central, tapizado con residuos hidrófobos, que permite el tránsito de una cadena de proteína no plegada, mientras que permanece sellado para los iones y pequeñas moléculas hidrófilas. Además, el canal tiene una compuerta, de modo tal que se abre solo cuando está siendo translocado un polipéptido.

- En la translocación postraduccional, una proteína secretora completa es direccionada hacia la membrana del RE por la interacción de la secuencia de señalización con el translocón. Después, la cadena polipeptídica es dirigida hacia el RE por un mecanismo de trinquete que requiere la hidrólisis de ATP por la chaperona BiP, que estabiliza el polipéptido entrante (véase la Fig. 13-9). En las bacterias, la fuerza impulsora para la translocación postraduccional proviene de la SecA, una ATPasa citosólica que empuja los polipéptidos a través del canal del translocón.

- Tanto en la translocación cotraduccional como postraduccional, una peptidasa señal de la membrana del RE corta la secuencia de señalización del RE de una proteína secretora, poco después de que el extremo N-terminal ingresa en la luz.

13.2 Inserción de las proteínas de la membrana dentro del RE

En capítulos anteriores, hemos descrito numerosos aspectos acerca de la diversidad de configuraciones de las proteínas integrales (que atraviesan la membrana) presentes en toda la célula. Cada una de estas proteínas tiene una orientación única con respecto a la bicapa fosfolipídica de la membrana. Las proteínas integrales de la membrana localizadas en el RE, el Golgi y los lisosomas, así como las proteínas de la membrana plasmática –todas sintetizadas en el RE rugoso– permanecen embebidas en la membrana, en su orientación única, a medida que se mueven hacia sus destinos finales a lo largo de la misma vía que siguen las proteínas solubles que serán secretadas (véase la Fig. 13-1, izquierda). Durante este transporte, la orientación de una proteína de membrana se preserva; es decir, los mismos segmentos de la proteína siempre enfrentan el citosol, mientras que otros segmentos siempre enfrentan la dirección opuesta. De este modo, la orientación final de estas proteínas de la membrana está establecida durante su biosíntesis sobre la membrana del RE. En esta sección, en primer lugar, veremos de qué manera las proteínas integrales pueden interactuar con las membranas; a continuación, examinaremos cómo diferentes tipos de secuencias, conocidas colectivamente como **secuencias topogénicas**, dirigen la inserción y la orientación en la membrana de varias clases de proteínas integrales. Estos procesos se llevan a cabo mediante modificaciones de los mecanismos básicos empleados para translocar las proteínas de membrana que serán secretadas a través de la membrana del RE.

Varias clases topológicas de proteínas integrales de la membrana se sintetizan en el RE

La *topología* de una proteína de membrana se refiere al número de veces que su cadena polipeptídica se expande en la membrana y a la orientación de estos segmentos que se expanden en la membrana dentro de ésta. Los elementos clave que determinan la topología de una proteína son los segmentos que se expanden en el interior de la membrana; habitualmente, son hélices α que contienen entre 20 y 25 aminoácidos hidrófobos que contribuyen a interacciones energéticamente favorables en el interior hidrófobo de la bicapa fosfolipídica.

La mayoría de las proteínas integrales de la membrana se encuentran dentro de una de las cinco clases topológicas que se ilustran en la Figura 13-10. Las clases topológicas I, II, III y las proteínas ancladas por la cola comprenden las proteínas de un *pase único* que poseen solo un segmento de hélice α que se expande en la membrana. Las proteínas tipo I tienen una secuencia de señalización RE N-terminal cortada y están ancladas en la membrana con su región N-terminal hidrófila en la cara luminal (conocida también como cara exoplasmática) y su región hidrófila C-terminal sobre la cara citosólica. Las proteínas tipo II no contienen una secuencia de señalización RE cortada y están orientadas por su región N-terminal hidrófila sobre la cara citosólica y, por su región C-terminal hidrófila, en la cara exoplasmática (opuesta a las proteínas tipo I). Las proteínas tipo III poseen un segmento hidrófobo que se expande en la membrana en su N-terminal y, de este modo, tienen la misma orientación que las proteínas tipo I, pero no contienen

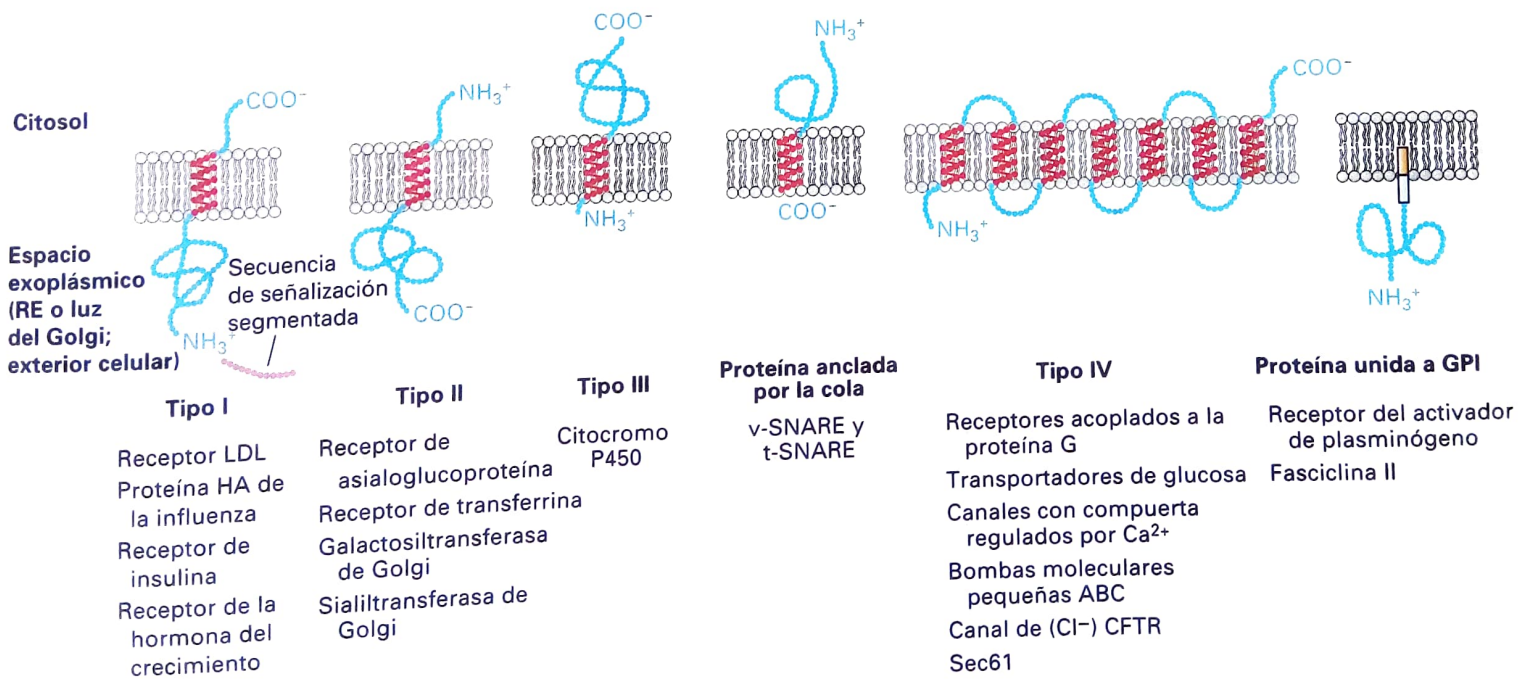


Figura 13-10 Proteínas de la membrana del RE. Cinco clases topológicas de proteínas integrales de la membrana se sintetizan en el RE rugoso, como así también un sexto tipo unido a la membrana por un ancla fosfolipídica. Las proteínas de la membrana se clasifican por su orientación en ésta y los tipos de señales que contienen para dirigirlos hacia allí. Para las proteínas integrales de la membrana, los segmentos hidrófobos de la cadena proteica forman hélices α embebidas en la bicapa de la membrana; las regiones que se encuentran fuera

de ésta son hidrófilas y se pliegan en varias conformaciones. Todas las proteínas tipo IV tienen múltiples hélices α transmembrana. La topología tipo IV mostrada aquí corresponde al de los receptores acoplados a proteína G: siete hélices α , el N-terminal en el lado exoplásmico de la membrana y el C-terminal del lado citosólico. Otras proteínas tipo IV pueden poseer un número diferente de hélices y varias orientaciones del extremo N-terminal y C-terminal. (Véase E. Hartmann y cols., 1989, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* **86**:5786 y C. A. Brown y S. D. Black, 1989, *J. Biol. Chem.* **264**:4442.)

una secuencia de señalización que pueda ser escindida. Finalmente, las proteínas ancladas por su cola tienen un segmento hidrófobo en su C-terminal, que se expande en la membrana. Estas diferentes topologías reflejan distintos mecanismos empleados por la célula para establecer la orientación de los segmentos transmembrana en la membrana, según se analizará en la siguiente sección.

Las proteínas que forman la clase topológica IV contienen dos o más segmentos que se expanden en la membrana y, en ciertas ocasiones, se denominan proteínas *multipaso* (o *de paso múltiple*). Por ejemplo, muchas de las proteínas de transporte analizadas en el Capítulo 11 y los numerosos receptores acoplados a la proteína G expuestos en el Capítulo 15 pertenecen a esta clase. Un tipo final de proteína de membrana carece de un segmento hidrófobo que se expanda en la membrana; en lugar de ello, estas proteínas están ligadas a un ancla fosfolipídica anfipática que se encuentra embebida en la membrana (Fig. 13-10, derecha).

Las secuencias internas de detención de la transferencia y señalización-anclaje determinan la topología de las proteínas de paso único

Comenzamos nuestro análisis acerca del modo en que se determina la topología de las membranas con la inserción de las proteínas integrales de membrana que contienen un segmento hidrófobo único que se expande en la membrana. Hay dos secuencias involucradas en el direccionamiento y la orientación de las proteínas tipo I en la membrana del RE, mientras que las proteínas tipo II y tipo III contienen

una secuencia topogénica interna única. Como veremos, existen tres tipos principales de secuencias topogénicas empleadas para direccionar las proteínas hacia la membrana del RE y para orientarlas dentro de éste. Ya hemos presentado una de ellas, la secuencia de señalización N-terminal. Las otras dos analizadas aquí son las secuencias internas conocidas como *secuencias de detención de la transferencia-anclaje* y *secuencias de señalización-anclaje*. A diferencia de las secuencias de señalización, los dos tipos de secuencias topogénicas internas terminan en la proteína madura como segmentos que se expanden en la membrana. Sin embargo, los dos tipos de secuencias topogénicas internas difieren en su orientación final en la membrana.

Proteínas tipo I Todas las proteínas transmembrana de tipo I poseen una secuencia de señalización N-terminal que las direcciona hacia el RE, así como una secuencia hidrófoba interna que se transforma en la hélice α , que atraviesa la membrana. La secuencia de señalización N-terminal de una proteína naciente tipo I, como el de una proteína soluble que será secretada, inicia la translocación cotraduccional de la proteína mediante la acción combinada de la partícula de reconocimiento de señal y el receptor de dicha partícula. Una vez que el extremo N-terminal del polipéptido creciente ingresa en la luz del RE, la secuencia de señalización se segmenta y la cadena creciente continúa siendo expulsada a través de la membrana del RE. Sin embargo, a diferencia de lo que sucede con las proteínas solubles que serán secretadas, cuando la secuencia de aproximadamente 22 aminoácidos hidrófobos que se transformará en el dominio que se encuentra dentro de la membrana de esta cadena naciente ingresa en el translocón, detiene la transferencia de la proteína a través del canal (Fig. 13-11). El complejo Sec61,

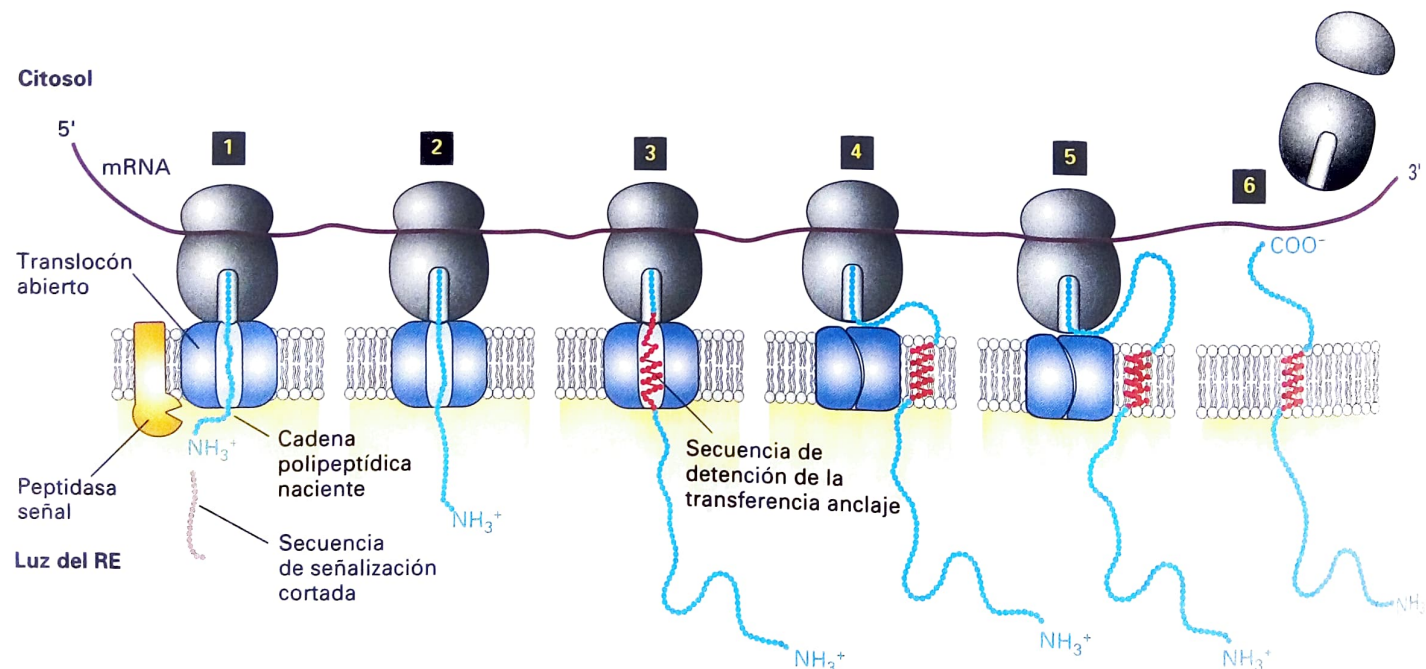


Figura 13-11 Posicionamiento de las proteínas tipo I de paso único.

Paso 1: después de que el complejo ribosoma/cadena naciente se asocia con un translocón en la membrana del RE, la secuencia de señalización N-terminal se segmenta. Este proceso se produce por el mismo mecanismo que el de las proteínas solubles secretoras (véase la Fig. 13-6). Pasos 2, 3: la cadena se alarga hasta que se sintetiza la secuencia de detención de la transferencia anclaje hidrófoba e ingresa en el translocón, lugar en el que evita que la cadena naciente salga más allá, hacia la luz del RE. Paso 4: la secuencia de detención de

la transferencia anclaje se desplaza en dirección lateral, entre las subunidades del translocón, y se ancla a la bicapa de fosfolípidos. Probablemente, en ese momento, el translocón se cierra. Paso 5: a medida que la síntesis continúa, la cadena que está alargándose puede formar un asa hacia el citosol, a través de un pequeño espacio entre el ribosoma y el translocón. Paso 6: cuando la síntesis se ha completado, las subunidades ribosómicas se liberan en el citosol y también se libera la proteína para que difunda en la membrana (véase H. Do y cols., 1996, *Cell* 85:369 y W. Mothes y cols., 1997, *Cell* 89:523).

entonces, puede abrirse como la valva de una almeja y permitir que el segmento hidrófobo del interior de la membrana de este péptido que se transloca se mueva en dirección lateral entre los dominios proteicos que constituyen la pared del translocón (véase la Fig. 13-8). Cuando el péptido sale del translocón de esta manera, se ancla en la bicapa fosfolípida de la membrana. Dada la doble función de una secuencia de este tipo, que consiste en detener el paso de la cadena polipeptídica a través del translocón y en transformarse en el segmento hidrófobo inserto en la membrana dentro, de la bicapa de ésta, se la denomina *secuencia de detención de la transferencia-anclaje*.

Una vez que se ha interrumpido la translocación, la traducción continúa en el ribosoma, que aún se encuentra anclado al translocón que, en ese momento, está desocupado y cerrado. A medida que se sintetiza el extremo C-terminal de la cadena proteica, esta forma un asa en el lado citosólico de la membrana. Cuando se ha completado la traducción, el ribosoma se libera del translocón, y el extremo C-terminal de la proteína tipo I recién sintetizada permanece en el citosol.

Estudios según los cuales los cDNA que codifican varios receptores mutantes de la hormona de crecimiento humana (HGH) se expresan en células de mamífero en cultivo dan sustento a este tipo de mecanismo. El receptor silvestre de la HGH, una proteína típica tipo I, normalmente, se transporta hacia la membrana plasmática. Sin embargo, un receptor mutante que tiene residuos cargados insertos en el segmento

de α -hélice de la membrana o bien falta o bien se transloca por completo hacia la luz del RE y, finalmente, se secreta desde la célula como si fuese una proteína soluble. Estos tipos de experimentos establecen que la hélice α transmembrana hidrófoba del receptor de HGH y de otras proteínas tipo I funciona como secuencia de detención de la transferencia y como ancla de membrana que evita que el extremo C-terminal de la proteína atraviese la membrana del RE.

Proteínas tipo II y tipo III A diferencia de las proteínas tipo I, las proteínas tipo II y tipo III carecen de una secuencia de señalización N-terminal RE escindible. En lugar de ello, ambas poseen una sola *secuencia de señalización-anclaje* interna hidrófoba que funciona, al mismo tiempo, como secuencia de señalización al RE y como una secuencia de anclaje a la membrana. Recordemos que las proteínas tipo II y tipo III tienen orientaciones opuestas en la membrana (véase la Fig. 13-10); esta diferencia depende de la orientación que sus respectivas secuencias de señalización-anclaje adquieran dentro del translocón. La secuencia de señalización-anclaje interna en las proteínas tipo II dirige la inserción de la cadena nascente en la membrana del RE, de modo tal que el extremo N-terminal de la cadena enfrente al citosol, con el uso del mismo mecanismo dependiente de la partícula de reconocimiento de señal descrito para las secuencias de señal (Fig. 13-12a). Sin embargo, la secuencia de señalización-anclaje interna *no* es escindida y se mueve en

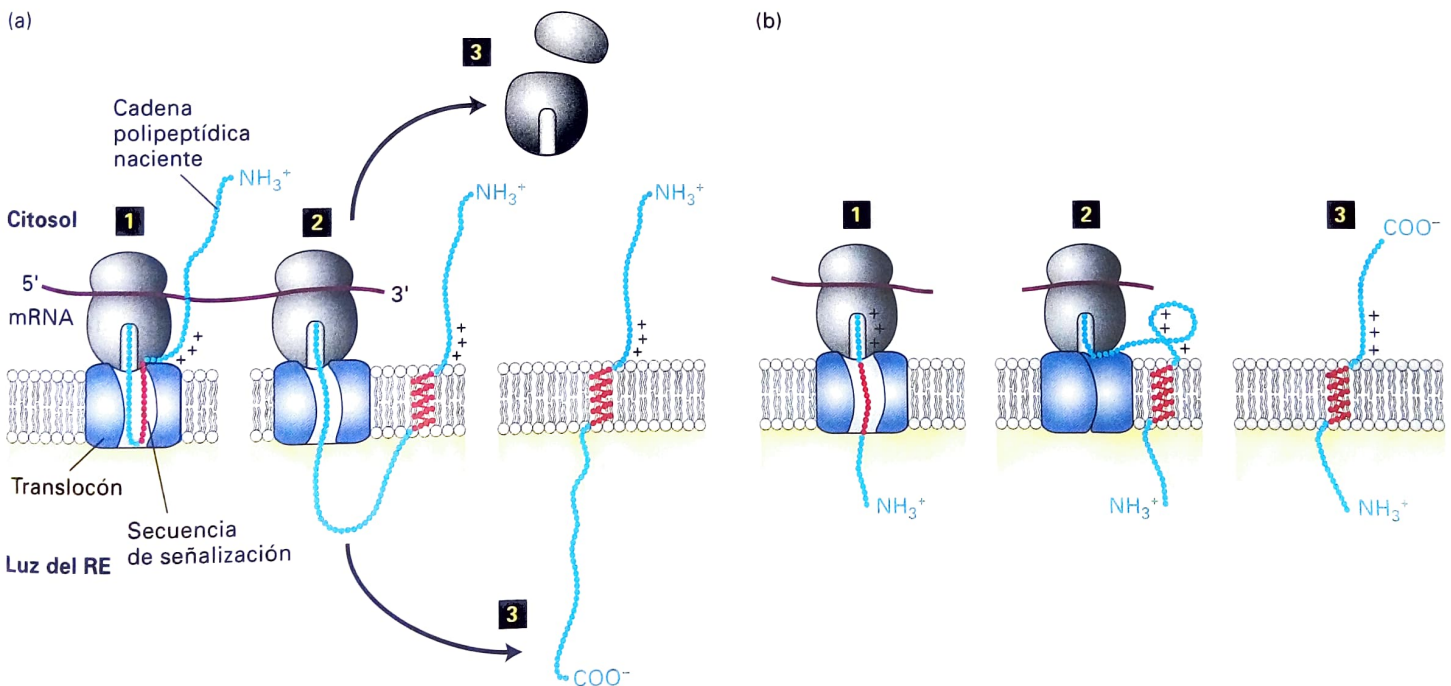


Figura 13-12 Posicionamiento de las proteínas de paso único tipo II y tipo III. (a) Proteínas tipo II. Paso 1: después de que se ha sintetizado la secuencia interna señalización-anclaje en un ribosoma citosólico, es unida por una PRS (no se muestra), que dirige el complejo ribosoma/cadena nascente hacia la membrana del RE. Esto es similar al direccionamiento de las proteínas solubles secretoras, excepto por el hecho de que la secuencia de señalización hidrófoba no se localiza en el extremo N-terminal y no es posteriormente escindida. La cadena nascente se orienta en el translocón, con su porción N-terminal hacia el citosol. Se cree que esta orientación está mediada por los residuos positivamente cargados que se muestran en posición N-terminal con respecto a la secuencia de señalización-anclaje. Paso 2: a medida que la cadena se alarga y se expulsa hacia la luz, la secuencia señalización-anclaje

interna se desplaza en dirección lateral, sale del translocón y ancla la cadena a la bicapa de fosfolípidos. Paso 3: una vez que se ha completado la síntesis proteica, el extremo C-terminal del polipéptido se libera hacia la luz, y las subunidades ribosómicas se liberan al citosol. (b) Proteínas tipo III. Paso 1: el ensamblaje se realiza por una vía similar a las de las proteínas tipo II, excepto que los residuos positivamente cargados en el lado C-terminal de la secuencia de señalización-anclaje hacen que el segmento transmembrana se oriente dentro del translocón, con su porción C-terminal orientada hacia el citosol y el lado N-terminal de la proteína en la luz del RE. Pasos 2, 3: la elongación de la cadena de la porción C-terminal de la proteína se completa en el citosol, y se liberan las subunidades ribosómicas. (Véase M. Spiess y H. F. Lodish, 1986, *Cell* 44:177 y H. Do y cols., 1996, *Cell* 85:369.)

sentido lateral entre los dominios proteicos de la pared del translocón, en la bicapa fosfolipídica, donde funciona como un ancla de membrana. A medida que procede la elongación, la región C-terminal de la cadena creciente sale a través del translocón hacia el interior de la luz del RE mediante translocación cotraduccional.

En el caso de las proteínas tipo III, la secuencia de señalización-anclaje que se localiza cerca del N-terminal inserta la cadena nascente en la membrana del RE con su extremo N-terminal enfrentado a la luz, en la orientación opuesta de la señalización-anclaje de las proteínas tipo II. La secuencia de señalización-anclaje de las proteínas tipo III también funciona como una secuencia de detención de la transferencia y evita la salida posterior de la cadena nascente hacia la luz del RE (Fig. 13-12b). La elongación continua de la cadena C-terminal hasta la secuencia de señalización-anclaje/detención de la transferencia se produce como en las proteínas tipo I, en las que la secuencia hidrófoba se desplaza en dirección lateral entre las subunidades del translocón para anclar el polipéptido a la membrana del RE (véase la Fig. 13-11).

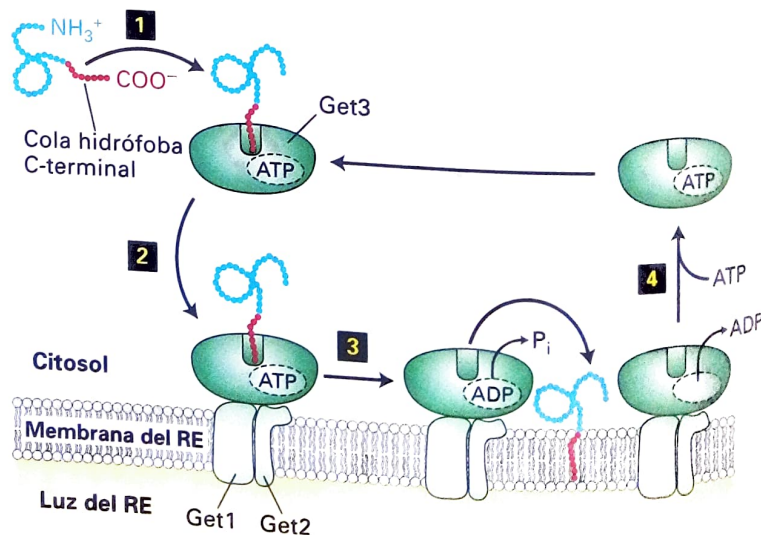
Una de las características de la secuencia de señalización-anclaje, que parece determinar su orientación de inserción, es una elevada concentración de aminoácidos con carga positiva adyacentes a un extremo del segmento hidrófobo. Estos residuos de carga positiva tienden a permanecer en el lado citosólico de la membrana, sin atravesar la membrana hacia la luz del RE. De este modo, la posición de los residuos cargados dicta la orientación de la secuencia de señalización-anclaje dentro del translocón y determina si el resto de la cadena polipeptídica continúa pasando hacia la luz del RE: las proteínas tipo II tienden a presentar residuos con carga positiva en el lado N-terminal de su secuencia de señalización-anclaje, lo que orienta el extremo N-terminal en el citosol y permite el paso del lado C-terminal hacia el RE (Fig. 13-12a), mientras que las proteínas tipo III tienden a tenerlos en el lado del C-terminal de su secuencia de señalización-anclaje. Su extremo N-terminal se inserta en el translocón y el lado C-terminal se restringe al citosol (Fig. 13-12b).

Una demostración experimental sorprendente de la importancia de la carga lateral en la determinación de la orientación de la membrana la proporciona la neuraminidasa, una proteína tipo II presente en la cubierta superficial del virus de la influenza. Hay tres residuos de arginina localizados exactamente en la posición N-terminal con respecto a la secuencia de señalización-anclaje de la neuraminidasa. La mutación de estos tres residuos cargados positivamente a residuos de glutamato

con carga negativa hace que la neuraminidasa adquiera la orientación inversa. Experimentos similares han mostrado que otras proteínas, con orientación tipo II o tipo III, pueden “saltar” a la orientación inversa en la membrana del RE, al mutar los residuos cargados que flanquean el segmento interno de señalización-anclaje interno.

Proteínas ancladas por la cola Para todas las clases topológicas de proteínas que hemos considerado hasta el momento, la inserción en la membrana comienza cuando la partícula de reconocimiento de señal reconoce un péptido topogénico hidrófobo, a medida que surge del ribosoma. El reconocimiento de las proteínas ancladas por la cola, que poseen una sola secuencia topogénica hidrófoba en el C-terminal, presenta un desafío único, ya que el C-terminal solamente está disponible para su reconocimiento después de que se ha completado la traducción y la proteína se ha liberado desde el ribosoma. La inserción de las proteínas ancladas por la cola a la membrana del RE no emplea la partícula de reconocimiento de señal, el receptor de dicha partícula o el translocón; en lugar de ello, depende de una vía dedicada a este propósito, como se muestra en la Figura 13-13. El direccionamiento de las proteínas ancladas por la cola involucra una ATPasa conocida como Get3, que se une al segmento hidrófobo C-terminal de las proteínas ancladas por la cola. El complejo de Get3 unido a una proteína anclada por la cola es reclutado hacia el RE por un receptor de membrana integral dimérico conocido como Get1/Get2, y la proteína anclada por la cola se libera desde Get3 para su inserción en la membrana. La inserción de la proteína anclada por la cola en las membranas del RE por las proteínas Get comparte similitudes fundamentales, en cuanto al mecanismo, con el direccionamiento de las proteínas que llevan secuencias de señalización hacia el RE, por parte de la partícula de reconocimiento de señal y su receptor. Dos diferencias principales entre los dos procesos de direccionamiento consisten en lo siguiente: después de la liberación directamente en la bicapa de la membrana mientras que la partícula de reconocimiento de señal transfiere una secuencia de señalización al translocón y la Get3 acopla el direccionamiento y la transferencia de las proteínas ancladas por la cola a la hidrólisis del ATP, mientras que la proteína que será secretada α la hidrólisis del GTP.

Figura 13-13 Inserción de proteínas ancladas por la cola. Para las proteínas ancladas por la cola C-terminal, el extremo C-terminal hidrófobo no está disponible para la inserción en la membrana hasta que se haya completado la síntesis proteica y la proteína se haya liberado del ribosoma. Paso 1: la Get3, unida al ATP, se une a la cola hidrófoba C-terminal. Esta reacción de unión es facilitada por un complejo de tres proteínas, Sgt2, Get4 y Get5, que secuestran la cola C-terminal hidrófoba antes de transferirla a la Get3-ATP (no se muestra). Paso 2: el complejo ternario Get3-ATP unido a la cola C-terminal ancla las proteínas Get1 y Get2, que están embebidas en la membrana del RE. Paso 3: sucesivamente, el ATP se hidroliza y se libera ADP desde la Get3. Al mismo tiempo, la cola hidrófoba C-terminal se libera desde la Get3 y queda inserta en la membrana del RE. Paso 4: la Get3 se une al ATP, y se libera Get3-ATP desde el complejo de Get1 y Get2 en forma soluble, lista para otro ciclo de unión a la cola C-terminal hidrófoba.



Las proteínas de paso múltiple tienen secuencias topogénicas internas múltiples

La Figura 13-14 resume las disposiciones de secuencias topogénicas en proteínas transmembrana de un solo paso y de paso múltiple. En las proteínas de paso múltiple (tipo IV), cada una de las hélices α transmembrana actúa como una secuencia topogénica en el sentido que ya hemos analizado: pueden actuar para dirigir la proteína hacia el RE, anclarla a su membrana o detener la transferencia de la proteína a través de la membrana. Las proteínas de paso múltiple pertenecen a uno de dos tipos, según el extremo N-terminal se encuentre en el citosol o en el espacio exoplasmático (es decir, la luz del RE, el exterior celular). Esa topología del N-terminal suele estar determinada por el segmento hidrófobo más cercano al extremo N-terminal y la carga de secuencias que lo flanquean. Si una proteína de tipo IV tiene un número *par* de hélices α transmembrana, sus extremos N-terminal y C-terminal quedan orientados hacia el mismo lado de la membrana (Fig. 13-14d). Por el contrario, si una proteína tipo IV tiene un número *impar* de hélices α , sus dos extremos presentarán orientaciones opuestas (Fig. 13-14e).

Proteínas tipo IV con N-terminal en el citosol Entre las proteínas de paso múltiple cuyo extremo N-terminal se extiende dentro del citosol, se encuentran los distintos transportadores de glucosa (GLUT) y la mayoría de las proteínas que actúan como canales iónicos, analizadas en el Capítulo 11. En estas proteínas, el segmento hidrófobo más cercano al extremo N-terminal inicia la inserción de la cadena naciente

en la membrana del RE, con su extremo N-terminal orientado hacia el citosol; por consiguiente, este segmento helicoidal α funciona como una secuencia de señalización-anclaje interna de una proteína tipo II (véase la Fig. 13-12a). A medida que la cadena naciente que sigue a la primera hélice α se alarga, se desplaza a través del translocón hasta que la segunda hélice α hidrófoba se haya formado. Esta hélice impide que la cadena naciente siga pasando a través del translocón; por lo tanto, su función es similar a la de la secuencia de detención de transferencia-anclaje de una proteína tipo I (véase la Fig. 13-11).

Después de la síntesis de las primeras dos hélices α transmembrana, ambos extremos de la cadena naciente enfrentan el citosol y el bucle entre ellas se extiende en la luz del RE. El extremo C-terminal de la cadena naciente continúa creciendo en el interior del citosol, como lo hace en la síntesis de las proteínas tipo I y III. De acuerdo con este mecanismo, la tercera hélice α actúa como otra secuencia de señalización-anclaje tipo II y la cuarta, como otra secuencia de detención de la transferencia-anclaje (Fig. 13-14d). En apariencia, una vez que la primera secuencia topogénica de un polipéptido de paso múltiple inicia la asociación con el translocón, el ribosoma permanece unido a éste y las secuencias topogénicas que surgen del ribosoma se encajan en el translocón sin necesidad de la partícula de reconocimiento de señal ni de su receptor.

Los experimentos que emplean las técnicas de DNA recombinante para intercambiar hélices α hidrófobas han permitido conocer el funcionamiento de las secuencias topogénicas en las proteínas tipo IV-A de paso múltiple. Estos experimentos indican que el orden que guardan

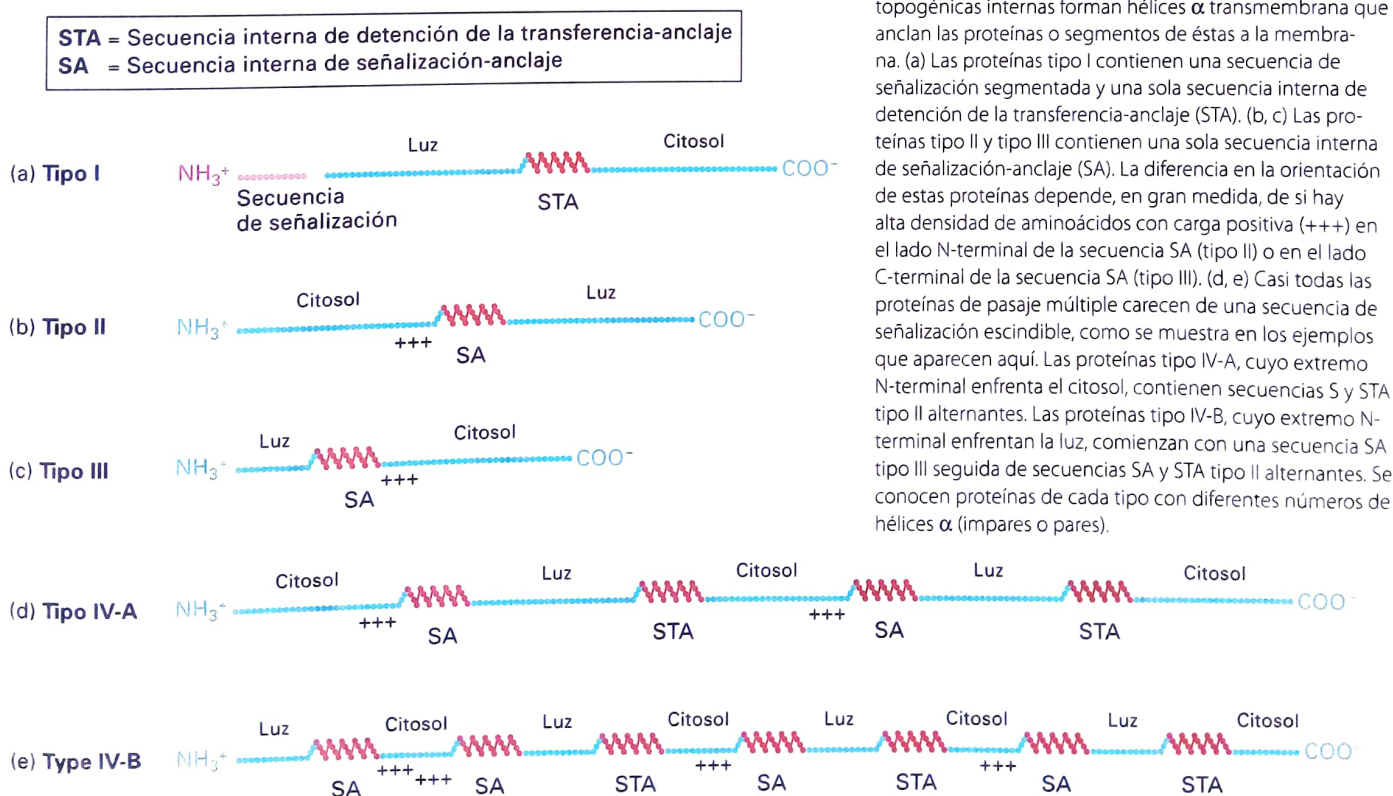


FIGURA 13-14 Las secuencias topogénicas determinan la orientación de las proteínas de membrana del RE.

Las secuencias topogénicas se muestran en rojo; las porciones solubles, hidrófilas, en azul. Las secuencias topogénicas internas forman hélices α transmembrana que anclan las proteínas o segmentos de éstas a la membrana. (a) Las proteínas tipo I contienen una secuencia de señalización segmentada y una sola secuencia interna de detención de la transferencia-anclaje (STA). (b, c) Las proteínas tipo II y tipo III contienen una sola secuencia interna de señalización-anclaje (SA). La diferencia en la orientación de estas proteínas depende, en gran medida, de si hay alta densidad de aminoácidos con carga positiva (+++) en el lado N-terminal de la secuencia SA (tipo II) o en el lado C-terminal de la secuencia SA (tipo III). (d, e) Casi todas las proteínas de pasaje múltiple carecen de una secuencia de señalización escindible, como se muestra en los ejemplos que aparecen aquí. Las proteínas tipo IV-A, cuyo extremo N-terminal enfrenta el citosol, contienen secuencias S y STA tipo II alternantes. Las proteínas tipo IV-B, cuyo extremo N-terminal enfrentan la luz, comienzan con una secuencia SA tipo III seguida de secuencias SA y STA tipo II alternantes. Se conocen proteínas de cada tipo con diferentes números de hélices α (impares o pares).

entre si las hélices α hidrófobas en la cadena creciente determina, en gran medida, si una hélice en particular funcionará como secuencia de señalización-anclaje o como secuencia de detención de la transferencia-anclaje. Además de su hidrofobicidad, la secuencia de aminoácidos específica de una hélice en particular guarda poca relación con su función. De este modo, la primera hélice α N-terminal y las siguientes, en posición impar, funcionan como secuencias de señalización-anclaje, mientras que las hélices intercaladas de número par funcionan como secuencias de detención de la transferencia-anclaje. Esta relación impar-par entre las secuencias de señalización-anclaje y de detención de la transferencia-anclaje está dictada por el hecho de que las hélices α insertas en la membrana adquieren orientaciones alternas a medida que la proteína de paso múltiple se entreteje avanzando y retrocediendo a través de la membrana; las secuencias de señalización anclaje se orientan con sus extremos N-terminales hacia el lado citoplasmático de la bicapa, mientras que las secuencias de detención de la transferencia presentan sus extremos N-terminales orientados hacia el lado exoplasmático de la bicapa.

Proteínas tipo IV con extremo N-terminal en el espacio exoplasmático La gran familia de los receptores acoplados a la proteína G, todos los cuales contienen siete hélices α transmembrana, constituyen el grupo más numeroso de las proteínas de tipo IV-B, cuyo extremo N-terminal se extiende en el espacio exoplasmático. En estas proteínas, la hélice α hidrófoba más cercana al extremo N-terminal con frecuencia es seguida por un grupo de aminoácidos con carga positiva, de manera similar a lo que sucede en la secuencia de señalización-anclaje en el tipo III (véase la Fig. 13-12b). Como resultado, la primera hélice α inserta la cadena nascente en el interior del translocón con el extremo N-terminal hacia la luz (véase la Fig. 13-14e). A medida que la cadena se alarga, se inserta en la membrana del RE alternando secuencias de señalización-anclaje tipo II y secuencias de detención de la transferencia, como se describió para las proteínas del tipo IV-A.

Un ancla de fosfolípidos mantiene algunas proteínas de la superficie celular unidas a la membrana

Algunas proteínas de la superficie celular no están ancladas a la bicapa de fosfolípidos por medio de una secuencia de aminoácidos hidrófobos, sino por una molécula anfipática unida mediante enlaces covalentes, el *glucosilfosfatidilinositol (GPI)* (Fig. 13-15a y Cap. 10). Estas proteínas se sintetizan e inicialmente se quedan ancladas a la membrana del RE exactamente como las proteínas transmembrana del tipo I, con una secuencia de señalización segmentada en el N-terminal y una secuencia de detención de la transferencia-anclaje interna que dirige el proceso (véase la Fig. 13-11). Sin embargo, una secuencia corta de aminoácidos en el dominio luminal, adyacente al dominio transmembrana, es reconocida por una transamidasa localizada dentro de la membrana del RE. Esta enzima fragmenta, en forma simultánea, la secuencia de detención de la transferencia-anclaje original y transfiere la porción luminal de la proteína al ancla GPI preformada en la membrana (Fig. 13-15b).

¿Por qué se produce el cambio de un tipo de ancla de membrana por otra? La unión del ancla GPI, que da como resultado la eliminación del dominio hidrófilo de la proteína que enfrenta el citosol, puede tener varias consecuencias. Las proteínas con anclas GPI, por ejemplo, pueden difundir con relativa rapidez en el plano de la bicapa fosfolipi-

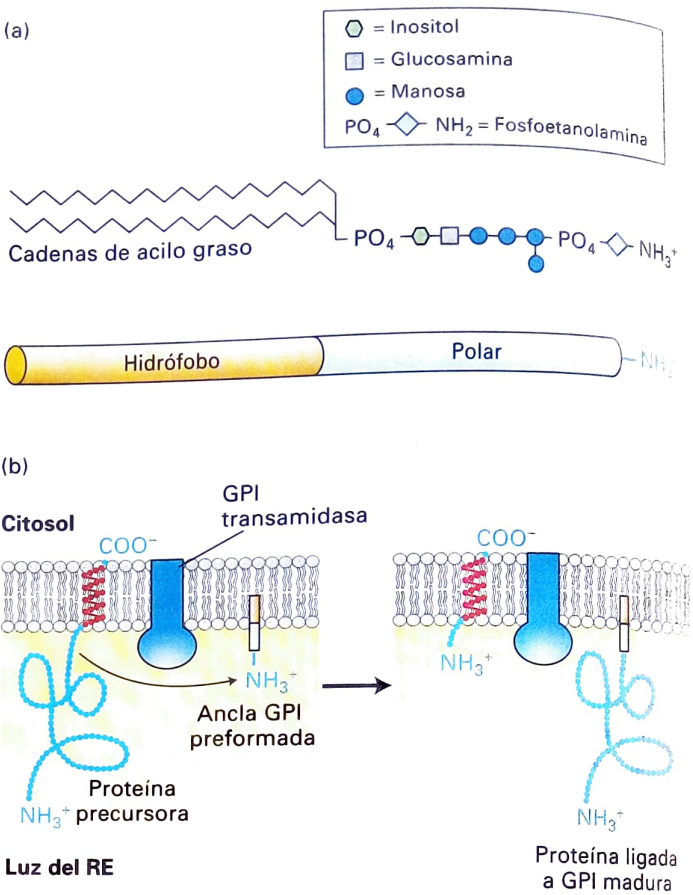


FIGURA 13-15 Proteínas ancladas a GPI. (a) Estructura de un glucosilfosfatidilinositol (GPI) de una levadura. La porción hidrófoba de la molécula está compuesta por cadenas de ácidos grasos, mientras que la porción polar (hidrófila) de la molécula está formada por residuos de hidratos de carbono y grupos fosfato. En otros organismos, las longitudes de las cadenas acilo y de los carbohidratos pueden variar, a partir de la estructura que se muestra. (b) Formación de las proteínas ancladas por GPI a la membrana del RE. La proteína se sintetiza e inicialmente se inserta en la membrana del RE, como se muestra en la Figura 13-11. Una transamidasa específica simultáneamente fragmenta la proteína precursora dentro del dominio que enfrenta el exoplasmático, cerca de la secuencia de detención de la transferencia-anclaje (en rojo), y transfiere el grupo carboxilo del nuevo C-terminal al grupo amino-terminal del ancla GPI preformada. (Véase C. Abeijón y C. B. Hirschberg, 1992, *Trends Biochem. Sci.* **17**:32 y K. Kodukula y cols. 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:4982.)

dica de la membrana. Por el contrario, muchas proteínas ancladas por hélices α insertas en la membrana se ven impedidas para desplazarse en dirección lateral dentro de la membrana porque segmentos de éstas, orientados hacia el citosol, interactúan con el citoesqueleto. Además, el ancla GPI direcciona la proteína unida al dominio apical de la membrana plasmática (y no al basolateral) en ciertas células epiteliales polarizadas, como analizaremos en el Capítulo 14.

La topología de una proteína de membrana puede deducirse a menudo a partir de su secuencia

Como hemos visto, varias secuencias topogénicas de las proteínas integrales de la membrana, sintetizadas en el RE, gobiernan la interacción de la cadena nascente con el translocón. Cuando los científicos comien-

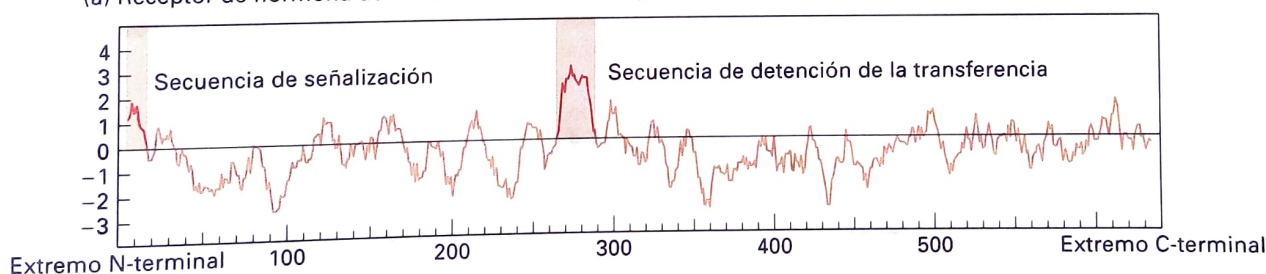
zan a estudiar una proteína de función desconocida, la identificación de las secuencias topogénicas potenciales dentro de la secuencia génica correspondiente puede aportar pistas importantes acerca de la clase topológica y de la función de la proteína. Supongamos, por ejemplo, que el gen para una proteína que se sabe que es necesaria para la vía de señalización entre las células contiene secuencias de nucleótidos que codifican una secuencia aparente N-terminal y una secuencia hidrófoba interna. Estos hallazgos sugieren que esta proteína es una proteína de membrana integral tipo I y, por lo tanto, puede ser un receptor de la superficie celular para un ligando extracelular. Además, la topología tipo I implicada sugiere que el segmento N-terminal que se encuentra entre la secuencia de señalización y la secuencia hidrófoba interna constituye el dominio extracelular que probablemente participará en la unión al ligando, mientras que el segmento C-terminal que se encuentra después de la secuencia hidrófoba interna probablemente será citosólico y participará en la señalización intracelular.

La identificación de las secuencias topogénicas requiere un modo de escanear las bases de datos de secuencias en busca de segmentos que sean lo suficientemente hidrófobos como para constituir una secuencia de señalización o una secuencia ancla transmembrana. Las secuencias topogénicas, con frecuencia, pueden identificarse con la ayuda de programas de computación que generan un *perfil hidropático* de la proteína de interés. El primer paso consiste en asignar un valor, conocido como *índice hidropático*, a cada aminoácido de la proteína. Por convención, a los aminoácidos hidrófobos se les asignan valores positivos y a los hidrófilos, valores negativos. Si bien hay escalas distintas para el índice hidropático, todas asignan los valores más positivos a los aminoácidos con cadenas laterales constituidas, principalmente, por residuos hidrocarbonados (p. ej., fenilalanina y metionina) y los valores más negativos a los aminoácidos cargados (p. ej., arginina y aspartato). El segundo paso consiste en identificar segmentos más ex-

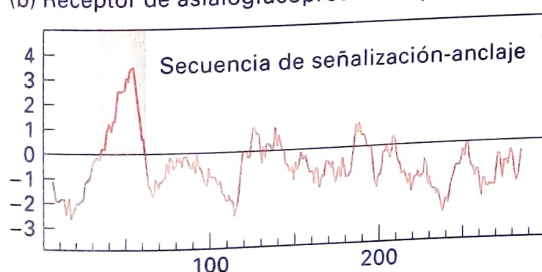
tensos de suficiente hidrofobicidad general como para hacer secuencias señal N-terminales o secuencias de detención de la transferencia internas y secuencias de señalización-anclaje. Para llevar a cabo esta tarea, se calcula el índice hidropático total para cada segmento sucesivo de 20 aminoácidos consecutivos, en toda la longitud de la proteína. Los gráficos de estos valores calculados contra la posición en la secuencia de aminoácidos constituye el perfil hidropático.

La Figura 13-16 muestra los perfiles hidropáticos para tres proteínas de membrana distintas. Los picos prominentes, en estos gráficos, identifican probables secuencias topogénicas, así como su posición y longitud aproximada. Por ejemplo, el perfil hidropático del receptor de la hormona de crecimiento humana revela la presencia de una secuencia de señalización hidrófoba en el extremo N-terminal de la proteína y una secuencia hidrófoba de detención de la transferencia interna (Fig. 13-16a). Sobre la base de este perfil, podemos deducir correctamente que el receptor de la hormona de crecimiento humana es una proteína integral de la membrana tipo I. El perfil hidropático del receptor de la asialoglucoproteína, una proteína de la superficie celular que media en la eliminación de las glucoproteínas extracelulares anormales, muestra una secuencia hidrófoba de señalización-anclaje interna prominente, pero no proporciona indicación acerca de la secuencia de señalización N-terminal hidrófoba (Fig. 13-16b). De este modo, podemos predecir que el receptor de la asialoglucoproteína es una proteína de membrana tipo II o tipo III. La distribución de los residuos cargados en cualquiera de los dos lados de la secuencia de señalización-anclaje con frecuencia puede diferenciar entre estas posibilidades, ya que los aminoácidos con carga positiva que están a ambos lados del segmento que atraviesa la membrana habitualmente se encuentran orientados hacia la cara citosólica de ésta. Por ejemplo, en el caso del receptor de la asialoglucoproteína, el examen de los residuos que se sitúan a ambos lados de la secuencia

(a) Receptor de hormona del crecimiento humana (tipo I)



(b) Receptor de asialoglucoproteína (tipo II)



(c) GLUT1 (tipo IV)

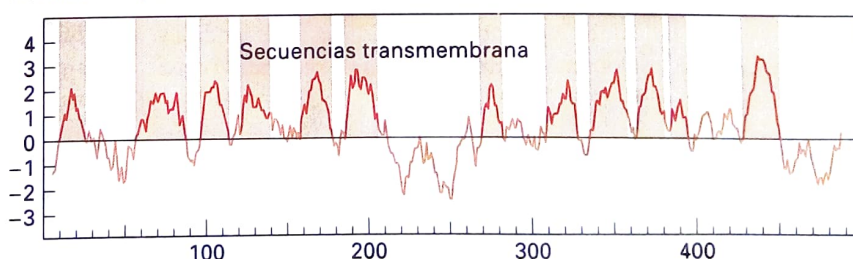


FIGURA EXPERIMENTAL 13-16 Perfiles hidropáticos. Los perfiles hidropáticos pueden identificar probables secuencias topogénicas en proteínas integrales de la membrana. Son generados al representar la hidrofobicidad total de cada segmento de 20 aminoácidos contiguos, en toda la longitud de una proteína. Los valores positivos indican porciones relativamente hidrófobas;

los valores negativos, porciones relativamente polares de la proteína. Están marcadas las secuencias topogénicas probables. Los perfiles complejos para las proteínas de paso múltiple (tipo IV), como la GLUT1 en la parte (c), con frecuencia, deben ser completados con otros análisis para determinar la topología de estas proteínas.

de señalización-anclaje revela que los residuos en el lado N-terminal tienen carga positiva neta, lo que predice correctamente que ésta es una proteína tipo II.

El perfil hidropático del transportador de glucosa GLUT1, una proteína de membrana de paso múltiple, muestra la presencia de numerosos segmentos que son lo suficientemente hidrófobos como para constituir hélices que se insertan en la membrana (Fig. 13-16c). La complejidad de este perfil ilustra la dificultad para identificar con precisión todos los segmentos que están insertos en la membrana en una proteína de paso múltiple y para predecir la topología de las secuencias de señalización-anclaje y de detención de la transferencia. Se han desarrollado algoritmos computacionales más sofisticados que consideran la presencia de los aminoácidos con carga positiva adyacentes a los segmentos hidrófobos, así como la longitud y el espacio que existe entre estos segmentos. Empleando esta información, los mejores algoritmos pueden predecir la topología compleja de las proteínas de paso múltiple con una precisión superior al 75%.

Finalmente, la homología de secuencia con una proteína conocida puede permitir la predicción precisa de la topología de una proteína de paso múltiple recién descubierta. Por ejemplo, los genomas de los organismos multicelulares codifican un número muy grande de proteínas de paso múltiple con siete hélices α que atraviesan la membrana. Las similitudes entre las secuencias de estas proteínas indica que todas éstas poseen la misma topología que el receptor acoplado a la proteína G, que tiene su extremo N-terminal orientado hacia el lado exoplasmático y su C-terminal, hacia al lado citosólico de la membrana.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 13.2

Inserción de las proteínas de la membrana dentro del RE

- Las proteínas integrales de membrana, sintetizadas en el RE rugoso, pertenecen a una de las cinco clases topológicas, como así también a un tipo vinculado a los lípidos (véase la Fig. 13-10).
- Las secuencias topogénicas (las secuencias de señalización N-terminal, las secuencias internas de detención de la transferencia-anclaje y las secuencias internas de señalización-anclaje) dirigen la inserción y la orientación de las proteínas nacientes dentro de la membrana del RE. La orientación es retenida durante el transporte de la proteína de membrana completa a su destino final (p. ej., la membrana plasmática).
- Las proteínas de membrana de paso único contienen una o dos secuencias topogénicas. En las proteínas de paso múltiple, cada segmento helicoidal α puede operar como una secuencia topogénica interna; esto depende de su localización en la cadena polipeptídica y de la presencia de residuos adyacentes positivamente cargados (véase la Fig. 13-14).
- Algunas proteínas de la superficie celular son sintetizadas inicialmente como proteínas de tipo I en la membrana del RE y luego son escindidas con su dominio luminal, transferidas a un ancla GPI (véase la Fig. 13-15).
- La topología de las proteínas de la membrana, con frecuencia, puede predecirse adecuadamente a través de programas de computación que identifican los segmentos topogénicos hidrófobos con la secuencia de aminoácidos, y generan perfiles hidropáticos (véase la Fig. 13-16).

13.3 Modificaciones, plegamiento y control de calidad de las proteínas en el RE

Las proteínas de membrana y las solubles que se secretan en el RE rugoso sufren cuatro modificaciones principales antes de alcanzar su destino final: (1) la adición covalente y el procesamiento de los carbohidratos (*glucosilación*) en el RE y el Golgi, (2) la formación de enlaces disulfuro en el RE, (3) el plegamiento adecuado de las cadenas polipeptídicas y el ensamblaje de proteínas de múltiples subunidades en el RE y (4) las roturas proteolíticas específicas en el RE, el Golgi y las vesículas de secreción. En términos generales, estas modificaciones promueven el plegamiento de las proteínas que serán secretadas en sus estructuras nativas y añaden estabilidad estructural a las proteínas expuestas al ambiente extracelular. Las modificaciones del tipo de la glucosilación permiten, además, que la célula produzca un amplio grupo de moléculas químicamente distintas, en la superficie celular, que constituyan la base de las interacciones moleculares específicas empleadas en la adhesión y la comunicación intercelular.

En la mayoría de las proteínas que se sintetizan en el RE rugoso, se agrega una o más cadenas de carbohidratos; de hecho, la glucosilación es la principal modificación química de la mayoría de estas proteínas. Las proteínas con carbohidratos unidos se conocen como **glucoproteínas**. Las cadenas de hidratos de carbono de las glucoproteínas añadidas al grupo hidroxilo ($-\text{OH}$) en los residuos de serina y treonina se conocen como **oligosacáridos O-ligados**, y las cadenas de carbohidratos unidas al nitrógeno amida de la asparagina se conocen como **oligosacáridos N-ligados**. Los diversos tipos de oligosacáridos O-ligados incluyen las cadenas mucinoides tipo O-ligados (que reciben su nombre por las abundantes glucoproteínas presentes en el moco) y las modificaciones con carbohidratos de los proteoglucanos descritos en el Capítulo 20. Las cadenas O-ligadas contienen solo entre uno y cuatro residuos de azúcar añadidos a las proteínas por enzimas, como la glucosiltransferasa, localizadas en la luz del complejo de Golgi. Los oligosacáridos N-ligados más comunes son más grandes y más complejos, y contienen varias ramas. En esta sección, nos centramos en los oligosacáridos N-ligados cuya síntesis inicial se lleva a cabo en el RE. Después de la N-glucosilación inicial de una proteína en el RE, la cadena de oligosacáridos se modifica en éste y, por lo general, también en el Golgi.

La formación de enlaces disulfuro, el plegamiento proteico y el ensamblaje de las proteínas multiméricas, que tienen lugar exclusivamente en el RE rugoso, se analizan también en esta sección. Solo las proteínas adecuadamente plegadas y ensambladas se transportan desde el RE rugoso hacia el complejo de Golgi y, por último, hacia la superficie celular u otro destino final mediante la vía de secreción. Las proteínas no plegadas, mal plegadas o parcialmente plegadas y ensambladas se retienen de modo selectivo en el RE rugoso y luego pueden degradarse. Consideramos varias características de este "control de calidad" en la última parte de esta sección.

Como se analizó anteriormente, las secuencias de señalización hacia el RE del N-terminal son escindidas de las proteínas secretoras solubles y de las proteínas de membrana tipo I en el RE. Algunas proteínas también sufren otras escisiones proteolíticas específicas en el complejo de Golgi o en las vesículas de secreción. En el siguiente capítulo, describimos este tipo de escisiones, así como las modificaciones de los carbohidratos que ocurren, principal o exclusivamente, en el complejo de Golgi.

Un oligosacárido preformado *N*-ligado se agrega a muchas proteínas en el RE rugoso

La biosíntesis de todos los oligosacáridos *N*-ligados se inicia en el RE rugoso con la adición de un precursor de oligosacárido preformado que contiene 14 residuos (Fig. 13-17). La estructura de este precursor es la misma en los vegetales, animales y eucariontes unicelulares: un oligosacárido ramificado que contiene 3 moléculas de glucosa (Glc), 9 de manosa (Man) y 2 de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc), que puede escribirse como $\text{Glc}_3\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$. Una vez que se ha agregado a la proteína, esta estructura de carbohidrato ramificada se modifica por adición o eliminación de los monosacáridos en los compartimentos del RE y el complejo de Golgi. Las modificaciones a las cadenas *N*-ligadas difieren de una glucoproteína a otra y entre diferentes organismos, pero se conserva un núcleo de 5 de los 14 residuos en las estructuras de todos los oligosacáridos *N*-ligados en las proteínas secretoras y las de membrana.

Antes de la transferencia a una cadena naciente en la luz del RE, el oligosacárido precursor se ensambla en un ancla unida a la membrana denominada *dolicol fosfato*, un lípido poliisoprenoide de cadena larga (Cap. 10). Después de que el primer azúcar, GlcNAc, se une al dolicol fosfato mediante un enlace pirofosfato, los otros azúcares se agregan por medio de enlaces glucosídicos a un conjunto complejo de reacciones, catalizado por enzimas unidas a las caras citosólica o luminal de la membrana del RE rugoso (Fig. 13-17). El oligosacárido pirofosforil

dolicol resultante está orientado de modo tal que la porción del oligosacárido enfrenta la luz del RE.

Todo el precursor de 14 residuos es transferido desde el portador dolicol a un residuo de asparagina en un polipéptido naciente a medida que emerge hacia la luz del RE (Fig. 13-18, paso 1). Solo los residuos de asparagina en las secuencias del tripéptido Asn-X-Ser y Asn-X-Thr (en los que X es cualquier aminoácido, excepto prolina) son sustratos de la *oligosacaril transferasa*, la enzima que cataliza esta reacción. Dos de las tres subunidades de esta enzima son proteínas de membrana del RE cuyos dominios citosólicos se unen al ribosoma, lo que ubica una tercera subunidad de la transferasa, la catalítica, cerca de la cadena de polipéptido creciente en la luz del RE. No todas las secuencias Asn-X-Ser/Thr se glucosilan, y no es posible predecir —a partir de la secuencia de aminoácidos exclusivamente— cuáles son los sitios de potencial glucosilación *N*-ligada que se modificarán; por ejemplo, el rápido plegamiento de un segmento de una proteína que contiene una secuencia Asn-X-Ser/Thr puede evitar la transferencia del oligosacárido precursor a ese segmento.

Inmediatamente después de que el precursor completo, $\text{Glc}_3\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$, se transfiere a un polipéptido naciente, tres enzimas diferentes, denominadas glucosidasas, eliminan los tres residuos de glucosa y un residuo de manosa en particular (Fig. 13-18, pasos 2-4). Los tres residuos de glucosa, que son los últimos residuos agregados durante la síntesis del precursor en el portador de dolicol, parecen actuar como una señal de que el oligosacárido está completo y listo para ser transferido a una proteína.

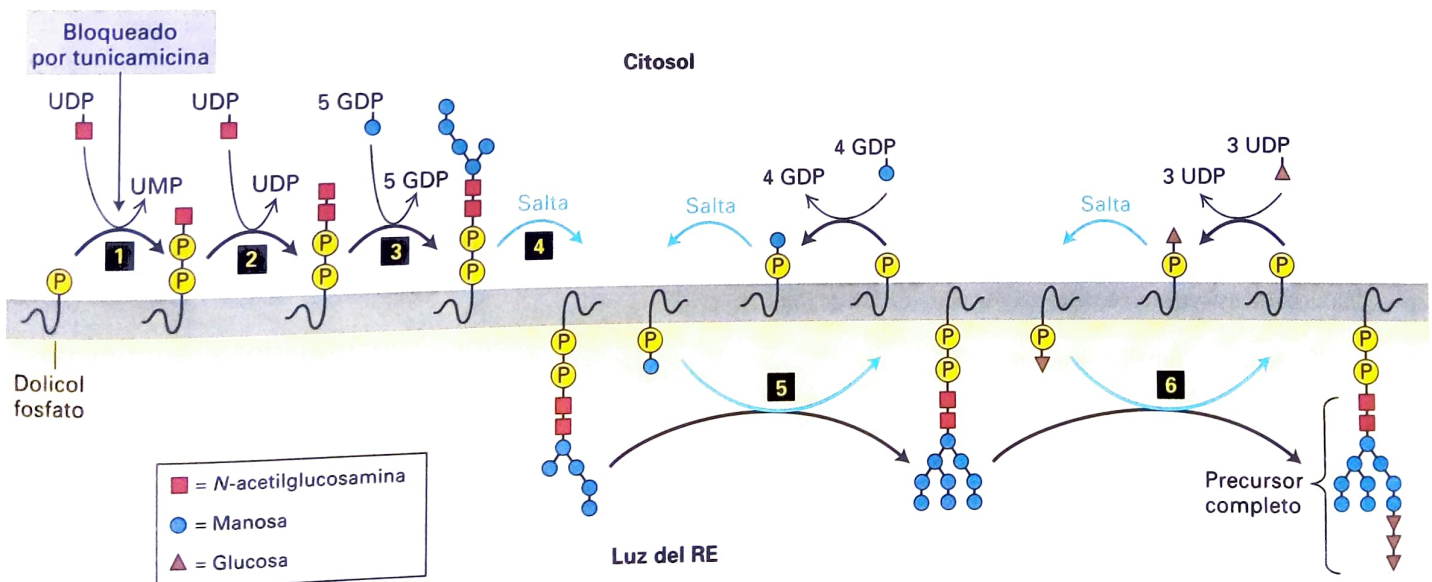


FIGURA 13-17 Biosíntesis del precursor de oligosacáridos. El dolicol fosfato es un lípido fuertemente hidrófobo que contiene 75-95 átomos de carbono, y está embebido en la membrana del RE. Se añaden dos residuos de *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) y cinco residuos de manosa, uno a la vez, al dolicol fosfato de la cara citosólica de la membrana del RE (pasos 1-3). Los donantes de nucleótido-azúcar, en estas reacciones y otras posteriores, se sintetizan en el citosol. Nótese que el primer residuo de azúcar está unido al dolicol mediante un enlace pirofosfato de alta energía. La tunicamicina, que bloquea la primera enzima de esta vía, inhibe la síntesis de todos los oligo-

sacáridos *N*-ligados de las células. Después de que el intermediario dolicol pirofosforilado de siete residuos cambia a la cara luminal (paso 4), los cuatro residuos de manosa y los tres residuos de glucosa restantes se añaden uno por vez (pasos 5, 6). En las últimas reacciones, el azúcar que será añadido se transfiere, primero, desde un nucleótido-azúcar a un transportador dolicol-fosfato en la cara citosólica del RE; luego, el transportador se vuelve hacia la cara luminal, donde el azúcar es transferido al oligosacárido creciente; después, el transportador "vacío" se vuelve nuevamente a la cara citosólica. (Tomado de C. Abejón y C. B. Hirschberg, 1992, *Trends Biochem. Sci.* 17:32.)

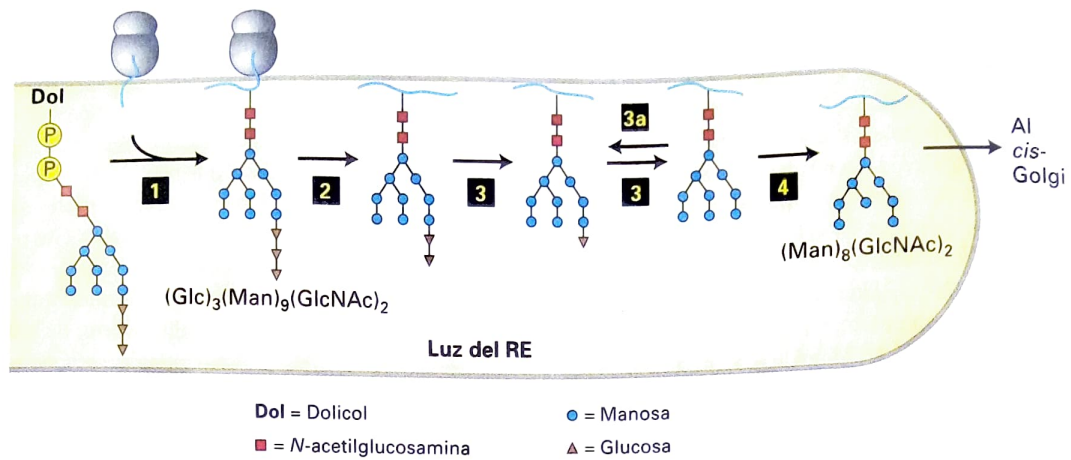


FIGURA 13-18 Adición y procesamiento inicial de oligosacáridos N-ligados. En el RE rugoso de las células de los vertebrados, el precursor $(\text{Glc})_3(\text{Man})_9(\text{GlcNAc})_2$ es transferido desde el transportador dolicol hacia un residuo de asparagina susceptible, en una proteína nascente, tan pronto como la asparagina atraviesa al lado luminal del RE (paso 1). En tres reacciones separadas, en primer lugar un residuo de glucosa (paso 2); luego, dos residuos de glucosa (paso 3) y, finalmente, un residuo de manosa (paso 4) son eliminados.

La adición posterior de un residuo de glucosa (paso 3a) cumple un papel en el plegamiento correcto de muchas proteínas en el plegamiento del RE, como se analizará después. El proceso de glucosilación N-ligada de una proteína soluble secretora se muestra aquí, pero las porciones lumbinales de una proteína integral de la membrana pueden ser modificadas sobre los residuos de asparagina por el mismo mecanismo. (Véase R. Kornfeld y S. Kornfeld, 1985, *Ann. Rev. Biochem.* 45:631 y M. Sousa y A. J. Parodi, 1995, *EMBO J.* 14:4196.)

Las cadenas laterales de los oligosacáridos pueden promover el plegamiento y la estabilidad de las glucoproteínas

Los oligosacáridos unidos a las glucoproteínas cumplen varias funciones. Por ejemplo, algunas proteínas requieren los oligosacáridos N-ligados para plegarse adecuadamente en el RE. Esta función ha sido demostrada en estudios realizados con el antibiótico tunicamicina, que bloquea el primer paso de la formación del precursor ligado a dolicol y, por lo tanto, inhibe la síntesis de todos los oligosacáridos N-ligados en las células (véase la Fig. 13-17, arriba, a la izquierda). Por ejemplo, en presencia de tunicamicina, el polipéptido precursor de la hemaglutinina del virus de la influenza (HA_0) se sintetiza, pero no puede plegarse adecuadamente y formar un trímero normal; en este caso, la proteína permanece mal plegada en el RE rugoso. Más aún, la mutación de una asparagina en particular en la secuencia de la HA a un residuo de glutamina evita la adición de un oligosacárido N-ligado a ese sitio y hace que la proteína se acumule en el RE en un estado desplegado.

Además de promover el plegamiento adecuado, los oligosacáridos N-ligados también confieren estabilidad a muchas glucoproteínas secretadas. Numerosas proteínas secretoras se pliegan adecuadamente y son transportadas hacia su destino final, aunque esté bloqueada la adición de todos los oligosacáridos N-ligados, por ejemplo, por la tunicamicina. Sin embargo, estas proteínas no glucosiladas mostraron ser menos estables que las formas glucosiladas. Por ejemplo, la fibronectina glucosilada, un componente normal de la matriz extracelular, se degrada mucho más lentamente por acción de las proteasas tisulares que la fibronectina no glucosilada.

Los oligosacáridos de ciertas glucoproteínas de la superficie celular también desempeñan una función en la adhesión intercelular. Por ejemplo, la membrana plasmática de los glóbulos blancos (leucocitos) contiene moléculas de adhesión celular (CAM), que están extensamente glucosiladas. Los oligosacáridos de estas moléculas interactúan con el dominio

que une azúcares en ciertas CAM presentes en las células endoteliales que revisten los vasos sanguíneos. Esta interacción une los leucocitos al endotelio y ayuda en su movimiento hacia el interior de los tejidos durante una respuesta inflamatoria a la infección (véase la Fig. 20-39). Otras glucoproteínas de la superficie celular poseen cadenas laterales de oligosacáridos que pueden inducir una respuesta inmunitaria. Un ejemplo común está representado por los antígenos de los grupos sanguíneos A, B, O, que son oligosacáridos O-ligados unidos a glucoproteínas y glucolípidos de la superficie de los eritrocitos y de otros tipos celulares (Fig. 10-20). En ambos casos, los oligosacáridos se agregan a la superficie luminal de estas proteínas de la membrana de modo similar a lo que se muestra en la Figura 13-18 para las proteínas solubles. La cara luminal de estas proteínas de membrana es topológicamente equivalente a la cara exterior de la membrana plasmática en la que, finalmente, terminan estas proteínas.

Los enlaces disulfuro son formados y reordenados por proteínas de la luz del RE

En el Capítulo 3 aprendimos que tanto los **enlaces disulfuro** ($-\text{S}-\text{S}-$) intramoleculares como intermoleculares ayudan a estabilizar la estructura terciaria y cuaternaria de muchas proteínas. Estos enlaces covalentes se forman por la unión oxidativa de los **grupos sulfhidrilo** ($-\text{SH}$) conocidos también como grupos **tiol**, sobre dos residuos de cisteína en la misma cadena polipeptídica o en cadenas polipeptídicas distintas. Esta reacción puede producirse de forma espontánea solo cuando está presente un oxidante adecuado. En las células eucarióticas, se forman enlaces disulfuro solo en la luz del RE rugoso. De modo que los enlaces disulfuro se encuentran solamente en las proteínas de secreción solubles y en los dominios exoplasmáticos de las proteínas de la membrana. Las proteínas citosólicas y de los orgánulos sintetizadas sobre los ribosomas libres (las destinadas a las mitocondrias, cloroplastos, peroxisomas, etc.) habitualmente carecen de enlaces disulfuro.

La formación eficiente de los enlaces disulfuro en la luz del RE depende de la enzima *proteína disulfuro isomerasa (PDI)*, que está presente en todas las células eucarióticas. Esta enzima abunda especialmente en el RE de las células secretoras en órganos como el hígado y el páncreas, en las que se producen grandes cantidades de proteínas que contienen enlaces disulfuro. Como se muestra en la Figura 13-19a, el enlace disulfuro en el sitio activo de la PDI puede transferirse fácilmente a una proteína a través de dos acciones de transferencia tiol-disulfuro secuenciales. La PDI reducida, generada por esta reacción, vuelve a una forma oxidada por acción de una proteína residente en el RE, denominada *Ero1*, que lleva un enlace disulfuro que puede ser transferido a la PDI. La propia *Ero1* se oxida por una reacción con el oxígeno molecular que ha difundido en el RE.

En las proteínas que contienen más de un enlace disulfuro, el apareamiento adecuado de los residuos de cisteína es esencial para la estructura y actividades normales. Los enlaces disulfuro, por lo general, se forman entre cisteínas que aparecen secuencialmente en las secuen-

cias de aminoácidos, mientras que un polipéptido aún se encuentra creciendo sobre el ribosoma. Sin embargo, esta formación secuencial en ciertas ocasiones produce enlaces disulfuro entre las cisteínas equivocadas. Por ejemplo, la proinsulina, un precursor de la hormona peptídica insulina, tiene tres enlaces disulfuro que unen las cisteínas 1 y 4, 2 y 6, y 3 y 5. En este caso, un enlace disulfuro que inicialmente se formó secuencialmente (p. ej., entre las cisteínas 1 y 2) no se hubiera reordenado para que la proteína alcanzara su conformación plegada adecuada. En las células, el reordenamiento de los enlaces disulfuro también se ve acelerado por la PDI, que actúa en un amplio espectro de sustratos proteicos y les permite a éstos alcanzar sus conformaciones termodinámicamente más estables (Fig. 13-19b). Los enlaces disulfuro, en general, se forman en un orden específico; en primer término, estabilizan pequeños dominios de un polipéptido y luego, las interacciones entre segmentos más distantes; este fenómeno se ilustra en el plegamiento de la proteína hemaglutinina (HA) de la influenza, que se analizará en la siguiente sección.

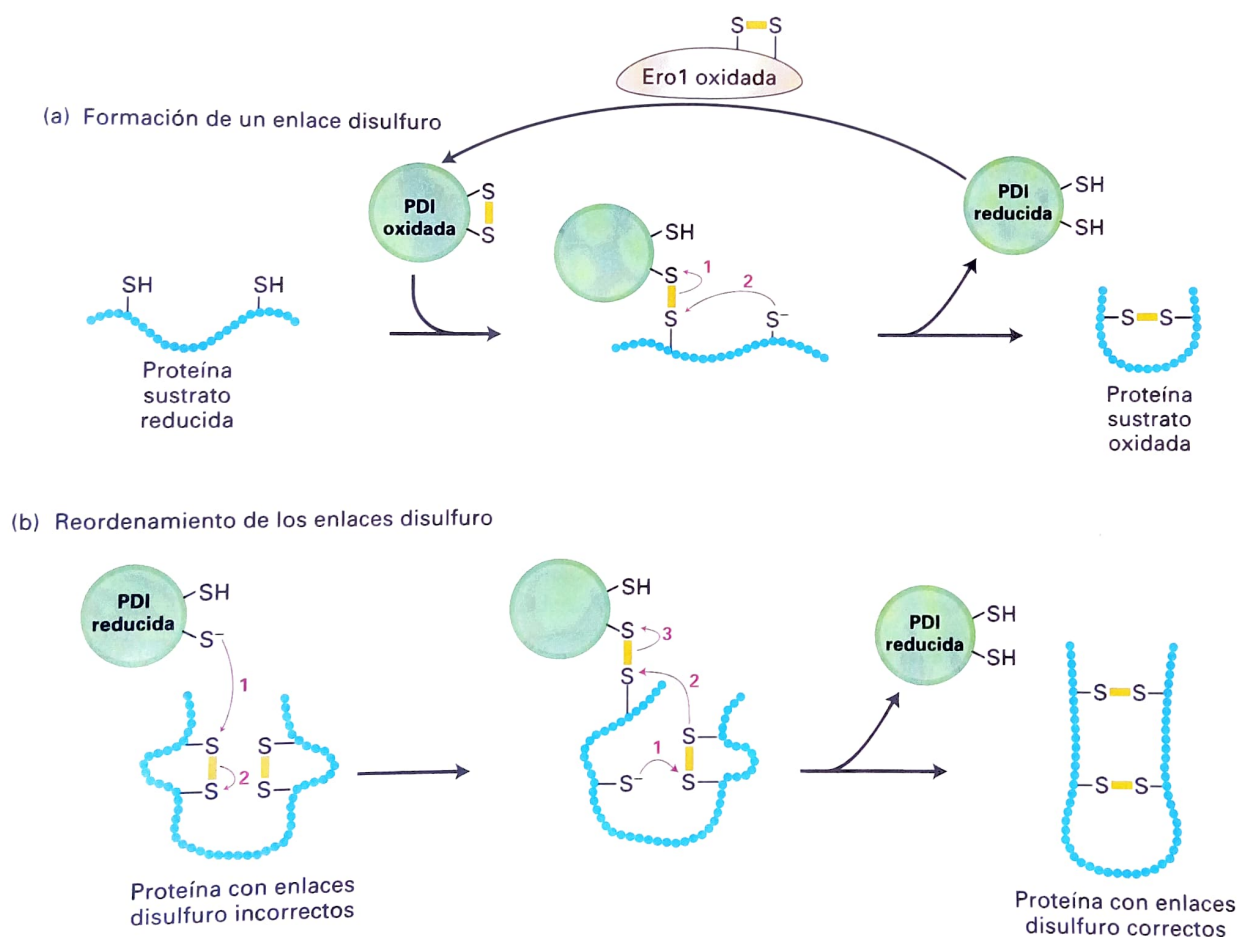


FIGURA 13-19 Acción de la proteína disulfuro isomerasa (PDI). La PDI forma y reacomoda enlaces disulfuro por medio de un sitio activo con dos residuos de cisteína cercanos, que fácilmente se interconvierten entre la forma ditiol reducida y la forma disulfuro oxidada. Las flechas numeradas en rojo indican la secuencia de las transferencias electrónicas. Las barras en amarillo representan los enlaces disulfuro. (a) En la formación de los enlaces disulfuro, la forma ionizada ($-S^-$) de una cisteína de un tiol, en la proteína sustrato, reacciona con el enlace disulfuro ($S-S$) en una PDI oxidada. Luego, un segundo

tiol ionizado en el sustrato reacciona con este intermediario; forma un enlace disulfuro con la proteína sustrato y libera la PDI reducida. A su vez, la PDI transfiere electrones a un enlace disulfuro en la proteína luminal *Ero1*, lo que regenera la forma oxidada de la PDI. (b) La PDI reducida puede catalizar el reacomodamiento de enlaces disulfuro incorrectamente formados mediante reacciones de transferencia similares tiol-disulfuro. En este caso, la PDI reducida se inicia y se regenera en la vía de reacción. Estas reacciones se repiten hasta que se logra la conformación más estable de la proteína. (Véase M. M. Lyles y H. F. Gilbert, 1991, *Biochemistry* 30:619.)

Las chaperonas y otras proteínas del RE facilitan el plegamiento y el ensamblaje de las proteínas

Si bien muchas proteínas desnaturalizadas pueden volver a plegarse en forma espontánea a su estado nativo *in vitro*, este repliegue habitualmente requiere horas para completarse. En lugar de ello, nuevas proteínas solubles y de membrana producidas en el RE, en general, se pliegan a su conformación adecuada en el lapso de minutos después de la síntesis. El rápido plegamiento de estas proteínas recién sintetizadas en las células depende de la acción secuencial de varias proteínas presentes dentro de la luz del RE. Hemos visto ya de qué modo la chaperona molecular BiP puede conducir la translocación postraduccional en las levaduras, al unirse a polipéptidos completamente sintetizados, a medida que ingresan en el RE (véase la Fig. 13-9). La BiP también pue-

de unirse de manera transitoria a cadenas nacientes, a medida que ingresan en el RE durante la translocación cotraduccional. Se cree que la BiP unida evita que los segmentos de una cadena naciente se plieguen incorrectamente o formen agregados, lo que promovería el plegamiento del polipéptido completo en la conformación adecuada. La proteína disulfuro isomerasa contribuye también al plegamiento adecuado porque la conformación 3-D estabiliza por medio de enlaces disulfuro en muchas proteínas.

Como se ilustró en la Figura 13-20, otras dos proteínas del RE, las **lectinas** homólogas (proteínas que unen hidratos de carbono) *calnexina* y *calreticulina*, se unen selectivamente a ciertos oligosacáridos *N*-ligados en cadenas nacientes. El ligando para estas dos lectinas, que se asemeja al precursor oligosacárido *N*-ligado pero que tiene solo un residuo de glucosa ($\text{Glc}_1\text{Man}_5[\text{GlcNAc}]_2$), es generado por una glucosiltransferasa

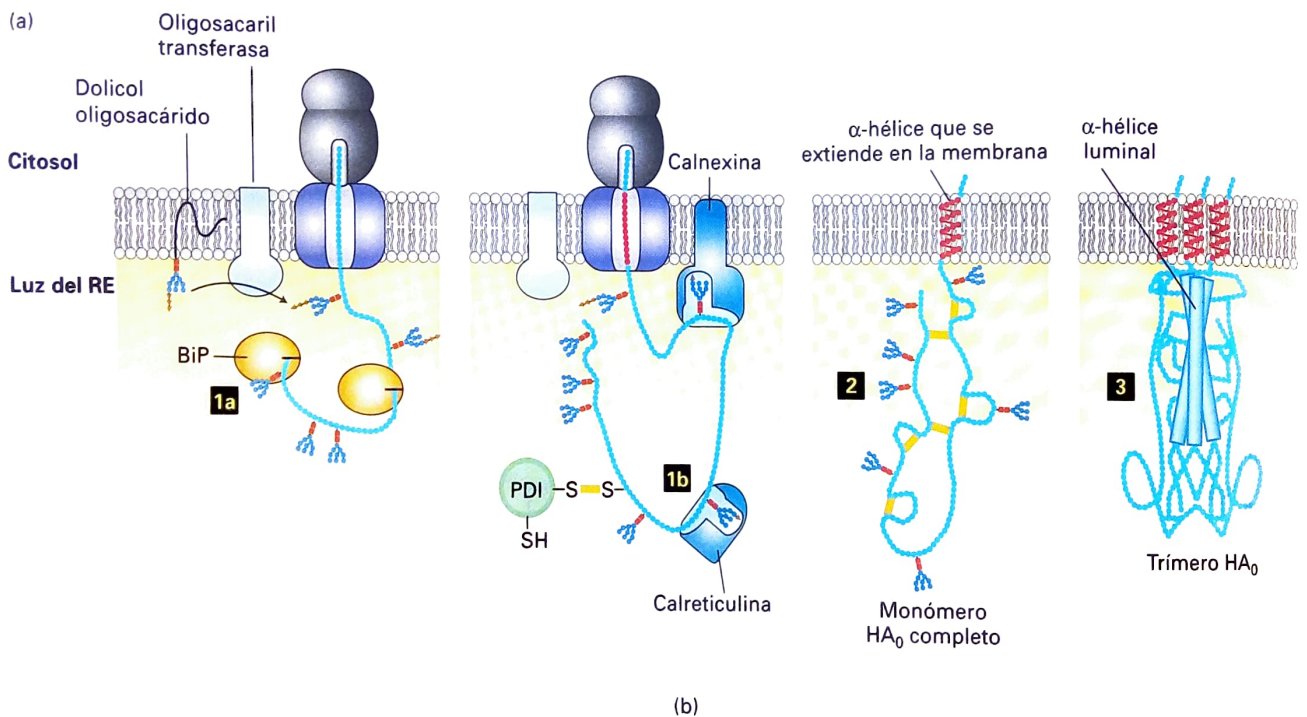
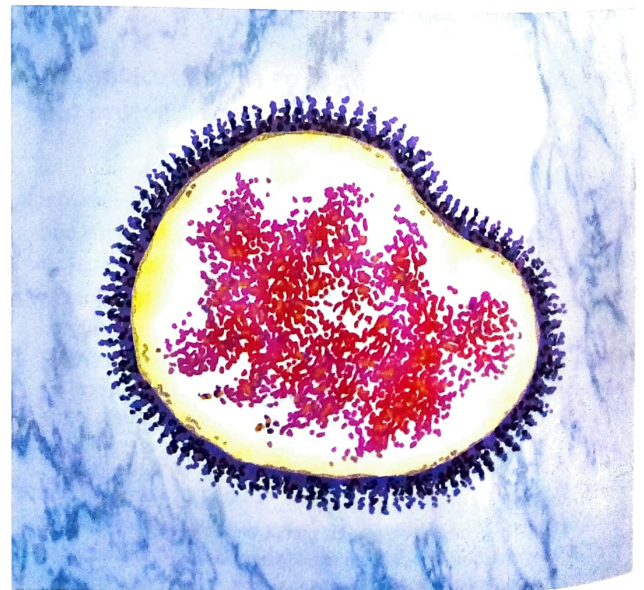
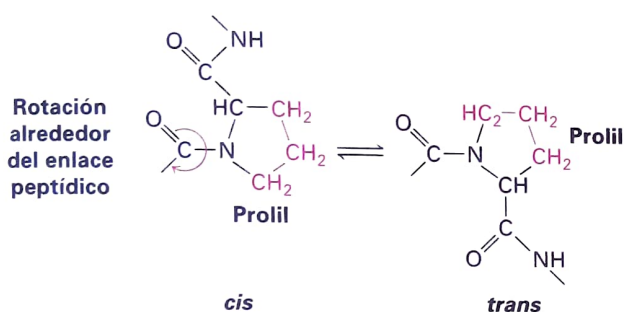


FIGURA 13-20 Plegamiento y ensamblaje de la hemaglutina. (a) Mecanismo de ensamblaje de los trímeros de (HA_0). La unión transitoria de la chaperona BiP (paso 1a) a la cadena naciente y de dos lectinas, la calnexina y la calreticulina, a ciertas cadenas de oligosacáridos (paso 1b) promueve el plegamiento adecuado de segmentos adyacentes. Se agrega un total de siete cadenas de oligosacáridos *N*-ligados a la porción luminal de la cadena naciente durante la translocación cotraduccional, y la PDI cataliza la formación de seis enlaces disulfuro por monómero. Los monómeros de HA_0 completos se anclan a la membrana por una hélice α simple que abarca la membrana con su extremo N-terminal en la luz (paso 2). La interacción de las tres cadenas HA_0 entre sí, inicialmente por medio de sus hélices α transmembrana, aparentemente desencadena la formación de un largo tallo que contiene una hélice α desde la parte luminal de cada polipéptido HA_0 . Finalmente, se producen interacciones entre las tres cabezas globulares y se genera un trímero HA_0 estable (paso 3). (b) Fotomicrografía electrónica de un virión de la influenza completo, que muestra los trímeros de la proteína HA, que sobresalen como espigas desde la superficie de la membrana viral. (La parte [a], véase U. Tatu et al., 1995, *EMBO J.* 14:1340 y D. Herbert et al., 1997, *J. Cell Biol.* 139:613. La parte [b], Chris Bjornberg/Photo Researchers, Inc.)



específica de la luz del RE (véase la Fig. 13-18, paso 3a). Esta enzima actúa solo en las cadenas polipeptídicas no plegadas o mal plegadas y, en este caso, la glucosiltransferasa actúa como uno de los mecanismos de vigilancia primarios para asegurar el control de calidad del plegamiento proteico en el RE, pero el mecanismo por el cual la glucosiltransferasa distingue proteínas plegadas de no plegadas aún no se conoce. La unión de la calnexina y la calreticulina a las cadenas nacientes no plegadas, marcadas con oligosacáridos *N*-ligados glucosilados, evita la agregación de los segmentos adyacentes de una proteína, a medida que está siendo sintetizada en el RE. Así, la calnexina y la calreticulina, al igual que la BiP, impiden que se produzca el plegamiento prematuro incorrecto de segmentos de una proteína recién sintetizada.

Otros catalizadores importantes del plegamiento proteico en la luz del RE son las *peptidil-prolil isomerasas*, una familia de enzimas que acelera la rotación alrededor de los enlaces peptidil-prolil en los residuos de prolina en segmentos no plegados de un polipéptido:



En ciertas ocasiones, estas isomerizaciones constituyen el paso limitante de la velocidad en el plegamiento de los dominios proteicos. Muchas peptidil-prolil isomerasas pueden catalizar la rotación de enlaces expuestos peptidil-prolil indiscriminadamente en numerosas proteínas, pero algunas tienen sustratos proteicos muy específicos.

Importantes proteínas secretoras solubles y de membrana, sintetizadas en el RE, están construidas por dos o más subunidades polipeptídicas. En todos los casos, el ensamblaje de las subunidades que constituyen estas proteínas de múltiples subunidades (multiméricas) se produce en el RE. Una clase importante de proteínas multiméricas secretadas son las inmunoglobulinas, que contienen dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L), todas unidas mediante enlaces disulfuro intracatenarios. La HA es otra proteína multimérica que proporciona un buen ejemplo de plegamiento y ensamblaje de subunidades (véase la Fig. 13-20). Esta proteína trimérica forma las espigas que sobresalen de la superficie de la partícula del virus de la influenza. El trímero HA se forma dentro del RE de una célula huésped infectada, a partir de tres copias de un precursor de la proteína, denominado HA_0 , que posee una sola hélice α que se inserta en la membrana. En el complejo de Golgi, cada una de las tres proteínas HA_0 es escindida para formar dos polipéptidos, HA_1 y HA_2 ; así, cada molécula HA que finalmente se encuentra en la superficie del virus contiene tres copias de HA_1 y tres de HA_2 (véase la Fig. 3-10). El trímero está estabilizado por interacciones entre los dominios exoplasmáticos grandes de los polipéptidos constituyentes, que se extienden hacia el interior de la luz del RE; después de que la HA se ha transportado a la superficie celular, estos dominios se extienden hacia el espacio extracelular. Las interacciones entre las porciones citosólicas más pequeñas y las porciones integradas a la membrana de las subunidades de la HA también ayudan a estabilizar la proteína trimérica. Los estudios

han mostrado que se requieren 10 minutos, exactamente, para que los polipéptidos HA_0 se plieguen y ensamblen en su conformación trimérica adecuada.

Las proteínas plegadas inadecuadamente en el RE inducen la expresión de catalizadores del plegamiento proteico

Las proteínas silvestres sintetizadas en el RE rugoso no pueden salir de este compartimento, a menos que logren su conformación completamente plegada. De forma similar, casi cualquier mutación que evite el plegamiento adecuado de una proteína en el RE bloquea, además, el movimiento del polipéptido de la luz de éste o su membrana hacia el complejo de Golgi. Los mecanismos destinados a retener las proteínas no plegadas o plegadas de modo incompleto dentro del RE, probablemente, incrementen la eficiencia global del plegamiento al mantener formas intermedias en la vecindad de los catalizadores de plegamiento, que son más abundantes en el RE. Las proteínas inadecuadamente plegadas retenidas dentro del RE, por lo general, se encuentran unidas a las chaperonas BiP y a la calnexina. De este modo, estos catalizadores del plegamiento luminal desempeñan dos funciones relacionadas: ayudar al plegamiento de las proteínas normales, evitando su agregación, y unirse a las proteínas mal plegadas para retenerlas en el RE.

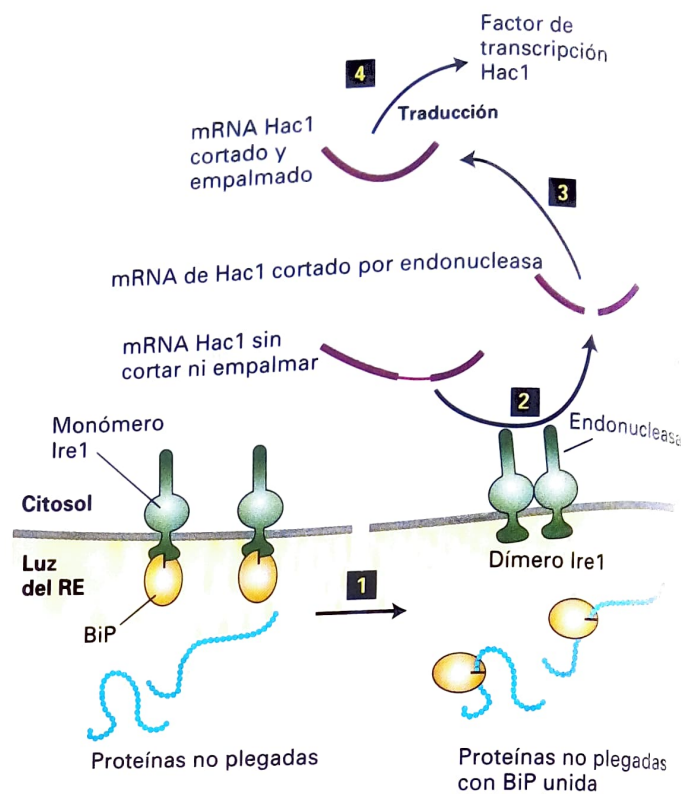
Tanto las células de mamífero como las levaduras responden a la presencia de proteínas no plegadas en el RE rugoso con el aumento de la transcripción de varios genes que codifican chaperonas del RE y otros catalizadores del plegamiento. Un participante clave en esta respuesta a la proteína no plegada es la Ire1, una proteína de la membrana del RE que se encuentra como monómero y como dímero. La forma dimerica, no la monomérica, promueve la formación de Hac1, un factor de transcripción de las levaduras que activa la expresión de los genes, inducida en respuesta a la proteína no plegada. Como se muestra en la Figura 13-21, la unión de la BiP al dominio luminal de la Ire1 monomérica evita la formación del dímero Ire1. Así, la cantidad de BiP libre en la luz del RE determina la proporción relativa de Ire1 monomérica y dimerica. La acumulación de proteínas no plegadas dentro de la luz del RE secuestra las moléculas de BiP y las torna no disponibles para su unión al Ire1. Como resultado, aumentan los niveles de la Ire1 dimerica, lo que conduce a un incremento en el nivel de Hac1 y de la producción de proteínas que ayudan el plegamiento proteico.

Las células de mamífero contienen una vía regulatoria adicional que opera en respuesta a las proteínas no plegadas en el RE. En esta vía, la acumulación de proteínas no plegadas en el RE desencadena la proteólisis de la ATF6, una proteína transmembrana de la membrana del RE, en un sitio dentro del segmento que está inserto en la membrana. El dominio citosólico de ATF6, liberado por proteólisis, se desplaza luego hacia el núcleo, donde estimula la transcripción de los genes que codifican las chaperonas RE. La activación de un factor de transcripción por medio de esta proteólisis regulada intramembrana se produce también en la vía de señalización Notch y durante la activación del factor de transcripción SREBP en respuesta al colesterol (véanse las Figs. 16-35 y 16-37).



Una forma hereditaria de enfisema ilustra los efectos dañinos que pueden resultar del plegamiento inadecuado de las proteínas en el RE. Esta enfermedad es provocada por una mutación puntual en la antitripsina α_1 , que normalmente es secretada por los hepatocitos y los

FIGURA 13-21 La respuesta de proteína no plegada. La Ire1, una proteína transmembrana de la membrana del RE, tiene un sitio de unión para la BiP en su dominio luminal; el dominio citosólico contiene una endonucleasa de RNA específica. Paso 1: la acumulación de proteínas no plegadas en la luz del RE une moléculas BiP, lo que las libera de la Ire1 monomérica. La dimerización de la Ire1 genera, entonces, su actividad de endonucleasa. Pasos 2, 3: el precursor de mRNA, no segmentado ni empalmado, que codifica el factor de transcripción Hac1 es escindido por la Ire1 dimerica, y los dos exones son unidos para formar un mRNA funcional de Hac1. La evidencia actual indica que este procesamiento sucede en el citosol, aunque el procesamiento del pre-mRNA generalmente se produzca en el núcleo. Paso 4: el Hac1 se traduce a la proteína Hac1, que luego vuelve al núcleo y activa la transcripción de los genes que codifican varios catalizadores del plegamiento de las proteínas. (Véase U. Rueggsegger et al., 2001, *Cell* 107:103; A. Bertolotti y cols., 2000, *Nat. Cell Biol.* 2:326 y C. Sidrauski y P. Walter, 1997, *Cell* 90:1031.)



macrófagos. La proteína silvestre se une a la tripsina, a la que inhibe, y también a la proteasa sanguínea elastasa. En ausencia de antitripsina α_1 , la elastasa degrada el tejido fino del pulmón que participa en la absorción del oxígeno, lo que produce finalmente los síntomas del enfisema. Si bien la antitripsina α_1 mutante es sintetizada en el RE rugoso, no se pliega adecuadamente y forma un agregado casi cristalino que no se exporta desde el RE. En los hepatocitos, la secreción de otras proteínas también se ve afectada, a medida que el RE rugoso se va llenando con la antitripsina α_1 agregada. ■

Las proteínas no ensambladas o mal plegadas del RE con frecuencia son transportadas hacia el citosol para su degradación

Las proteínas solubles secretoras y las proteínas de membrana, así como las subunidades no ensambladas de las proteínas multiméricas, con frecuencia se degradan en un lapso de aproximadamente una hora o dos, después de su síntesis en el RE rugoso. Durante muchos años, los investigadores consideraron que las enzimas proteolíticas presentes en la luz del RE catalizaban la degradación de los polipéptidos mal plegados o no ensamblados, pero estas proteasas nunca fueron halladas. Estudios más recientes han mostrado que las proteínas de secreción mal plegadas son reconocidas por proteínas de membrana específicas del RE y son direccionadas para su transporte desde la luz del RE hacia el citosol, en un proceso conocido como *dislocación*.

La dislocación de las proteínas mal plegadas al exterior del RE depende de un conjunto de proteínas localizadas en la membrana de éste y en el citosol, que llevan a cabo tres funciones básicas. La primera de éstas es el reconocimiento de las proteínas mal plegadas que serán sustratos para la reacción de dislocación. Un mecanismo de reconocimiento implica el recorte de las cadenas de hidrato de carbono N-ligadas por la enzima α -manosidasa I (Fig. 13-22). Los glucanos recortados de la estructura $\text{Man}_8(\text{GlcNAc})_2$ son reconocidos por la proteína lectinoide conocida como EDEM, y los glucanos que adicionalmente se recortan a $\text{Man}_7(\text{GlcNAc})_2$ son reconocidos por la proteína lectinoide OS-9. Tanto la EDEM como la OS-9 direccionan la glucoproteína recortada hacia el complejo de dislocación para su degradación. Se desconoce el mecanismo preciso por el cual la α -manosidasa I distingue proteínas que no pueden plegarse adecuadamente y, de este modo, son legítimos sustratos para el proceso de dislocación, durante el cual presentan estados transitorios parcialmente plegados hasta que adquieren su conformación completamente plegada. Es probable que el recorte de las cadenas

de hidratos de carbono N-ligadas por las α -manosidasas I se produzca lentamente, de modo tal que solo las glucoproteínas que permanecen mal plegadas en la luz del RE durante un período lo suficientemente prolongado son recortadas y, por lo tanto, direccionadas para su degradación. Las proteínas luminales que carecen de cadenas de hidratos de carbono también pueden ser direccionadas para su degradación, lo que indica que deben existir, además, otros procesos para el reconocimiento de las proteínas no plegadas. Otros mecanismos destinados a reconocer proteínas no plegadas que no involucran el recorte de cadenas de hidratos de carbono N-ligados deberían existir porque las proteínas de membrana que carecen de cadenas de hidratos de carbono N-ligados, de otra manera, no podrían ser direccionadas para su degradación.

Una vez que una proteína no plegada ha sido identificada, es direccionada para la dislocación a través de la membrana del RE. Debe haber algún tipo de canal para la dislocación de las proteínas mal plegadas a través de la membrana del RE, y existe un complejo de, al menos, cuatro proteínas integrales de la membrana, conocido como el complejo ERAD (degradación asociada al RE). La estructura del canal de dislocación y el mecanismo por el cual las proteínas mal plegadas atraviesan la membrana del RE aún no se conocen.

A medida que segmentos del polipéptido dislocado son expuestos al citosol, éstos encuentran enzimas citosólicas que impulsan su dislocación. Una de estas enzimas es una ATPasa denominada p97, un miembro de una familia de proteínas conocida como la familia de ATPasa AAA, que acopla la energía de la hidrólisis del ATP al ensamblaje de los complejos proteicos. En la retrotranslocación, la hidrólisis del ATP por la p97 puede proporcionar la fuerza impulsora para dirigir las proteínas mal plegadas desde la membrana del RE hacia el citosol. A medida que las proteínas mal plegadas reingresan en el citosol, enzimas que son ligasas de ubiquitina —específicas de la membrana

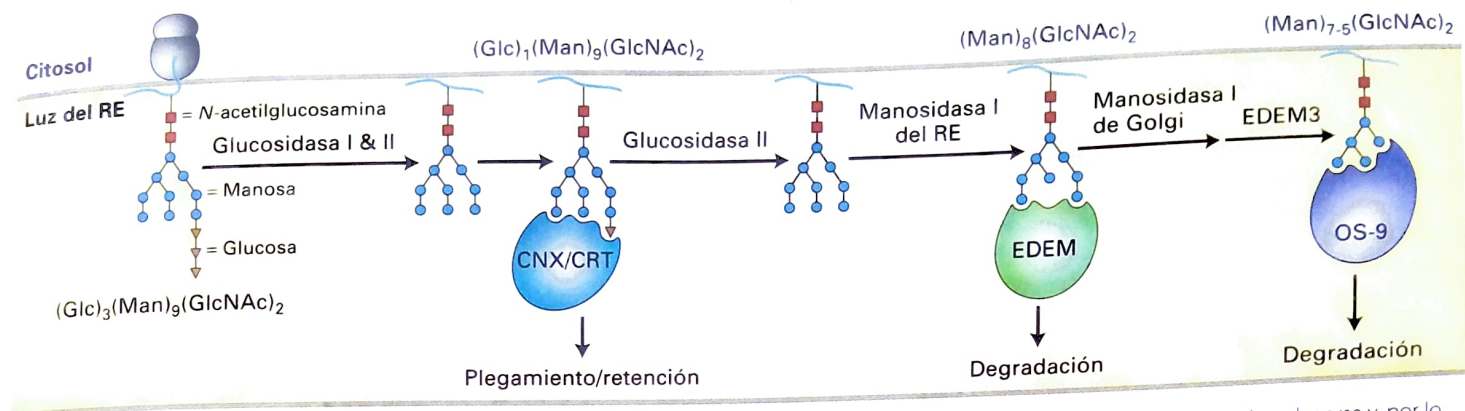


FIGURA 13-22 Las modificaciones de los oligosacáridos N-ligados se utilizan para monitorizar el plegamiento y controlar la calidad. Después de la eliminación de tres residuos de glucosa de los oligosacáridos N-ligados en el RE, puede volver a añadirse una sola molécula de glucosa, por acción de una glucosil transferasa, para formar $\text{Glc}_1\text{Man}_9(\text{GlcNAc})_2$ (véase la Fig. 13-18, paso 5a). Este hidrato de carbono N-ligado modificado une a las lectinas calnexina (CNX) y calreticulina (CRT) para la retención en el RE y la participación de las

chaperonas de plegamiento. Las proteínas que no pueden plegarse y, por lo tanto, quedan retenidas en el RE por períodos más prolongados son sometidas al recorte de manosa por la manosidasa I para formar $\text{Man}_8(\text{GlcNAc})_2$, que es reconocida por la lectina EDEM, o el recorte posterior a $\text{Man}_{7.5}(\text{GlcNAc})_2$, reconocido por la OS-9. El reconocimiento por la EDEM o la OS-9 conduce a la dislocación de la proteína mal plegada fuera del RE, la ubiquitinación y la degradación en el proteasoma.

del RE— pueden agregar residuos de ubiquitina al péptido dislocado. En forma similar a la acción de la p97, la reacción de ubiquitinación está acoplada a la hidrólisis de ATP; esta liberación de energía posiblemente contribuya también al atrapamiento de las proteínas en el citosol. Los polipéptidos poliubiquitinados resultantes, ahora por completo en el citosol, son eliminados de la célula en conjunto por degradación en el proteasoma. El rol de la poliubiquitinación en el direccionamiento de las proteínas al proteasoma se analiza más extensamente en el Capítulo 3 (véanse las Figs. 3-29 y 3-34).

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 13.3

Modificación, plegamiento y control de calidad de las proteínas en el RE

- Todos los oligosacáridos N-ligados, que se unen a residuos de asparagina, contienen un núcleo de dos residuos de N-acetilglucosamina y, al menos, tres residuos de manosa; habitualmente, tienen varias ramas. Los oligosacáridos O-ligados, que se unen a residuos de serina o treonina, generalmente son cortos y con frecuencia contienen solo de uno a cuatro residuos de azúcar.

- La formación de oligosacáridos N-ligados, comienza con el ensamblaje de un precursor conservado de 14 residuos, con elevada cantidad de manosa en el dolicol, un lípido de la membrana del RE rugoso (véase la Fig. 13-17). Después de que este oligosacárido preformado ha sido transferido a residuos de asparagina específicos, en las cadenas nascentes de polipéptidos en la luz del RE, se eliminan tres residuos de glucosa y uno de manosa (véase la Fig. 13-18).

- Las cadenas laterales de oligosacáridos pueden ayudar al plegamiento adecuado de las glucoproteínas, a proteger las proteínas maduras de la proteólisis, participar en la adhesión intercelular y funcionar como antígenos.

- Los enlaces disulfuro se agregan a muchas proteínas secretoras solubles y el dominio exoplásmico de las proteínas de membrana en el RE. La proteína disulfuro isomerasa (PDI), presente en la luz del RE, cataliza tanto la formación como la reubicación de los enlaces disulfuro (véase la Fig. 13-19).

- La chaperona BiP, las lectinas calnexina y calreticulina y las peptidil-prolil isomerasas operan en conjunto para asegurar el adecuado plegamiento de las nuevas proteínas secretoras y de membrana del RE. Las subunidades de las proteínas multiméricas también se ensamblan en el RE (véase la Fig. 13-20).

- Solo las proteínas plegadas adecuadamente y las subunidades ensambladas se transportan desde el RE rugoso hacia el complejo de Golgi en vesículas.

- La acumulación de proteínas plegadas de un modo anómalo y de subunidades no ensambladas en el RE pueden inducir la expresión aumentada de catalizadores del plegamiento de proteínas en el RE, por medio de la respuesta de proteínas no plegadas (Fig. 13-21).

- Las proteínas no ensambladas, o plegadas incorrectamente en el RE, con frecuencia son transportadas nuevamente hacia el citosol, donde se degradan en la vía de la ubiquitina/proteasoma (véase la Fig. 13-22).

13.4 Direccionamiento de las proteínas hacia las mitocondrias y los cloroplastos

En el resto de este capítulo, examinaremos el modo en el que las proteínas sintetizadas en los ribosomas citosólicos son clasificadas hacia las mitocondrias, los cloroplastos, los peroxisomas, los ribosomas y el núcleo (Fig. 13-1). Tanto en las mitocondrias como en los cloroplastos, la luz interna denominada *matriz* está rodeada por una membrana do-

ble, y existen subcompartimentos internos dentro de la matriz. Por el contrario, los peroxisomas están rodeados por una sola membrana y tienen un solo compartimento de matriz luminal. En función de estas y otras diferencias, consideramos los peroxisomas por separado, en las siguientes secciones. El mecanismo de transporte de las proteínas hacia el interior y el exterior del núcleo difiere en muchos aspectos del envío de éstas hacia otros orgánulos; esto se analizará en la última sección.

Además de encontrarse limitados por dos membranas, las mitocondrias y los cloroplastos comparten tipos semejantes de proteínas de transporte electrónico y emplean la ATPasa de clase F para sintetizar ATP (véase la Fig. 12-24). Notablemente, estas características son compartidas por las bacterias gramnegativas. De igual modo, las bacterias, las mitocondrias y los cloroplastos contienen su propio DNA, que codifica los rRNA, tRNA y algunas proteínas de los orgánulos (Cap. 6). Más aún, el crecimiento y la división de las mitocondrias y los cloroplastos no se encuentran acoplados a la división nuclear. Estos orgánulos crecen por la incorporación de proteínas y lípidos celulares, y se forman orgánulos nuevos por la división de otros preexistentes. Las numerosas similitudes de las bacterias de vida libre con las mitocondrias y los cloroplastos permitieron comprender que estos orgánulos surgieron por la incorporación de bacterias a células eucarióticas ancestrales, lo que forma orgánulos endosimbióticos (véase la Fig. 6-20). Esta similitud de secuencia de muchas proteínas de translocación de la membrana, compartida por las mitocondrias, los cloroplastos y las bacterias proporciona la evidencia más sorprendente para esta relación evolutiva ancestral. En esta sección, examinaremos en detalle estas proteínas de translocación de la membrana.

Las proteínas codificadas por el DNA de las mitocondrias o de los cloroplastos se sintetizan en ribosomas que se encuentran dentro de estos orgánulos y se dirigen hacia el subcompartimento correcto inmediatamente después de su síntesis. La mayoría de las proteínas localizadas en las mitocondrias y los cloroplastos, sin embargo, son codificadas por genes del núcleo y son importadas hacia los orgánulos después de su síntesis en el citosol. Aparentemente, a medida que las células eucarióticas evolucionaron a lo largo de miles de millones de años, gran parte de la información genética del DNA bacteriano ancestral, en estos orgánulos endosimbióticos, se mudó –por un mecanismo desconocido– al núcleo. Las proteínas precursoras sintetizadas en el citosol, destinadas a la matriz mitocondrial o al espacio equivalente en los cloroplastos, el estroma, contienen habitualmente secuencias de captación-direccionamiento N-terminal que especifican la unión a las proteínas receptoras de la superficie del orgánulo. Por lo general, esta secuencia es segmentada una vez que llega a la matriz o al estroma. Claramente, estas secuencias de captación-direccionamiento son semejantes en su localización y función general a la secuencia señal de señalización que dirige las proteínas nacientes hacia la luz del RE. Aunque los tres tipos de señales comparten ciertas características de secuencia en común, sus secuencias específicas difieren considerablemente, según lo resume el Cuadro 13-1.

Tanto en las mitocondrias como en los cloroplastos, la importación de proteínas requiere energía y se produce en puntos en los que se encuentran muy cercanas las membranas interna y externa del orgánulo. Como las mitocondrias y los cloroplastos contienen múltiples membranas y espacios limitados por éstas, la clasificación de muchas proteínas para enviarlas a su localización correcta, con frecuencia, re-

Cuadro 13-1 Secuencias de direccionamiento de la captación que dirigen las proteínas desde el citosol hacia los orgánulos*

Orgánulo de direccionamiento	Localización de la secuencia dentro de la proteína	Eliminación de la secuencia	Naturaleza de la secuencia
Retículo endoplasmático (luz)	N-terminal	Sí	Núcleo de 6-12 aminoácidos hidrófobos, con frecuencia, precedido por uno o más aminoácidos básicos (Arg, Lys)
Mitocondria (matriz)	N-terminal	Sí	Hélice anfipática, 20-50 residuos de longitud, con residuos de Arg y Lys a un lado y residuos hidrófobos al otro lado
Cloroplasto (estroma)	N-terminal	Sí	Sin motivos comunes; generalmente, rica en Ser, Thr y pequeños residuos hidrófobos; y pobre en Glu y Asp
Peroxisoma (matriz)	C-terminal (en la mayoría de las proteínas); N-terminal (en pocas proteínas)	No	Señal PTS1 (Ser-Lys-Leu) en el extremo C-terminal; la señal PTS2 en el extremo N-terminal
Núcleo (nucleoplasma)	Varía	No	Múltiples clases distintas; un motivo común incluye un segmento corto, rico en Lys y Arg

*Secuencias diferentes o adicionales direccionan las proteínas hacia la membrana de los orgánulos y a sus compartimentos.

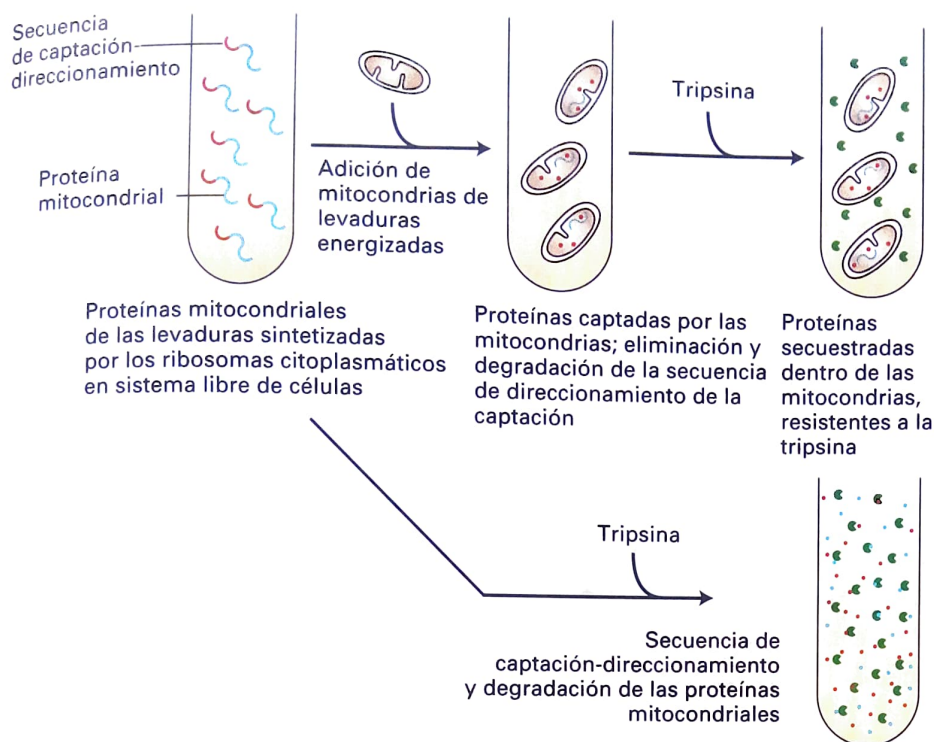


FIGURA EXPERIMENTAL 13-23 Importación de las proteínas precursoras mitocondriales ensayada en un sistema libre de células. Los precursores de las proteínas mitocondriales con señales de captación-direccionamiento unidas pueden ser sintetizadas en ribosomas en una reacción libre de células. Cuando las mitocondrias que están respirando se agregan a los precursores de las proteínas mitocondriales (*arriba*), las proteínas son captadas por las mitocondrias. Dentro de estos orgánulos, las proteínas son protegidas de la acción de las proteasas, como la tripsina. Cuando no hay mitocondrias presentes (*abajo*), las proteínas mitocondriales se degradan, al agregar proteasa. La captación proteica se produce solo con mitocondrias energizadas (que están respirando), que tienen un gradiente electroquímico de protones (fuerza protomotriz), a través de la membrana interna. La proteína importada debe contener una secuencia captación-direccionamiento adecuada. La captación requiere también ATP y un extracto citosólico que contenga proteínas chaperonas que mantengan las proteínas precursoras en una conformación no plegada. Este ensayo ha sido empleado para estudiar secuencias de direccionamiento y otras características del proceso de translocación.

quiere la acción secuencial de dos secuencias de direccionamiento y dos sistemas de translocación unidos a la membrana: uno para dirigir la proteína hacia el orgánulo y otro para dirigirla hacia el compartimento orgánulo o a la membrana adecuada del orgánulo. Como veremos, los mecanismos para seleccionar distintas proteínas para su envío hacia las mitocondrias y los cloroplastos están relacionados con algunos de los mecanismos que analizamos con anterioridad.

Las secuencias de señalización N-terminales anfipáticas dirigen las proteínas hacia la matriz mitocondrial

Todas las proteínas que se desplazan desde el citosol hasta el mismo destino mitocondrial tienen señales de direccionamiento que comparten motivos en común, aunque las secuencias de señalización, por lo general, no son idénticas. De este modo, los receptores que reconocen estas señales son capaces de unir un número de secuencias diferentes, pero relacionadas. Las secuencias más ampliamente estudiadas para la localización de proteínas en las mitocondrias son las *secuencias de direccionamiento hacia la matriz*. Estas secuencias, localizadas en el N-terminal, habitualmente tienen 20-50 aminoácidos de carga positiva (arginina y lisina) y otros hidroxilados (serina y treonina), pero tienden a carecer de residuos ácidos cargados negativamente (aspartato y glutamato).

Se supone que las secuencias de direccionamiento hacia la matriz de la mitocondria adquieren una conformación α -helicoidal en la cual los aminoácidos cargados positivamente predominan a un lado de la hélice y los aminoácidos hidrófobos, del otro lado. Las secuencias de este tipo, que contienen regiones hidrófobas e hidrófilas simultáneamente, se conocen como **anfipáticas**. Las mutaciones que alteran este carácter anfipático, en general, evitan que se direccionen hacia la matriz, aunque muchas otras sustituciones de aminoácidos no provocan

este efecto. Estos hallazgos indican que el carácter anfipático de las secuencias de direccionamiento hacia la matriz es crítica para su función.

El ensayo libre de células que se resume en la **Figura 13-23** ha sido ampliamente utilizado en estudios destinados a definir los pasos bioquímicos de la importación de proteínas precursoras a la mitocondria. En este sistema, las mitocondrias que están respirando (energizadas) extraídas de las células pueden incorporar proteínas precursoras mitocondriales que llevan las secuencias de captación-direccionamiento adecuadas que han sido sintetizadas en ausencia de mitocondrias. La incorporación exitosa de los precursores al orgánulo puede ser ensayada por resistencia a la digestión mediante una proteasa agregada, como la tripsina. En otros ensayos, la importación exitosa de una proteína precursora puede mostrarse por la rotura adecuada de las secuencias de direccionamiento N-terminales por proteasas mitocondriales específicas. La captación de las proteínas precursoras mitocondriales completas, presintetizadas por el orgánulo, en este sistema contrasta con la translocación cotraduccional libre de células de las proteínas secretoras hacia el interior del RE, que se produce generalmente solo cuando las membranas microsomaes (derivadas del RE) se encuentran presentes durante la síntesis (véase la **Fig. 13-4**).

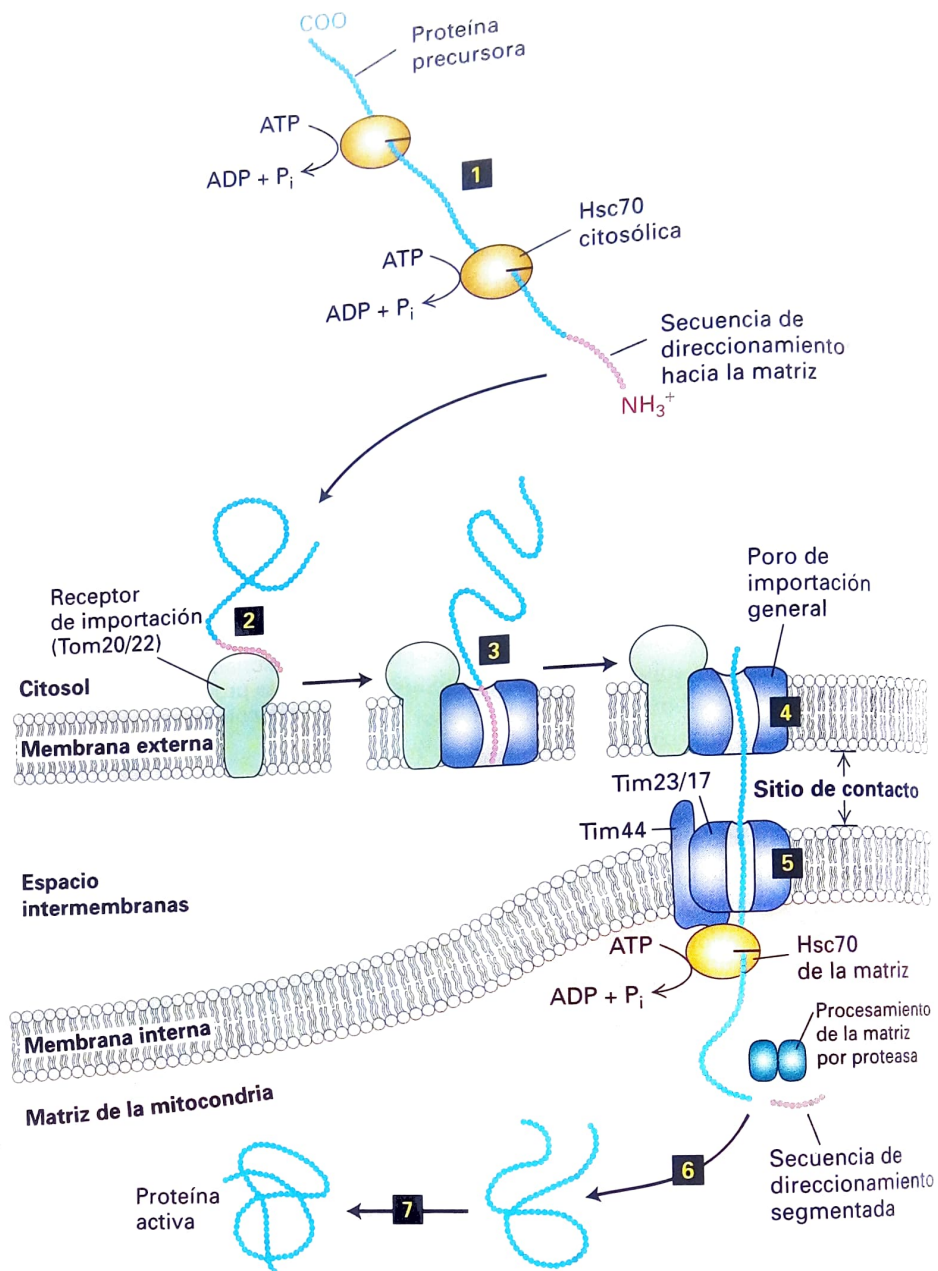
La importación de las proteínas hacia la mitocondria requiere receptores en la membrana externa y translocones en ambas membranas

La **Figura 13-24** presenta un panorama de la importación de una proteína desde el citosol hasta la matriz de la mitocondria, la ruta dentro de la mitocondria seguida por la mayoría de las proteínas importadas. Analizaremos en detalle cada paso del transporte de proteínas hacia la matriz y consideraremos el modo en el que algunas proteínas, posteriormente, son direccionadas hacia otros compartimentos de la mitocondria.

Después de la síntesis en el citosol, los precursores solubles en las proteínas mitocondriales (incluso las proteínas integrales hidrófobas

FIGURA 13-24 Importación de proteínas a la matriz de la mitocondria.

Las proteínas precursoras sintetizadas en los ribosomas citosólicos se mantienen en un estado no plegado o parcialmente plegado por chaperonas unidas, como la Hsc70 (paso 1). Después de que una proteína precursora se une a un receptor de importación cerca de un sitio de contacto con la membrana interna (paso 2), se transfiere al poro de importación general (paso 3). La proteína en translocación se desplaza, entonces, a través de este canal y de un canal adyacente en la membrana interna (pasos 4, 5). Nótese que la translocación se produce en raros "sitios de contacto" en los cuales las membranas interna y externa parecen tocarse. La unión de la proteína de translocación por la chaperona de la matriz Hsc70 y la posterior hidrólisis del ATP por la Hsc70 ayuda a impulsar la importación a la matriz. Una vez que la secuencia de direccionamiento de la captación ha sido retirada por una proteasa de la matriz y la Hsc70 se ha liberado de la proteína recién importada (paso 6), se pliega a la conformación madura, activa dentro de la matriz (paso 7). El plegamiento de algunas proteínas depende de las chaperoninas de la matriz. (Véase G. Schatz, 1996, *J. Biol. Chem.* 271:31763 y N. Pfanner y cols., 1997, *Ann. Rev. Cell Devel. Biol.* 13:25.)



de la membrana) interactúan en forma directa con la membrana mitocondrial. En general, pueden importarse solo las proteínas no plegadas a la mitocondria. Las proteínas chaperonas, como la Hsc70 citosólica, mantienen las proteínas nacientes y recién sintetizadas en un estado no plegado, de modo tal que pueden ser captadas por la mitocondria. Este proceso requiere la hidrólisis de ATP. La importación de precursores mitocondriales no plegados se inicia por la unión de una secuencia de direccionamiento hacia la mitocondria a un *receptor de importación* presente en la membrana externa de la mitocondria. Estos receptores se identificaron, inicialmente, mediante experimentos en los cuales se mostraba que anticuerpos dirigidos contra proteínas específicas de la membrana externa de las mitocondrias inhibían la importación de proteínas hacia mitocondrias aisladas. Experimentos genéticos posteriores, en los cuales los genes para proteínas de las membranas externas de las mitocondrias específicas se encontraban mutados, mostraron que receptores proteicos específicos eran los causantes de la importación de diferentes clases de proteínas mitocondriales. Por ejemplo, las secuencias N-terminales

de direccionamiento hacia la matriz son reconocidas como Tom20 y Tom22. (Las proteínas que se encuentran en la membrana externa de la mitocondria, implicadas en el direccionamiento y la importación, se denominan proteínas *Tom*, por su nombre en inglés, translocón de la membrana externa, *translocón of the outer membrane*.)

Los receptores de importación, posteriormente, transfieren las proteínas precursoras a un canal de importación de la membrana externa. Este canal, compuesto principalmente por la proteína Tom40, se conoce como *poro de importación general* porque todas las proteínas precursoras de la mitocondria conocidas acceden a los compartimentos interiores del orgánulo a través de este canal. Cuando la Tom40 se purifica e incorpora a liposomas, forma un canal que atraviesa la membrana, con un poro de la suficiente amplitud como para acomodar una cadena polipeptídica no plegada. El poro de importación general forma un canal, en gran medida pasivo, a través de la membrana externa de la mitocondria, y la fuerza impulsora para el transporte unidireccional hacia el interior de la mitocondria proviene del interior de este orgánulo. En

el caso de los precursores destinados a la matriz mitocondrial, la transferencia a través de la membrana externa se produce simultáneamente con la transferencia, a través de un canal de la membrana interna compuesto por las proteínas Tim23 y Tim17. (*Tim* proviene del nombre en inglés de translocón de la membrana interna, *translocón of the inner membrane*.) La translocación al interior de la matriz se produce, de este modo, en "sitios de contacto" en los que se encuentran muy próximas la membrana externa y la interna.

Poco después de que la secuencia N-terminal de direccionamiento hacia la matriz de una proteína ingresa en la matriz de la mitocondria, es eliminada por una proteasa que reside dentro de la matriz. La proteína emergente también es unida por la Hsc70 de la matriz, una chaperona que se localiza en los canales de translocación de la membrana interna de la mitocondria, por su interacción con la proteína transmembrana Tim44. Esta interacción estimula la hidrólisis de ATP por la Hsc70 de la matriz, y se cree que estas dos proteínas juntas impulsan la translocación de las proteínas al interior de la matriz.

Parte de las proteínas importadas pueden plegarse a su conformación final activa sin ayuda posterior. El plegamiento final de numerosas proteínas de la matriz requiere, sin embargo, una **chaperonina**. Como se analizó en el **Capítulo 3**, las proteínas chaperoninas facilitan activamente el plegamiento proteico, en un proceso dependiente de ATP.

Por ejemplo, los mutantes de las levaduras defectuosas en Hsc60, una chaperonina de la matriz mitocondrial, pueden importar proteínas de la matriz y segmentar la secuencia de captación-direccionamiento normalmente, pero los polipéptidos importados no podrán plegarse ni ensamblarse en las estructuras terciaria y cuaternaria nativas.

Los estudios con proteínas quiméricas demuestran características importantes de la importación mitocondrial

Una evidencia notable de la capacidad de las secuencias de direccionamiento hacia la matriz mitocondrial para dirigir la importación provino de las proteínas quiméricas producidas por técnicas de DNA recombinante. Por ejemplo, la secuencia de direccionamiento hacia la matriz de la deshidrogenasa alcohólica puede fusionarse con el extremo N-terminal de la dihidrofolato reductasa (DHFR), que normalmente reside en el citosol. En presencia de las chaperonas, que evitan que el segmento C-terminal de la DHFR se pliegue en el citosol, los ensayos de translocación libres de células muestran que la proteína quimérica se transporta hacia la matriz (Fig. 13-25a). El inhibidor metotrexato, que se une estrechamente al sitio activo de la DHFR y estabiliza en gran medida su conformación plegada, hace que la proteína quimérica se torne resistente al des-

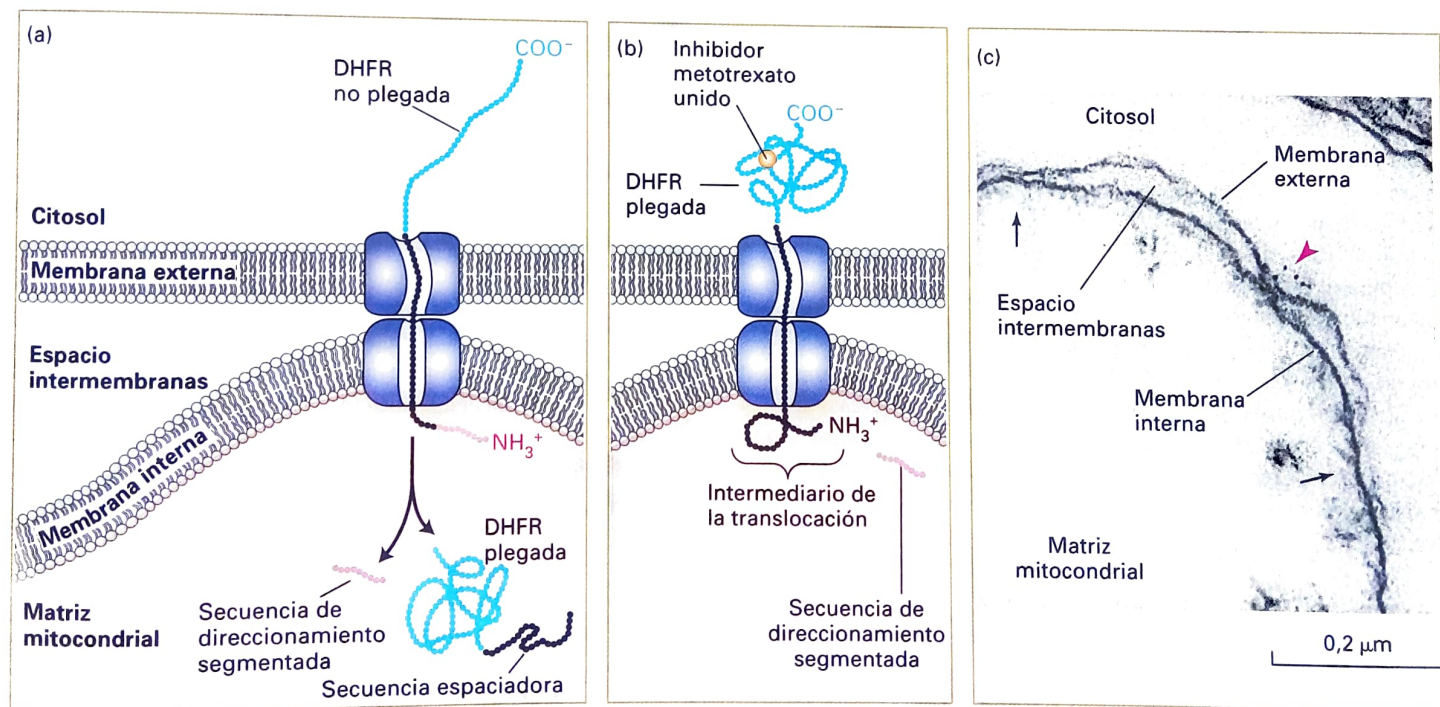


FIGURA EXPERIMENTAL 13-25 Experimentos con proteínas quiméricas permiten dilucidar la importación de proteínas a las mitocondrias. Estos experimentos muestran que una sola secuencia direccionadora a la matriz dirige las proteínas hacia la matriz de la mitocondria y que solo las proteínas no plegadas son translocadas a través de ambas membranas. La proteína quimérica de estos experimentos contiene una señal de direccionamiento hacia la matriz en su extremo N-terminal (rojo), seguida de una secuencia espaciadora sin función particular (negro) y luego, por la dihidrofolato reductasa (DHFR), una enzima normalmente presente solo en el citosol. (a) Cuando el segmento de la DHFR se despliega, la proteína quimérica se desplaza a través de ambas membranas hacia la matriz de la mitocondria energizada, y la señal de direccionamiento hacia la matriz se elimina. (b) Cuando el extremo C-terminal de la proteína quimérica queda fijo en el estado plegado por la unión del metotrexato,

la translocación se bloquea. Si la secuencia espaciadora tiene la longitud suficiente como para extenderse a través de ambos canales de transporte, se genera un intermediario de translocación estable, se escinde la secuencia direccionadora, generada en presencia de metotrexato, como se muestra aquí. (c) El extremo C-terminal del intermediario de translocación en (b) puede detectarse al incubar las mitocondrias con anticuerpos que se unen al segmento DHFR, seguido por partículas de oro cubiertas con la proteína bacteriana A, que se une de modo no específico a moléculas de anticuerpo (véase la Fig. 9-29). Una fotomicrografía electrónica de un corte muestra partículas de oro (punta de flecha roja) unida al intermediario de translocación, en un sitio de contacto entre las membranas externa e interna. Son evidentes, también, otros sitios de contacto (flechas negras). (Las partes [a] y [b] adaptadas de J. Rassow y cols., 1990. *FEBS Lett.* **275**:190. La parte [c] de M. Schweiger y cols., 1987, *J. Cell Biol.* **105** 235, cortesía de W. Neupert.)

plegamiento por parte de las chaperonas del citosol. Cuando los ensayos de translocación se llevan a cabo en presencia de metotrexato, la proteína quimérica no ingresa por completo en la matriz. Este hallazgo demuestra que un precursor debe ser desplegado para que pueda atravesar los poros de importación presentes en las membranas de las mitocondrias.

Estudios adicionales revelaron que si una secuencia espaciadora lo suficientemente larga separa la secuencia direccionadora a la matriz N-terminal y la porción DHFR de la proteína quimérica, en presencia de metotrexato, puede atraparse un intermediario de la translocación que está inserto en ambas membranas, si hay una cantidad suficiente de polipéptido que sobresale al interior de la matriz como para evitar que la cadena polipeptídica retroceda deslizándose hacia el citosol, posiblemente por la asociación estable con la Hsc70 de la matriz (Fig. 13-25b). Para que este intermediario estable de la translocación se forme, la secuencia espaciadora debe ser lo suficientemente larga como para insertarse en ambas membranas; un espaciador de 50 aminoácidos extendido en su máxima longitud posible es adecuado para cumplir con esta función. Si la quimera contiene un espaciador más corto —por ejemplo, unos 35 aminoácidos—, no se obtiene un espaciador estable de la translocación porque el espaciador no puede abarcar ambas membranas. Estas observaciones proporcionaron evidencia adicional de que las proteínas translocadas pueden abarcar tanto las membranas mitocondriales interna como externa y atravesarlas en un estado no plegado.

Estudios mediante microscopía de intermediarios de translocación estable muestran que se acumulan en sitios donde las membranas externa e interna de la mitocondria se encuentran muy próximas, lo que indica que las proteínas precursoras ingresan solo en estos sitios (Fig. 13-25c). La distancia desde la cara citosólica de la membrana externa hasta la cara de la matriz de la membrana interna, en estos *sitios de contacto*, es compatible con la longitud de una secuencia espaciadora no plegada, necesaria para la formación de un intermediario estable de la translocación. Más aún, los intermediarios estables de la translocación pueden entrecruzarse químicamente con las subunidades proteicas que abarcan los canales de translocación de las membranas externa e interna de la mitocondria. Este hallazgo demuestra que las proteínas importadas pueden, simultáneamente, comprometer canales de ambas membranas mitocondriales, según se ilustra en la Figura 13-24. Puesto que pueden observarse aproximadamente 1 000 proteínas quiméricas apiladas en una mitocondria de levadura típica, se considera que las mitocondrias poseen aproximadamente 1 000 poros de importación general para la captación de proteínas mitocondriales.

Se requiere un triple aporte de energía para incorporar proteínas a las mitocondrias

Como se señaló previamente y se indicó en la Figura 13-24, la hidrólisis de ATP por las proteínas chaperonas Hsc70, tanto en el citosol como en la matriz mitocondrial, es necesaria para que se incorporen proteínas a la mitocondria. La Hsc70 gasta energía en mantener las proteínas precursoras unidas en un estado no plegado, que es competente para la translocación a la matriz. La importancia del ATP para esta función fue demostrada en estudios en los cuales una proteína precursora de las mitocondrias fue purificada y, luego, desnaturalizada (desplegada) por la urea. Cuando se probó en el sistema de translocación mitocondrial libre de células, la proteína desnaturalizada fue incorporada a la matriz en ausencia de ATP. Por el contrario, la importación del precursor no desnaturalizado nativo requirió ATP para la función de desplegamiento normal de las chaperonas del citosol.

La unión secuencial y la liberación impulsada por ATP de múltiples moléculas de la matriz de Hsc70 a una proteína de translocación simplemente pueden atrapar la proteína no plegada en la matriz. Alternativamente, la Hsc70 de la matriz, anclada a la membrana por la proteína Tim44, puede actuar como un motor molecular para arrastrar la proteína hacia el interior de la matriz (véase la Fig. 13-24). En este caso, las funciones de la Hsc70 de la matriz y de la Tim44 serían análogas a las de las chaperonas BiP y del complejo Sec63, respectivamente, en la translocación postraducciona a la luz del RE (véase la Fig. 13-9).

El tercer aporte de energía necesario para la incorporación de proteínas a las mitocondrias es un gradiente electroquímico de H^+ , o fuerza protomotriz, a través de la membrana interna. Recuerde, del Capítulo 12, que los protones son bombeados desde la matriz hasta el espacio intermembranoso durante el transporte de electrones, lo que crea un potencial transmembrana a través de la membrana interna. En general, solo las mitocondrias que están respirando activamente y, por lo tanto, han generado una fuerza protomotriz a través de la membrana interna, pueden translocar proteínas precursoras desde el precursor hasta la matriz de la mitocondria. El tratamiento de las mitocondrias con inhibidores o desacopladores de la fosforilación oxidativa, como el cianuro o el dinitrofenol, disipa esta fuerza protomotriz. Si bien las proteínas precursoras aún pueden unirse estrechamente a los receptores de estas mitocondrias envenenadas, las proteínas no pueden ser importadas, aunque se encuentren en células intactas o en sistemas libres de células, todavía en presencia del ATP y de las proteínas chaperonas. Los científicos no conocen con exactitud de qué manera la fuerza protomotriz se emplea para facilitar el ingreso de una proteína precursora en la matriz. Una vez que la proteína se ha insertado parcialmente a la membrana interna, es sometida a un potencial transmembrana de 200 mV (espacio negativo de la matriz). Esta diferencia de potencial —en apariencia, pequeña— se establece a través del núcleo hidrófobo muy estrecho de la bicapa lipídica, lo que da un gradiente eléctrico enorme, que equivale a aproximadamente 400 000 V/cm. Según una hipótesis, las cargas positivas en la secuencia direccionadora hacia la matriz anfipática simplemente podrían ser sometidas a una “electroforesis” o arrastradas hacia el interior del espacio de la matriz por el potencial eléctrico de membrana negativo en el interior.

Múltiples señales y vías dirigen las proteínas hacia los compartimentos submitocondriales

A diferencia del proceso de direccionamiento hacia la matriz, el direccionamiento de proteínas al espacio intermembranoso, las membranas interna y externa de las mitocondrias requieren comúnmente más de una secuencia de direccionamiento y se produce a través de una de varias vías. La Figura 13-26 resume la organización de secuencias de direccionamiento en proteínas clasificadas para diferentes localizaciones de las mitocondrias.

Proteínas de la membrana interna Se conocen tres vías distintas para direccionar las proteínas hacia la membrana interna de la mitocondria. Una vía emplea la misma maquinaria utilizada para el direccionamiento de las proteínas hacia la matriz (Fig. 13-27, vía A). Una subunidad de la citocromo oxidasa, denominada CoxVa, es una proteína transportada por esta vía. La forma precursora de la CoxVa, que contiene una secuencia de direccionamiento hacia la matriz N-terminal, reconocida por el receptor de importación Tom20/22, se transfiere a través del poro de importación general Tom40 de la membrana externa y el

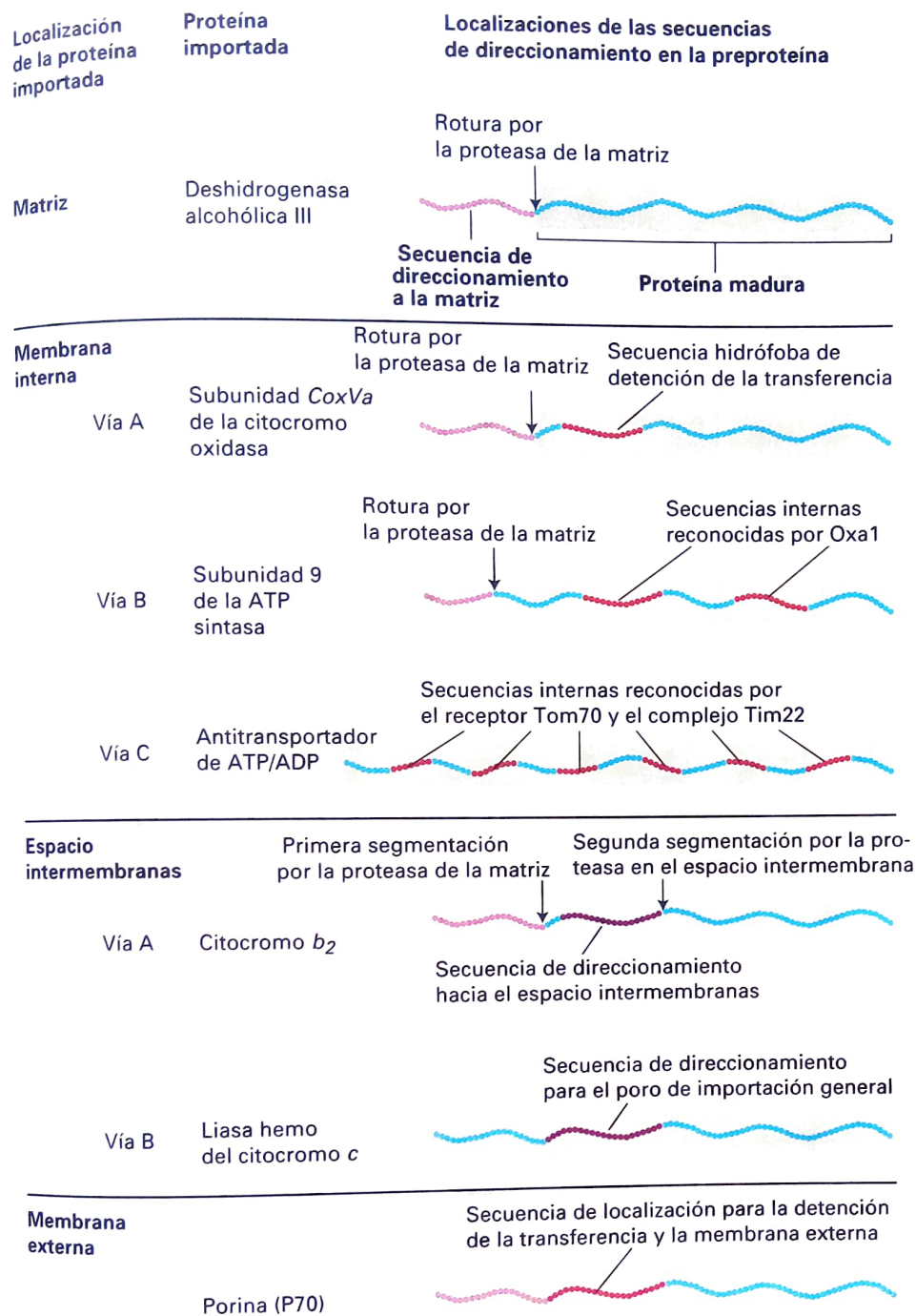


FIGURA 13-26 Secuencias de direccionamiento en las proteínas mitocondriales importadas.

La mayoría de las proteínas mitocondriales tienen una secuencia N-terminal de direccionamiento hacia la matriz (rosa) similar, pero no idéntica, en diferentes proteínas. Las proteínas destinadas a la membrana interna, el espacio intermembranoso o a la membrana externa tienen una o más secuencias de direccionamiento adicionales que dirigen las proteínas a estas ubicaciones mediante varias vías distintas. Las vías que aparecen marcadas con letras corresponden a las ilustradas en las Figuras 13-26 y 13-27. (Véase W. Neupert, 1997, *Ann. Rev. Biochem.* **66**:863.)

complejo de translocación Tim23/17 de la membrana interna. Además de la secuencia direccionadora hacia la matriz, que se rompe durante la importación, CoxVa contiene una secuencia de detención de la transferencia. A medida que la proteína pasa a través del canal Tim 23/17, la secuencia de detención de la transferencia bloquea la translocación del C-terminal a través de la membrana interna. El intermediario anclado a la membrana es luego transferido, en dirección lateral, hacia la bicapa de la membrana interna —en gran medida, del mismo modo en el que las proteínas integrales tipo I de la membrana se incorporan a la membrana del RE— (véase la Fig. 13-11).

Una segunda vía hacia la membrana interna es seguida por las proteínas (p. ej., la subunidad 9 de la ATP sintasa) cuyos precursores contienen tanto una secuencia de direccionamiento hacia la matriz como

dominios hidrófobos internos reconocidos por una proteína interna de la membrana denominada *Oxa1*. Se cree que esta vía involucra la translocación de, al menos, una porción del precursor a la matriz a través de los canales Tom40 y Tim23/17. Después de la segmentación de la secuencia direccionadora a la matriz, la proteína se inserta en la membrana interna mediante un proceso que requiere la interacción con la *Oxa1* y, quizás, con otras proteínas de la membrana interna (Fig. 13-27, vía B). La *Oxa1* está relacionada con una proteína bacteriana implicada en la inserción de ciertas proteínas de la membrana citoplasmática en las bacterias. Este parentesco sugiere que la *Oxa1* puede haber descendido de la maquinaria de translocación de las bacterias endosimbióticas, que finalmente se transformaron en mitocondrias. Sin embargo, las proteínas que forman los canales de la membrana interna de las

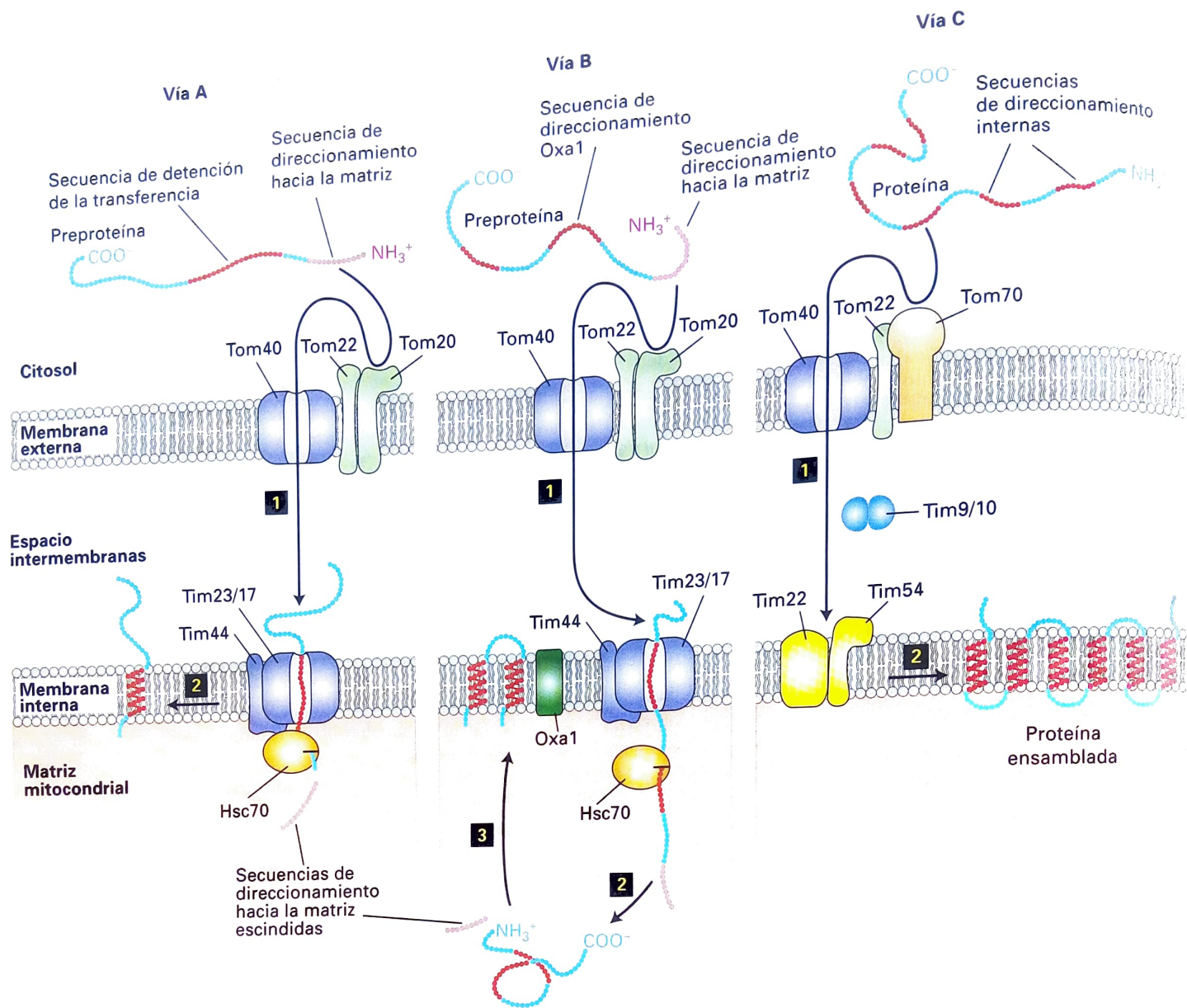


FIGURA 13-27 Tres vías hacia la membrana interna de la mitocondria desde el citosol. Las proteínas con diferentes secuencias direccionadoras se dirigen hacia la membrana interna por diferentes vías. En las tres vías, las proteínas atraviesan la membrana externa a través del poro de importación general Tom40. Las proteínas enviadas por las vías A y B contienen una secuencia direccionadora de la matriz N-terminal, reconocida por el receptor de importación Tom20/22 de la membrana externa. Aunque ambas vías emplean el canal de la membrana interna Tim23/17, difieren en que la proteína precursora completa ingresa en la matriz y es redireccionada hacia la membrana interna en la vía B.

La Hsc70 de la matriz desempeña una función similar a la que tiene en la importación de proteínas solubles de la matriz (véase la Fig. 13-23). Las proteínas enviadas por la vía C contienen secuencias internas reconocidas por el receptor de importación Tom70/Tom22; un canal de translocación diferente de la membrana interna (Tim22/54) se usa en esta vía. Dos proteínas intermembranas (Tim9 y Tim10) facilitan la transferencia entre los canales externo e interno. Véase el texto para un mayor detalle. (Véase R. E. Dalbey y A. Kuhn, 2000, *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 16:51 y N. Pfanner y A. Gleissler, 2001, *Nature. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2:339.)

mitocondrias no se encuentran relacionadas con las proteínas de los translocones bacterianos. La Oxa1 participa también en la inserción de ciertas proteínas en la membrana interna (p. ej., la subunidad II de la citocromo oxidasa), que son codificadas por el DNA de las mitocondrias y sintetizadas en la matriz por los ribosomas mitocondriales.

La vía final para la inserción en la membrana interna de la mitocondria es seguida por proteínas de paso múltiple que contienen seis dominios insertos en la membrana, como el antitransportador ADP/ATP. Estas proteínas, que carecen de la secuencia N-terminal direccionadora hacia la matriz, contienen múltiples secuencias internas que dirigen hacia la mitocondria. Después de que las secuencias internas han sido reconocidas por un segundo receptor de importación, compuesto por las

proteínas de la membrana externa Tom70 y Tom22, la proteína importada cruza la membrana externa a través del poro de importación general (Fig. 13-27, vía C). Luego, la proteína se transfiere a un segundo complejo de translocación en la membrana interna, compuesto por las proteínas Tim22, Tim18 y Tim54. La transferencia al complejo Tim22/18/54 depende de un complejo multimérico de dos proteínas pequeñas, Tim9 y Tim10, que residen en el espacio entre ambas membranas. Se cree que las proteínas Tim pequeñas actúan como chaperonas que, guiando los precursores proteicos importados desde el poro de importación general hasta el complejo Tim22/18/54 de la membrana interna se unen a sus regiones hidrófobas y evitan que formen agregados insolubles en el ambiente acuoso del espacio entre ambas membranas. Finalmente,

el complejo Tim22/18/54 es causante de la incorporación de múltiples segmentos hidrófobos de la proteína importada a la membrana interna.

Proteínas del espacio intermembrana Existen dos vías que envían las proteínas citosólicas al espacio que se encuentra entre las membranas interna y externa de las mitocondrias. La vía principal es seguida por proteínas como el citocromo b_2 , cuyos precursores llevan dos secuencias de direccionamiento N-terminal diferentes, que son finalmente eliminadas. La que se encuentra más próxima al extremo N-terminal de estas dos es una secuencia de direccionamiento hacia la matriz, eliminada por la proteasa de la matriz. La segunda secuencia direccionadora es un segmento hidrófobo que bloquea la translocación completa de la proteína a través de la membrana interna (Fig. 13-28, vía A). Después de que el intermediario resultante, inserto en la membrana, difunda en dirección lateral y se aparte del canal de translocación Tim23/17, una proteasa de la membrana escinde la proteína cerca del segmento transmembrana hidrófobo y libera la proteína madura, en forma soluble, al espacio intermembranoso. Excepto por la segunda escisión proteolítica, esta vía es semejante a la de las proteínas intermembrana, como CoxVa (véase la Fig. 13-27, vía A).

Las proteínas pequeñas Tim9 y Tim10 residentes en el espacio entre ambas membranas ilustran una segunda vía para direccionar hacia el espacio intermembranoso. En esta vía, las proteínas importadas no contienen una secuencia N-terminal de direccionamiento a la matriz y son enviadas directamente al espacio intermembranoso por medio del poro de importación general, sin compromiso de ningún factor de translocación de la membrana interna (Fig. 13-28, vía B). La translocación a través del poro de importación general Tom40 no parece estar acoplada a ningún proceso energéticamente favorable; sin embargo, una vez que se encuentran localizadas en el espacio entre ambas membranas, las proteínas Tim9 y Tim10 adquieren, cada una, dos enlaces disulfuro y estructuras compactas estables plegadas. En apariencia, el mecanismo que conduce la translocación unidireccional por medio de la membrana externa implica la difusión pasiva a través de esta membrana, seguida del plegamiento y la formación de enlaces disulfuro, que atrapa irreversiblemente a la proteína en el espacio intermembranoso. En muchos aspectos, el proceso de formación de enlaces disulfuro en el espacio entre ambas membranas se asemeja al de la luz del RE e involucra una proteína generadora de enlaces disulfuro Erv1 y una proteína de transferencia de los disulfuro Mia40.

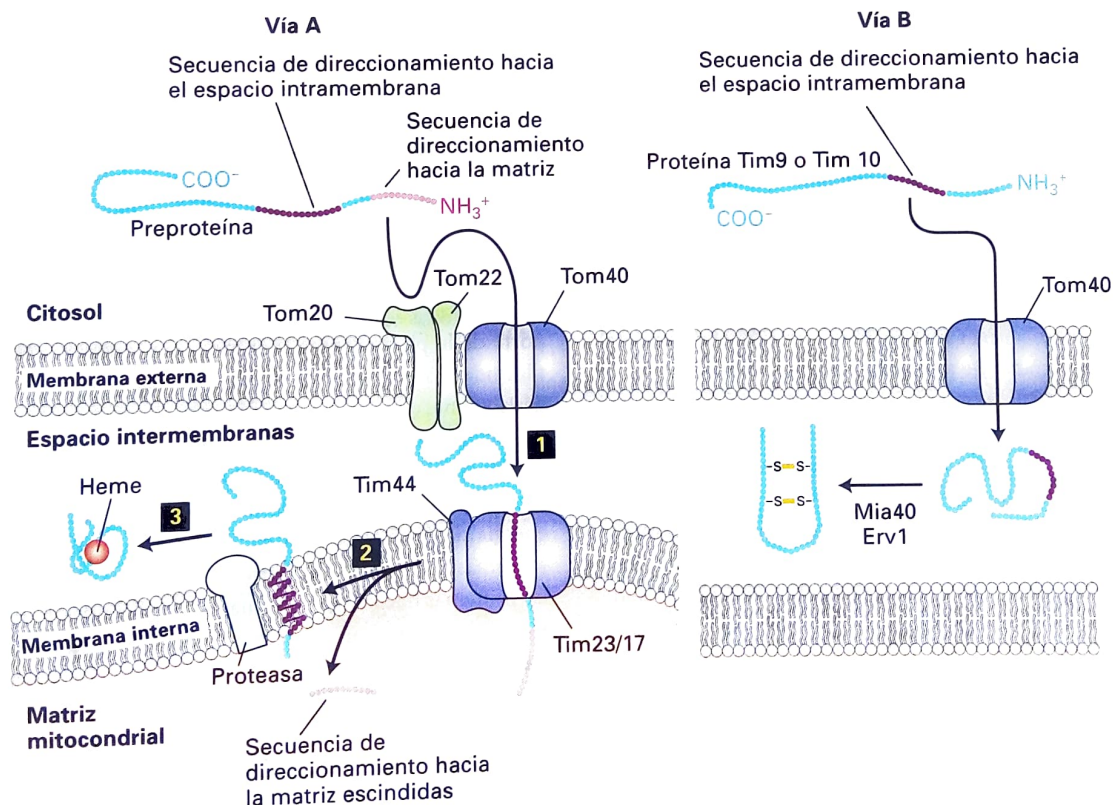


FIGURA 13-28 Dos vías al espacio intermembranoso de la mitocondria. La vía A, la principal para el envío de proteínas desde el citosol al espacio entre ambas membranas, es similar a la vía A para el envío a la membrana interna (véase la Fig. 13-26). La diferencia principal es que la secuencia de direccionamiento interna en proteínas como el citocromo b_2 , destinado al espacio entre membranas, es reconocida por una proteasa de la membrana interna, que escinde la proteína en el lado de la membrana que se encuentra entre ambas membranas. La proteína liberada se pliega y se une a su cofactor hemo, dentro

del espacio entre membranas. La B es una vía especializada para el envío al espacio intermembrana de las proteínas Tim9 y Tim10. Estas proteínas pasan fácilmente a través del poro de importación general Tom40 y, una vez que se encuentran en el espacio entre las membranas, se plegan y forman enlaces disulfuro que evitan la translocación inversa a través de Tom40. Los enlaces disulfuro son generados por la Erv1 y transferidos a Tim9 y Tim10 mediante Mia40. (Véase R. E. Dalbey y A. Kuhn, 2000, *Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.* **16**:51; N. Pfanner y A. Gleissler, 2001, *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* **2**:339; y K. Tokatlidis, 2005, A disulfide relay system in mitochondria. *Cell* **121**:965-967.)

Proteínas de la membrana externa Muchas de las proteínas que se encuentran en la membrana externa de la mitocondria, incluso el propio poro Tom40 y la porina de las mitocondrias, tienen una estructura de barril β en la cual existen hebras antiparalelas que forman segmentos hidrófobos que rodean un canal central. Las proteínas de este tipo se incorporan a la membrana externa; para ello, interactúan primero con el poro de importación general, Tom40, y luego son transferidas a un complejo conocido como SAM (por su nombre en inglés, maquinaria de clasificación y ensamblaje o *sorting and assembly machinery*), compuesto por al menos tres proteínas de la membrana externa. Supuestamente, es la naturaleza hidrofóbica muy estable de las proteínas barril β la que finalmente hace que se incorporen de manera estable a la membrana externa, pero no se sabe con certeza de qué manera el complejo SAM facilita este proceso.

El direccionamiento de las proteínas hacia el estroma de los cloroplastos es similar al de las proteínas de la matriz mitocondrial

Entre las proteínas presentes en el estroma de los cloroplastos, se encuentran las enzimas del ciclo de Calvin, que funcionan en la fijación del dióxido de carbono a los hidratos de carbono durante la fotosíntesis (Cap. 12). La subunidad grande (L) de la rubulosa 1,5-bifosfato carboxilasa (rubisco) es codificada por el DNA de los cloroplastos y sintetizada sobre los ribosomas de los cloroplastos en el espacio del estroma. La subunidad pequeña (S) de la rubisco y todas las otras enzimas del ciclo de Calvin están codificadas por genes nucleares y son transportadas hacia los cloroplastos después de su síntesis en el citosol. Las formas precursoras de estas proteínas del estroma contienen una secuencia N-terminal de *importación al estroma* (véase el Cuadro 13-1).

Experimentos realizados en cloroplastos aislados, semejantes a los de las mitocondrias, ilustrados en la Figura 13-23, han mostrado que estos pueden importar al precursor de la subunidad S después de su síntesis. Una vez que el precursor no plegado ingresa en el espacio del estroma, se une transitoriamente a una chaperona Hsc70 del estroma, y se segmenta la secuencia N-terminal. En las reacciones facilitadas por las chaperoninas Hsc60 que residen dentro del espacio del estroma, 8 subunidades S se combinan con 8 subunidades L para producir la enzima rubisco activa.

El proceso general de importación al estroma parece ser muy semejante al de importación de proteínas a la matriz de las mitocondrias (véase la Fig. 13-24). Al menos 3 proteínas de la membrana externa de los cloroplastos, que incluyen un receptor que se une a la secuencia de incorporación al estroma y una proteína del canal de translocación, y 5 proteínas de la membrana interna se consideran esenciales para direccionar las proteínas hacia el estroma. Aunque estas proteínas son análogas—desde el punto de vista funcional— a las proteínas receptoras y de los canales en la membrana de las mitocondrias, no presentan homología estructural. La falta de similitud en las secuencias entre estas proteínas de los cloroplastos y de las mitocondrias sugiere que han surgido independientemente durante la evolución.

La evidencia disponible indica que las proteínas del estroma de los cloroplastos, al igual que las de la matriz de las mitocondrias, se incorporan en estado no plegado. La incorporación al estroma depende de la hidrólisis de ATP, catalizada por una chaperona Hsc70 del estroma, cuya función es similar a la del Hsc70 de la matriz mitocondrial y de la

BiP de la luz del RE. A diferencia de las mitocondrias, los cloroplastos no generan un gradiente electroquímico (fuerza protomotriz) a través de su membrana interna. Así, la introducción de proteínas en el interior del estroma de los cloroplastos parece estar impulsada solo por la hidrólisis de ATP.

Las proteínas se direccionan hacia los tilacoides por mecanismos relacionados con la translocación a través de la membrana citoplasmática de las bacterias

Además de la doble membrana que los rodea, los cloroplastos contienen una serie de sacos membranosos interconectados, los **tilacoides** (véase la Fig. 12-31). Las proteínas localizadas en la membrana de los tilacoides o en su luz llevan a cabo la fotosíntesis. Muchas de estas proteínas se sintetizan en el citosol como precursores que contienen múltiples secuencias de direccionamiento. Por ejemplo, la plastocianina y otras proteínas destinadas a la luz de los tilacoides requieren la acción sucesiva de dos secuencias de captación-direccionamiento. La primera es una secuencia N-terminal de importación al estroma, que dirige la proteína al estroma por la misma vía que importa la subunidad rubisco S. La segunda secuencia direcciona la proteína desde el estroma hasta la luz de los tilacoides. El papel de estas secuencias de direccionamiento se ha mostrado en experimentos que midieron la captación de proteínas mutantes, generadas por técnicas de DNA recombinantes, por los cloroplastos aislados. Por ejemplo, la plastocianina mutante que carece de la secuencia de direccionamiento tilacoide, pero contiene una secuencia de importación al estroma intacta se acumula en el estroma y no es transportada hacia la luz del tilacoide.

Se han identificado cuatro vías distintas para transportar las proteínas desde el estroma hasta el tilacoide. Las cuatro vías se han encontrado muy relacionadas a mecanismos de transporte análogos en bacterias, lo que ilustra la íntima relación evolutiva entre la membrana del estroma y la membrana citoplasmática de las bacterias. El transporte de la plastocianina y de proteínas relacionadas hacia la luz del tilacoide desde el estroma se produce mediante una vía del cloroplasto dependiente de PRS, que utiliza un translocón similar a SecY, la versión bacteriana del complejo Sec61 (Fig. 13-29, *izquierda*). Una segunda vía de transporte de las proteínas hacia la luz del tilacoide involucra una proteína relacionada con la proteína bacteriana SecA, que emplea la energía de la hidrólisis del ATP para impulsar la translocación de las proteínas a través del translocón SecY. Una tercera vía, que direcciona las proteínas hacia la membrana de los tilacoides, depende de una proteína relacionada con la proteína Oxa1 de las mitocondrias y la proteína bacteriana homóloga (véase la Fig. 13-27, *vía B*). Algunas proteínas, o transportadas hacia éste desde el citosol, se insertan en la membrana de los tilacoides por medio de esta vía.

Finalmente, las proteínas de los tilacoides que unen cofactores que contienen metales siguen otra vía en la luz del tilacoide (Fig. 13-29, *derecha*). Los precursores no plegados de estas proteínas se direccionan hacia el estroma N-terminal; luego, la proteína se pliega y se une a su cofactor. Un conjunto de proteínas de membrana del tilacoide asiste en la translocación de la proteína plegada y unen el cofactor en la luz del tilacoide, proceso impulsado por el gradiente electroquímico de H^+ que normalmente se mantiene a través de la membrana de los tilacoides. La

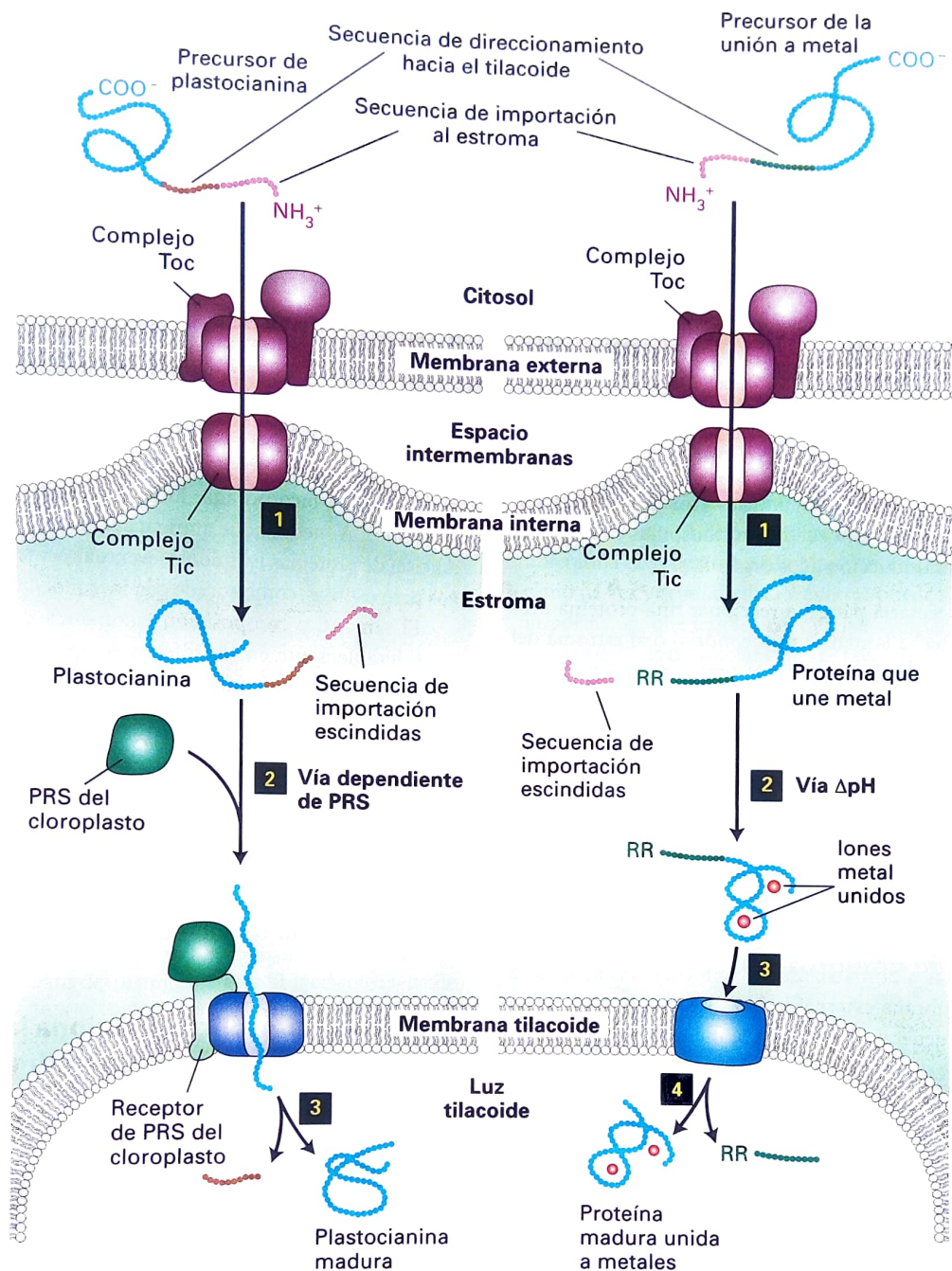


FIGURA 13-29 Transporte de proteínas hacia los tilacoides de los cloroplastos. Aquí se muestran dos de las cuatro vías de transporte de proteínas desde el citosol hacia la luz de los tilacoides. En estas vías, los precursores no plegados son enviados al estroma por medio de las mismas proteínas de la membrana externa que importan las proteínas localizadas en el estroma. La escisión de la secuencia de importación N-terminal al estroma, por la proteasa del estroma, revela la secuencia de direccionamiento hacia el tilacoide (paso 1). En este punto, las dos vías divergen. En la vía dependiente de PRS (izquierda), la plastocianina y proteínas similares se mantienen no plegadas en el espacio del estroma por acción de un conjunto de chaperonas (no se muestra) y, dirigidas por la secuencia de direccionamiento hacia el tilacoide, se unen a proteínas muy relacionadas con la PRS bacteriana, el receptor de PRS y el translocón SecY, que median el movimiento hacia la luz (paso 2). Después de la eliminación de

la secuencia de direccionamiento hacia el tilacoide en la luz de éste por una endoproteasa distinta, la proteína se pliega a su conformación madura (paso 3). En la vía dependiente de pH (derecha), las proteínas que unen metal se pliegan en el estroma y se añaden cofactores redox complejos (paso 2). Dos residuos de arginina (RR) en el extremo N-terminal de la secuencia de direccionamiento hacia el tilacoide y un gradiente de pH a través de la membrana interna son necesarios para el transporte de la proteína plegada hacia la luz del tilacoide (paso 3). El translocón de la membrana del tilacoide está compuesto por, al menos, cuatro proteínas relacionadas con proteínas de la membrana citoplasmática de las bacterias. La secuencia de direccionamiento hacia el tilacoide que contiene dos residuos de arginina es escindida en la luz del tilacoide (paso 4). (Véase R. Dalbey y C. Robinson, 1999, *Trends Biochem Sci* 24:17; R. E. Dalbey y A. Kuhn, 2000, *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 16:51; y C. Robinson y A. Bolhuis, 2001, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:350)

secuencia de direccionamiento hacia los tilacoides que dirige una proteína hacia esa vía incluye 2 residuos de arginina muy cercanos, cruciales para el reconocimiento. Las bacterias poseen también un mecanismo para translocar proteínas plegadas con una secuencia similar, que contiene arginina, a través de la membrana citoplasmática, conocida como la vía Tat (translocación de argininas gemelas, por su nombre en inglés *twin-arginine translocation*). El mecanismo molecular por el cual estas proteínas globulares grandes, plegadas, pueden translocarse a través de la membrana del tilacoide, en la actualidad, se encuentra en estudio.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 13.4

Direccionamiento de las proteínas hacia las mitocondrias y los cloroplastos

- La mayoría de las proteínas de las mitocondrias y los cloroplastos son codificadas por genes nucleares, sintetizadas en ribosomas citosólicos e importadas después de su traducción a los orgánulos.

- Toda la información necesaria para redireccionar una proteína precursora desde el citosol hacia la matriz mitocondrial o al estroma del cloroplasto está contenida en la secuencia N-terminal de direccionamiento para la captación. Después de la importación de la proteína, la secuencia de captación-direccionamiento es eliminada por proteasas presentes en la matriz o el estroma.

- Las chaperonas del citosol mantienen los precursores de las proteínas mitocondriales o de los cloroplastos en un estado no plegado. Solo las proteínas no plegadas pueden ser importadas al interior de los orgánulos. La translocación, en las mitocondrias, se produce en sitios donde las membranas externa e interna de estos orgánulos se encuentran muy cercanas.

- Las proteínas destinadas a la matriz de las mitocondrias se unen a los receptores de la membrana externa de éstas y luego se transfieren al poro de importación general (Tom40) de la membrana externa. La translocación se produce de manera simultánea, a través de las membranas externa e interna, impulsada por la fuerza protomotriz, por medio de la membrana interna y la hidrólisis de ATP por la ATPasa Hsc70 de la matriz (véase la Fig. 13-24).

- Las proteínas seleccionadas a destinos mitocondriales diferentes de la matriz habitualmente contienen dos o más secuencias direccionadoras, una de las cuales puede ser una secuencia de direccionamiento hacia la matriz N-terminal (véase la Fig. 13-26).

- Algunas proteínas mitocondriales destinadas al espacio intermembrano o a la membrana interna son inicialmente importadas a la matriz y luego redireccionadas; otras nunca ingresan en la matriz, sino que van directamente hacia su destino final.

- La importación de proteínas al estroma del cloroplasto se produce a través de canales de translocación de las membranas internas y externas, análogos en función a los canales de las mitocondrias, pero compuestos por proteínas cuya secuencia no se relaciona con las proteínas mitocondriales correspondientes.

- Las proteínas destinadas a los tilacoides tienen secuencias secundarias de direccionamiento. Después del ingreso de estas proteínas al estroma, la escisión de las secuencias de direccionamiento hacia el estroma muestra las secuencias de direccionamiento hacia los tilacoides.

- Las cuatro vías conocidas para desplazar las proteínas desde el estroma de los cloroplastos hacia el tilacoide se asemeja, en gran medida, a la translocación a través de la membrana citoplasmática de las bacterias (véase la Fig. 13-29). Uno de estos sistemas puede translocar proteínas plegadas.

13.5 Direccionamiento de las proteínas a los peroxisomas

Los peroxisomas son pequeños orgánulos rodeados por una sola membrana. A diferencia de las mitocondrias y los cloroplastos, los peroxisomas carecen de DNA y de ribosomas. Así, todas las proteínas de los peroxisomas son codificadas por genes nucleares, sintetizadas en ribosomas libres en el citosol e incorporadas luego a peroxisomas preexistentes o recién generados. A medida que aumenta el tamaño de los peroxisomas por la adición de proteínas (y lípidos), eventualmente, se dividen y forman nuevos peroxisomas, como sucede con las mitocondrias y los cloroplastos.

El tamaño y composición enzimática de los peroxisomas varían considerablemente en los diferentes tipos celulares. Sin embargo, todos los peroxisomas contienen enzimas que utilizan oxígeno molecular para oxidar varios sustratos, como aminoácidos y ácidos grasos, y los degradan a componentes más pequeños para su empleo en vías biosintéticas. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) generado por estas reacciones de oxidación es muy reactivo y potencialmente dañino para los componentes celulares; sin embargo, los peroxisomas contienen también enzimas, como la catalasa, que convierten eficientemente el H_2O_2 en H_2O . En los mamíferos, los peroxisomas son más abundantes en los hepatocitos, donde constituyen el 1-2% del volumen celular.

El receptor citosólico direcciona las proteínas con una secuencia SKL en el C-terminal hacia la matriz del peroxisoma

Las señales de direccionamiento hacia los peroxisomas se identificaron inicialmente mediante pruebas de delecciones de proteínas de los peroxisomas, en busca de un defecto específico en el direccionamiento hacia los peroxisomas. En uno de los primeros estudios, el gen inicial para la luciferasa de las luciérnagas se expresó en células cultivadas de insecto, y la proteína resultante se direccionó de manera adecuada hacia el peroxisoma. Sin embargo, la expresión de un gen truncado que carecía de una pequeña porción del extremo C-terminal de la proteína hizo que la luciferasa no pudiera ser direccionada hacia el peroxisoma y permaneciera en el citoplasma. Probando varias proteínas de luciferasas mutantes, en este sistema, los investigadores descubrieron que la secuencia Ser-Lys-Leu (SKL en el código de una sola letra) o una secuencia relacionada en el extremo C-terminal era necesaria para el direccionamiento de los peroxisomas. Más aún, la adición de la secuencia SKL al extremo C-terminal de una proteína normalmente citosólica conduce a la captación de la proteína alterada por los peroxisomas de las células cultivadas. Casi todas las proteínas de la matriz de los peroxisomas llevan secuencias de este tipo, conocidas como *secuencia 1 de direccionamiento hacia los peroxisomas*, o simplemente *PTS1*.

La vía para incorporar la catalasa y otras proteínas que tienen la PTS1 a la matriz de los peroxisomas se muestra en la Figura 13-30. La

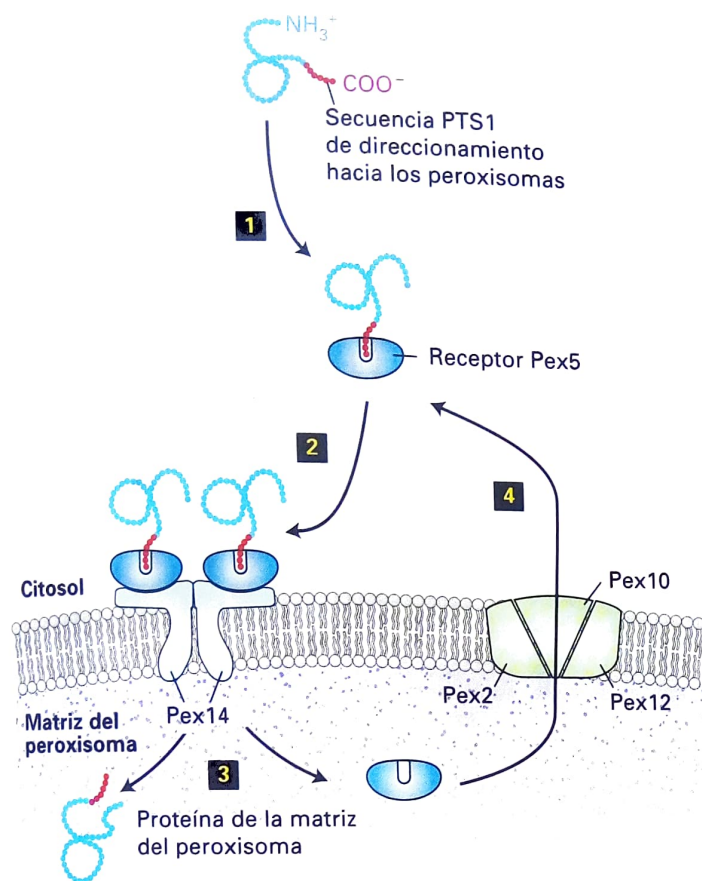


FIGURA 13-30 Importación dirigida por la PTS1 de proteínas de la matriz de los peroxisomas. Paso 1: la mayoría de las proteínas de la matriz de los peroxisomas contienen una secuencia de captación-direccionamiento PTS1 C-terminal (rojo) que se une al receptor citosólico Pex5. Paso 2: el Pex5 con la proteína de la matriz unida forman un complejo multimérico con el receptor Pex14 localizado en la membrana del peroxisoma. Paso 3: mediante un proceso que no se conoce con certeza, el complejo proteína de la matriz Pex5, luego se transfiere a la matriz del peroxisoma, en la que Pex5 se disocia de la proteína de la matriz. Paso 4: después, Pex5 regresa al citosol mediante un proceso que involucra las proteínas de membrana del peroxisoma Pex2, Pex10 y Pex12, que como así también proteínas adicionales de la membrana y del citosol que no se muestran. Nótese que las proteínas plegadas pueden ser importadas hacia el interior de los peroxisomas y que la secuencia direccionadora no se elimina en la matriz. (Véase P. E. Purdue y P. B. Lazarow, 2001, *Ann. Rev. Cell. Dev. Biol.* 17:701; S. Subramani y cols., 2000, *Ann. Rev. Biochem.* 69:399; y V. Dammay y S. Subramani, 2001, *Cell* 105:187.)

PTS1 se une a una proteína transportadora soluble del citosol (Pex5) que, a su vez, se une a un receptor de la membrana del peroxisoma (Pex14). La proteína que será importada se desplaza luego, a través de la membrana del peroxisoma, mientras aún se encuentra unida a la Pex5. La maquinaria de importación a los peroxisomas, a diferencia de lo que ocurre en la mayor parte de los sistemas que median la importación de proteínas al RE, las mitocondrias y los cloroplastos, puede translocar las proteínas plegadas a través de la membrana. Por ejemplo, la catalasa asume una conformación plegada y une hemo, en el citoplasma, antes de atravesar la membrana de los peroxisomas. Estudios en sistemas de células han mostrado que la maquinaria de importación de los peroxisomas puede transportar grandes objetos macromoleculares, que incluyen partículas de oro de aproximadamente 9 nm de diámetro, en tanto tengan la etiqueta PTS1 unida a éstas. Sin embargo, las membranas de los peroxisomas no parecen contener grandes estructuras de po-

ros estables como el poro nuclear que se describe en la sección siguiente. El mecanismo fundamental de la translocación de las proteínas de la matriz de los peroxisomas no se conoce con certeza, pero probablemente implique la formación de oligómeros de Pex5 unidos a PTS1 con moléculas con carga y el receptor Pex14. Existe evidencia de que el tamaño del oligómero se ajusta de acuerdo con el de la PTS1 que lleva moléculas con carga, y que los oligómeros se disocian una vez que el complejo de Pex5 unido a PTS1, que lleva moléculas carga, ingresa en la matriz del peroxisoma. La formación dinámica de oligómeros aparentemente es el mecanismo clave por el cual las moléculas carga que llevan PTS1 pueden ser acomodadas sin la formación de grandes poros estables que interrumpirían la integridad de la membrana de los peroxisomas.

Una vez que el complejo de una molécula carga que lleva PTS1 unida a Pex5 ingresa en la matriz, la Pex5 se disocia de la proteína de la matriz del peroxisoma y se recicla al citoplasma. Las proteínas de la membrana del peroxisoma Pex10, Pex12 y Pex2 forman un complejo crucial para el reciclado de Pex5, que se modifica por ubiquitinación y luego es desubiquitinada como parte del proceso de reciclado. Como la modificación de ubiquitina de las proteínas finalmente requiere hidrólisis de ATP, el reciclado de Pex5 dependiente de energía puede ser el paso, en el proceso de importación, que emplea energía para impulsar la translocación unidireccional de las moléculas carga a través de la membrana del peroxisoma.

Unas pocas proteínas de la matriz del peroxisoma, como la tiolasa, se sintetizan como precursores, con una secuencia de direccionamiento de la captación N-terminal conocida como PTS2. Estas proteínas se unen a una proteína receptora citosólica diferente pero se cree que la incorporación tiene lugar, por lo demás, mediante el mismo mecanismo que el utilizado para las proteínas portadoras de PTS1.

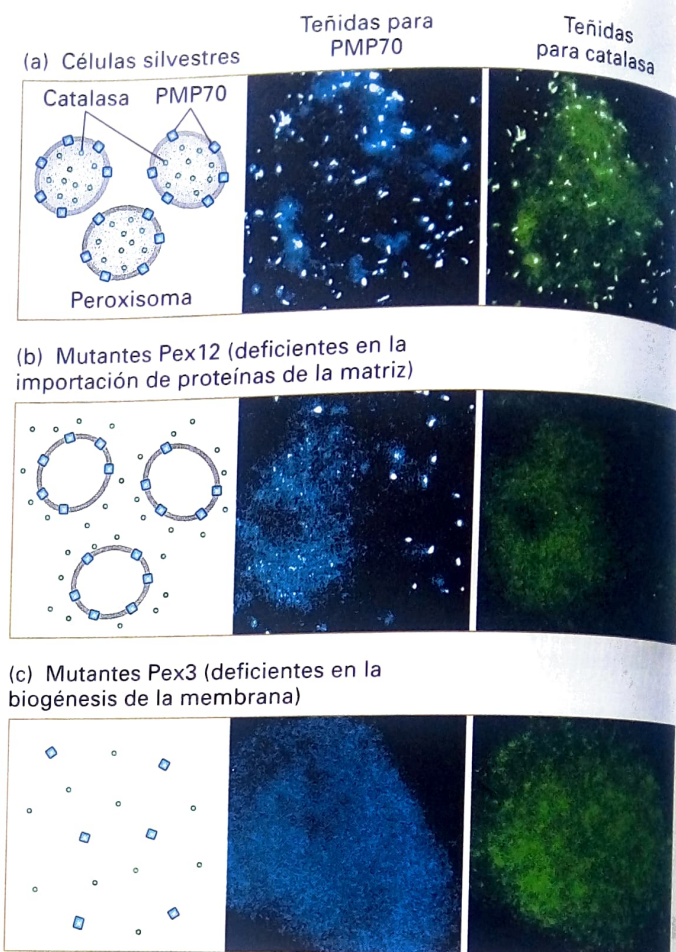
Las proteínas de la membrana y de la matriz del peroxisoma se incorporan por vías diferentes



Las mutaciones recesivas autosómicas que provocan el ensamblado defectuoso de los peroxisomas suceden naturalmente en la población humana. Estos defectos pueden producir un deterioro embriológico grave asociado, con frecuencia, con anomalías craneofaciales. En el *síndrome de Zellweger* y enfermedades relacionadas, por ejemplo, el transporte de muchas proteínas o de todas éstas hacia la matriz de los peroxisomas se encuentra disminuido: las enzimas peroxisomales recién sintetizadas permanecen en el citosol y, finalmente, se degradan. Análisis genéticos de células cultivadas de diferentes pacientes con este síndrome y de levaduras portadoras de mutaciones similares han permitido identificar más de 20 genes necesarios para la biogénesis de los peroxisomas. ■

Los estudios con mutantes de ensamblado de peroxisomas han mostrado que diferentes vías se emplean para introducir proteínas en la matriz de los peroxisomas y para insertar proteínas en la membrana de éstos. Por ejemplo, el análisis de células de algunos pacientes afectados por el síndrome de Zellweger permitió identificar los genes que codifican las proteínas Pex10, Pex12 y Pex2 de reciclado de la Pex5. Las células mutantes defectuosas, en cualquiera de estas proteínas, son incapaces de incorporar proteínas de la matriz a los peroxisomas; en lugar de ello, las células contienen peroxisomas vacíos que tienen el complemento normal de proteínas de membrana de los peroxisomas (Fig. 13-31b). Las mutaciones en cualquiera de los otros 3 genes bloquean la inserción de las proteínas de membrana de los peroxisomas y la incorporación de las

FIGURA EXPERIMENTAL 13-31 Los estudios revelan distintas vías para la incorporación de proteínas de la matriz y de los peroxisomas. Las células fueron teñidas con anticuerpos fluorescentes contra PMP70, una proteína de la membrana de los peroxisomas, o con anticuerpos fluorescentes contra la catalasa, una proteína de la matriz de los peroxisomas, y luego observados en un microscopio de fluorescencia. (a) En las células de tipo silvestre, tanto las proteínas de la membrana como las de la matriz de los peroxisomas son visibles como focos brillantes, en numerosos cuerpos peroxisómicos. (b) En las células de un paciente con deficiencia de Pex12, la catalasa está uniformemente distribuida en el citosol, mientras que la PMP70 se localiza normalmente en los cuerpos de los peroxisomas. (c) En las células de un paciente con déficit de Pex3, no pueden ensamblarse las membranas de los peroxisomas y, en consecuencia, los cuerpos de éstos no se forman. Así, tanto la catalasa como la PMP70 están incorrectamente localizadas en el citosol. (Cortesía de Stephen Gould, Johns Hopkins University)



proteínas de la matriz (Fig. 13-31c). Estos hallazgos demuestran que un conjunto de proteínas transloca las proteínas solubles a la matriz de los peroxisomas, pero que se requiere un conjunto distinto para insertar las proteínas en la membrana de los peroxisomas. Esta situación difiere notablemente de la del RE, la mitocondria y el cloroplasto, para los cuales —como hemos visto— las proteínas de membrana y las solubles comparten muchos de los componentes para su inserción en los orgánulos.

Aunque la mayoría de los peroxisomas se generan por división de orgánulos preexistentes, pueden surgir de novo por un proceso de tres etapas, que se muestra en la Figura 13-32. En este caso, el ensamblado del peroxisoma comienza en el RE. Al menos 2 proteínas de la membrana de los peroxisomas, la Pex3 y la Pex16, se insertan en la membrana del RE por mecanismos descritos en la Sección 13.2. Luego, la Pex3 y la Pex16 reclutan la Pex19 para formar una región especializada de la membrana del RE, que puede brotar desde el RE, para formar una membrana precursora de los peroxisomas. La evidencia actual indica que las proteínas de la membrana de los peroxisomas que se ensamblan en los peroxisomas maduros también pueden seguir la misma vía dependiente de la Pex19 para la formación de novo de nuevos peroxisomas desde el RE. La inserción de las proteínas de la membrana de los peroxisomas genera membranas que tienen los componentes necesarios para la incorporación de las proteínas de la matriz, lo que conduce a la formación de peroxisomas maduros y funcionales.

La división de los peroxisomas maduros, que determina en gran medida la cantidad de peroxisomas de una célula, depende de otra proteína, la Pex11. La sobre expresión de la proteína Pex11 provoca un gran aumento en el número de peroxisomas; esto sugiere que esa proteína controla el grado de división de los peroxisomas. Los peroxisomas pequeños generados por división pueden aumentar de tamaño por la incorporación de proteínas adicionales de la matriz o de la membrana, por las mismas vías descritas previamente.

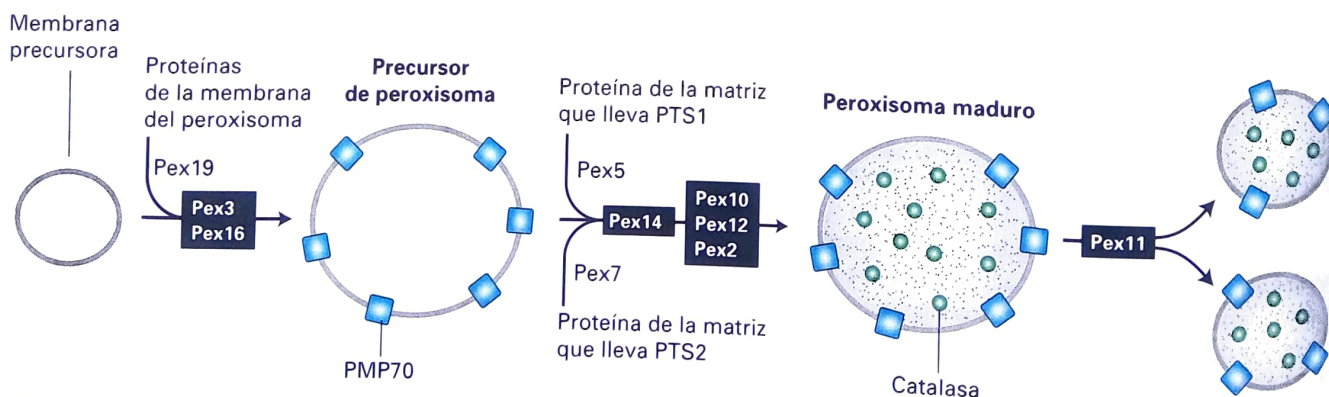


FIGURA 13-32 Modelo de la biogénesis y división de los peroxisomas.

La primera etapa en la formación de novo de los peroxisomas es la incorporación de las proteínas de la membrana de éstos a membranas precursoras derivadas del RE. La Pex19 actúa como receptor para las secuencias de direccionamiento hacia la membrana. Un complejo de Pex3 y Pex16 es necesario para la adecuada inserción de las proteínas (p. ej., PMP70) a la membrana del peroxisoma en formación. La inserción de todas las proteínas de la membrana del peroxisoma produce un precursor de peroxisoma capaz de importar las

proteínas dirigidas a la matriz. Las vías de importación de las proteínas de la matriz que contienen PTS1 y PTS2 difieren solo en la identidad del receptor citosólico (Pex5 y Pex7, respectivamente), que se une a la secuencia de direccionamiento (véase la Fig. 13-30). La incorporación completa de las proteínas de la matriz da como resultado un peroxisoma maduro. Si bien pueden formarse peroxisomas de novo, como se describió, en la mayoría de las condiciones la proliferación de los peroxisomas implica la división de peroxisomas maduros. Este proceso que depende de la proteína Pex11.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 13.5

Direccionamiento de las proteínas a los peroxisomas

- Todas las proteínas de los peroxisomas se sintetizan en los ribosomas citosólicos y son incorporadas a los orgánulos después de la traducción.
- La mayoría de las proteínas de la matriz de los peroxisomas contienen una secuencia de direccionamiento PTS1 C-terminal; unas pocas poseen una secuencia de direccionamiento PTS2 N-terminal. Ninguna de estas secuencias se segmenta después de la importación.
- Todas las proteínas destinadas a la matriz de los peroxisomas se unen a una proteína transportadora citosólica, que difiere de las proteínas que llevan PTS1 y PTS2; se dirigen hacia el receptor de la importación común y a la maquinaria de translocación de la membrana del peroxisoma (véase la Fig. 13-30).
- La translocación de las proteínas de la matriz, a través de la membrana del peroxisoma, depende de la hidrólisis de ATP. A diferencia de la importación de proteínas al RE, las mitocondrias y los cloroplastos, muchas proteínas de la matriz de los peroxisomas se pliegan en el citosol y atraviesan la membrana en forma plegada.
- Las proteínas destinadas a la membrana de los peroxisomas contienen secuencias de direccionamiento distintas de las presentes en las proteínas de la matriz de los peroxisomas, y son importadas por una vía diferente.
- A diferencia de las mitocondrias y los cloroplastos, los peroxisomas pueden surgir de novo, a partir de membranas precursoras probablemente derivadas del RE, como así también por división de orgánulos preexistentes (véase la Fig. 13-32).

13.6 Transporte hacia el interior y el exterior del núcleo

El núcleo está separado del citoplasma por dos membranas, que forman la **envoltura nuclear** (véase la Fig. 9-32). La envoltura nuclear se continúa con el RE y forma parte de éste. El transporte de proteínas desde el citoplasma hasta el núcleo y el movimiento de macromoléculas, incluso los mRNA, los tRNA y las subunidades ribosómicas, hacia el exterior del núcleo se produce a través de los *poros nucleares*, que abarcan ambas membranas de la envoltura nuclear. La incorporación de proteínas al núcleo comparte algunas características fundamentales de proteínas al núcleo comparte algunas características fundamentales de proteínas al núcleo comparte algunas características fundamentales de proteínas al núcleo. Por ejemplo, las proteínas nucleares incorporadas llevan secuencias específicas de direccionamiento, conocidas como secuencias de localización nuclear o SLN. Sin embargo, las proteínas se incorporan al interior del núcleo en estado plegado y, de este modo, la incorporación nuclear difiere fundamentalmente de la translocación de proteínas a través de las membranas del RE, las mitocondrias y los cloroplastos, donde las proteínas no están plegadas durante la translocación. En esta sección, analizamos el principal mecanismo por el cual las proteínas y algunas proteínas ribonucleares, como los ribosomas, ingresan en el núcleo y salen de éste. Analizamos también el modo en el que el mRNA y otros complejos proteicos ribonucleares salen del núcleo mediante un proceso que difiere, en su mecanismo, de la incorporación de proteínas al núcleo.

Las moléculas grandes y pequeñas ingresan en el núcleo y salen de éste por medio de los complejos del poro nuclear

Numerosos poros perforan la envoltura nuclear, en todas las células eucarióticas. Cada poro nuclear está formado por una estructura elaborada denominada **complejo de poro nuclear** (CPN), que es uno de los ensamblajes proteicos más grandes en la célula. La masa total de la estructura del poro es de entre 60-80 millones Da en los vertebrados, lo que resulta unas 16 veces más grande que un ribosoma. Un CPN está constituido por múltiples copias de aproximadamente 30 proteínas diferentes denominadas **nucleoporinas**. Las fotomicrografías electrónicas de los complejos de poro nuclear revelan una estructura anular, octogonal, embebida en la membrana que rodea un poro, en gran medida, acuoso (Fig. 13-33). Ocho filamentos de casi 100 nm de longitud se extienden al nucleoplasma con sus extremos distales unidos por un anillo terminal, lo que forma una estructura denominada *cesta nuclear*. Los filamentos citoplasmáticos se extienden desde el lado citoplasmático del CPN al citosol.

Los iones, los metabolitos pequeños y las proteínas globulares de hasta aproximadamente 40 kDa pueden difundir pasivamente a través de la región acuosa central del complejo de poro nuclear. Sin embargo, las grandes proteínas y los complejos ribonucleoproteicos no pueden difundir hacia el interior y el exterior del núcleo. En lugar de ello, estas macromoléculas son transportadas activamente a través del CPN, con el auxilio de proteínas transportadoras solubles que unen macromoléculas e interactúan con las nucleoporinas. La capacidad y eficiencia del CPN para este transporte activo es notable. En un minuto, se estima que cada CPN transporta 60 000 moléculas de proteína hacia el interior del núcleo, 50-250 moléculas de mRNA, 10-20 subunidades ribosómicas y 1 000 tRNA hacia afuera del núcleo.

En términos generales, las nucleoporinas son de tres tipos: *nucleoporinas estructurales*, *nucleoporinas de la membrana* y *nucleoporinas FG*. Las nucleoporinas estructurales forman el esqueleto del poro nuclear, que es un anillo de simetría octogonal que atraviesa ambas membranas de la envoltura nuclear y crea un anillo. Las membranas de las lamelas interna y externa de la envoltura nuclear se conectan en el CPN por medio de una región muy curva de la membrana que contiene nucleoporinas incrustadas de membrana (véase la Fig. 13-33b). Un conjunto de 7 nucleoporinas estructurales forma una estructura con forma de Y de aproximadamente el tamaño del ribosoma, que se conoce con el nombre de **complejo Y**. Dieciséis copias del complejo Y conforman el esqueleto estructural básico del poro, que tiene simetría bilateral a través de la envoltura nuclear, y simetría rotacional octogonal en el plano de la envoltura (véase la Fig. 13-33c). Un motivo estructural repetido varias veces dentro del complejo Y está muy relacionado con una estructura que se encuentra en las proteínas COPII, que impulsan la formación de las vesículas recubiertas dentro de las células (véase el Cap. 14). Esta relación primordial entre las proteínas estructurales del poro nuclear y las proteínas de la cubierta de las vesículas sugiere que los dos tipos de complejos de cubierta de membrana comparten un origen. La función básica de este elemento puede consistir en formar una red proteica que, en un complejo con las nucleoporinas de la membrana, deforme la membrana y la torne una estructura muy curva.

Las nucleoporinas FG, que tapizan el canal del complejo del poro nuclear y se encuentran asociadas con la cesta nuclear y los filamentos citoplasmáticos, contienen múltiples repeticiones de secuencias hidrofóbicas cortas ricas en residuos de fenilalanina (F) y glicina (G) (repeti-

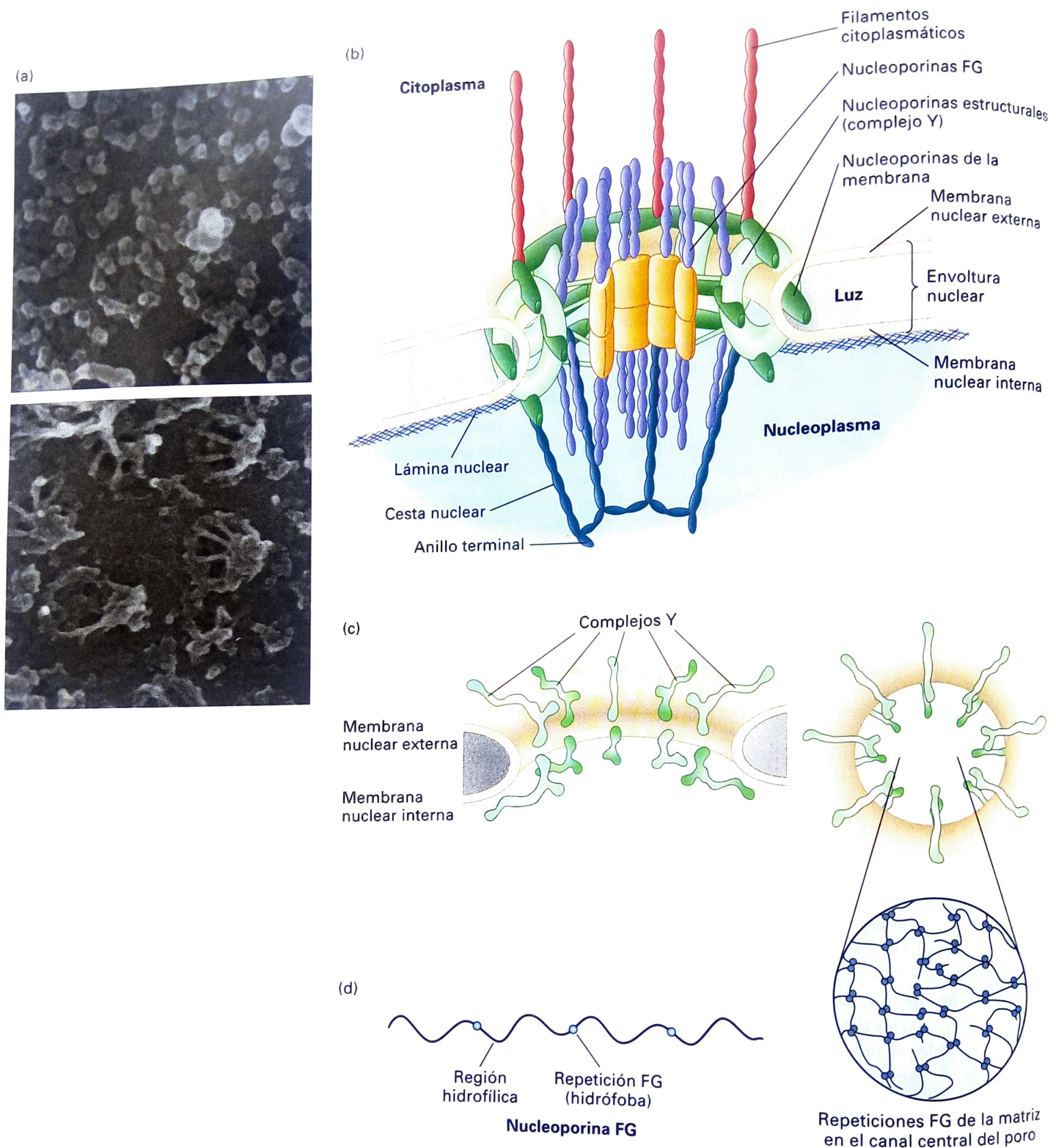


FIGURA 13-33 Complejo de poro nuclear en diferentes niveles de resolución. (a) Visto por microscopía electrónica de barrido, la envoltura nuclear de núcleos grandes de ovocitos de *Xenopus*. Arriba: Vista de la cara citoplasmática que muestra la forma octogonal de la porción de los complejos de poro nuclear insertos en la membrana. Abajo: Vista de la cara nucleoplasmática que muestra la cesta nuclear que se extiende desde la porción de la membrana. (b) Modelo en corte del complejo del poro que muestra las principales características estructurales formadas por las nucleoporinas de membrana, las nucleoporinas estructurales y las nucleoporinas FG. (c) Dieciséis copias del complejo Y forman una parte principal del andamiaje estructural del complejo de poro nuclear. La estructura tridimensional del complejo Y se modela dentro de la

estructura del poro. Nótese la simetría doble a través de la membrana doble del núcleo (izquierda) y la simetría octogonal rotacional alrededor del eje del poro (derecha). (d) Las nucleoporinas FG tienen estructuras desordenadas extendidas, compuestas por repeticiones de la secuencia Phe-Gly, interdispersadas con regiones hidrófilas (izquierda). Las nucleoporinas FG son más abundantes en la zona central del poro, y se cree que las secuencias repetidas FG llenan el canal central con una matriz geliforme (derecha). (La parte [a] de V. Doye y E. Hurt, 1997, *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**:401, cortesía de M. W. Goldberg y T. D. Allen. La parte [b] adaptada de M. P. Rout y J. D. Atchison, 2001, *J. Biol. Chem.* **276**:16593. La parte [c] cortesía de Thomas Schwarz. La parte [d] adaptada de K. Ribbeck y D. Görlich, 2001, *EMBO J.* **20**:1320-1330.)

ciones FG). Se cree que las repeticiones FG hidrófobas se presentan en regiones de cadenas polipeptídicas extendidas, por lo demás hidrófilas, que llenan el centro del canal transportador. Las nucleoporinas FG son esenciales para la función del CPN; sin embargo, el CPN sigue siendo funcional aún si hasta la mitad de las repeticiones FG han sido deletadas. Se considera que las nucleoporinas FG forman una matriz gelatinosa flexible, con propiedades generales que permiten la difusión de moléculas pequeñas y excluyen las proteínas hidrófilas no chaperonadas superiores a 40 kDa (véase la Fig. 13-33d).

Los receptores de transporte nuclear escoltan a las proteínas que contienen señales de localización nuclear hacia el interior del núcleo

Las proteínas que se encuentran en el núcleo —como las histonas, los factores de transcripción y las DNA y RNA polimerasas— se sintetizan en el citoplasma y se incorporan en el interior del núcleo a través de complejos de poro nucleares. Estas proteínas contienen una *señal de localización nuclear (SLN)* que dirige su transporte selectivo hacia el núcleo. Las SLN fueron descubiertas mediante el análisis de mutantes del gen para el antígeno T grande, localizado en el virus 40 de los simios (SV40). La forma silvestre del antígeno T grande está localizada en el núcleo de las células infectadas por virus, mientras que algunas formas mutadas del antígeno T grande se acumulan en el citoplasma (Fig. 13-34). Todas las mutaciones causantes de esta localización celular alterada se producen en una secuencia específica de 7 residuos, rica en aminoácidos básicos, cercana al extremo C-terminal de la proteína: Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val. Los experimentos con proteínas híbridas

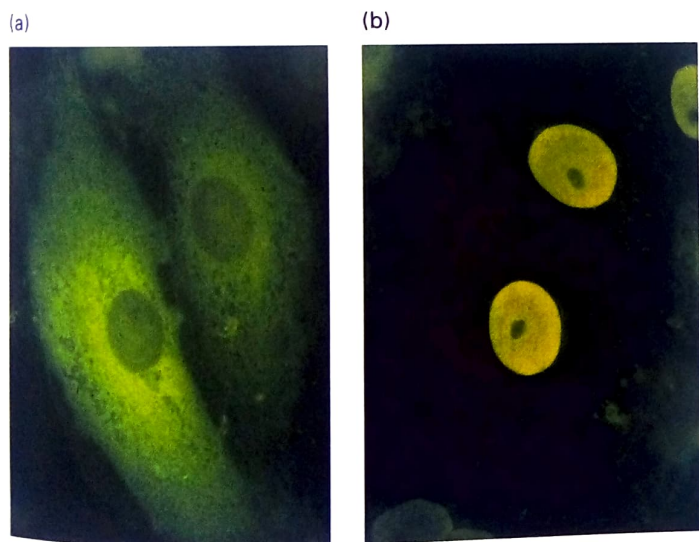
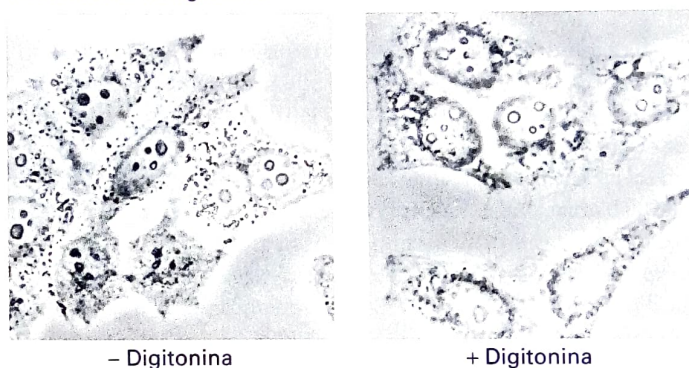


FIGURA EXPERIMENTAL 13-34 La señal de localización nuclear (SLN) dirige las proteínas hacia el núcleo de la célula. Las proteínas citoplasmáticas pueden ser dirigidas hacia el núcleo cuando se han fusionado a una señal de localización nuclear. (a) La piruvato cinasa normal, vista por inmunofluorescencia después de que las células en cultivo han sido tratadas con un anticuerpo específico (amarillo), se localiza en el citoplasma. Esta proteína citosólica muy grande actúa en el metabolismo de los hidratos de carbono. (b) Cuando se expresó una piruvato cinasa quimérica que contenía la SLN del SV40 en su extremo N-terminal en las células, se localizó en el núcleo. La proteína quimérica se expresó a partir de un gen transfectado mediante ingeniería genética, producido al fusionar un fragmento génico viral que codificaba SLN de SV40 al gen de piruvato cinasa. (Tomado de D. Kalderon y cols., 1984, *Cell* **39**:499, cortesía de Dr. Alan Smith)

programadas mediante ingeniería genética, en los cuales esta secuencia se fusionó con una proteína citosólica, demostraron que esta dirige el transporte hacia el interior del núcleo y, en consecuencia, funciona como una SLN. Posteriormente, las secuencias SLN se identificaron en muchas otras proteínas incorporadas al núcleo. Muchas de éstas son similares a la SLN básica del antígeno T grande del SV40, mientras que otras SLN son bastante diferentes, desde el punto de vista químico. Por ejemplo, una SLN en la proteína que une RNA, hnRNP A1, es hidrófoba. De modo que debe haber múltiples mecanismos para el reconocimiento de estas secuencias tan distintas.

Los trabajos iniciales sobre el mecanismo de importación nuclear mostraron que las proteínas que contienen una SLN básica, similar a la presente en el antígeno T grande de SV40, serán transportadas con eficiencia hacia los núcleos aislados, siempre que se les proporcione un extracto citosólico (Fig. 13-35). Empleando este sistema de ensayo, los investigadores purificaron dos componentes citosólicos requeridos: Ran y un receptor del transportador nuclear. La *Ran* es una proteína

(a) Efecto de la digitonina



(b) Importación nuclear por células permeabilizadas

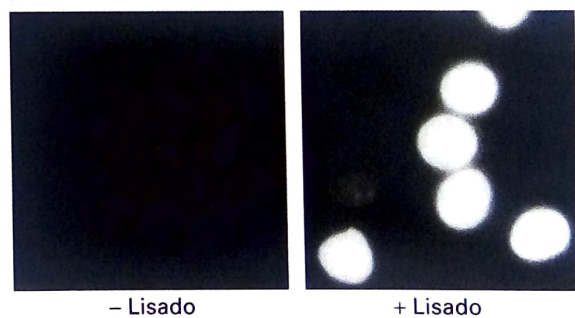
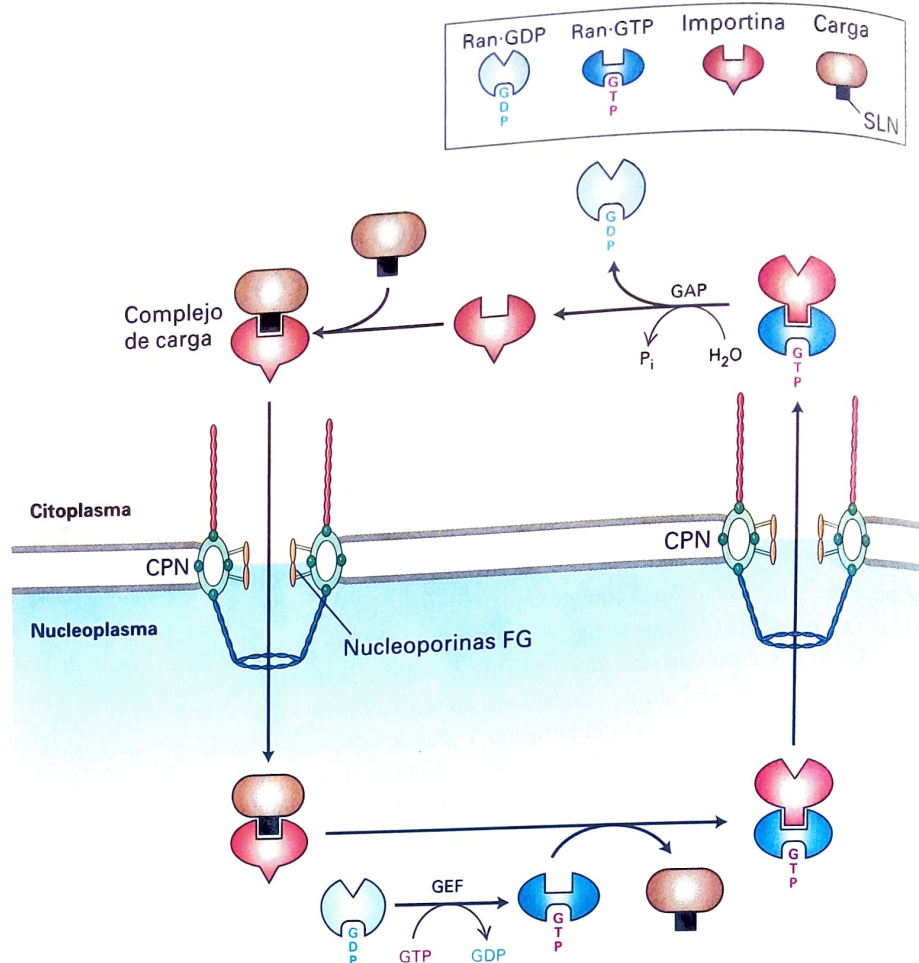


FIGURA EXPERIMENTAL 13-35 Se requieren proteínas citosólicas para el transporte hacia el núcleo. El fracaso del transporte nuclear en células cultivadas, permeabilizadas en ausencia de un lisado, demuestra el compromiso de componentes citosólicos solubles en el proceso. (a) Fotomicrografías de contraste de fase de células HeLa no tratadas y permeabilizadas con digitonina. El tratamiento de las monocapas de células cultivadas con el detergente suave no iónico digitonina permeabiliza la membrana plasmática, de modo tal que los constituyentes citosólicos se pierden, pero permite que la envoltura nuclear y el CPN permanezcan intactos. (b) Fotomicrografías de fluorescencia de las células HeLa permeabilizadas con digitonina, incubadas con una proteína fluorescente acoplada químicamente al péptido SLN contra el antígeno T del SV40 sintético, en presencia y ausencia de citosol (lisado). La acumulación de esta sustancia de transporte en el núcleo solo se produce cuando el citosol se incluye en la incubación (*derecha*). (Tomado de S. Adam y cols., 1990, *J. Cell Biol.* **111**:807, cortesía de Dr. Larry Gerace)

FIGURA 13-36 Importación nuclear. Mecanismo para la importación nuclear de proteínas "carga". En el citoplasma (*arriba*), un receptor de transporte nuclear libre (importina) se une a la SLN de una proteína carga y forma un complejo de carga bimolecular. El complejo de carga difunde a través del CPN mediante la interacción transitoria con las nucleoporinas FG. En el nucleoplasma, la Ran-GTP se une a la importina, lo que produce un cambio de conformación que disminuye su afinidad por la SLN y libera la carga. Para dar sustento a otro ciclo de importación, el complejo exportina-Ran-GTP se transporta nuevamente hacia el citoplasma. Una proteína que acelera la GTPasa (GAP), asociada con los filamentos citoplasmáticos del CPN, estimula la Ran para hidrolizar el GTP unido. Esto genera un cambio de conformación que provoca la disociación desde el receptor de transporte nuclear, que puede entonces iniciar otro ciclo de importación. La Ran-GDP vuelve al nucleoplasma, donde el factor de intercambio de guanina nucleótido (GEF) provoca la liberación del GDP y la nueva unión de GTP.



G monomérica, pequeña, que existe en conformaciones unidas a GTP o GDP (véase la Fig. 13-32). El **receptor de transporte nuclear** se une tanto a la SLN de una proteína carga que será transportada al interior del núcleo como a las repeticiones FG de las nucleoporinas. Mediante un proceso físico que aún no se conoce con certeza, uniéndose transitoriamente a las repeticiones FG, los receptores de transporte nuclear tienen la capacidad de atravesar con rapidez la matriz que contiene las repeticiones FG en el canal central del poro nuclear, mientras que las proteínas de tamaño similar que carecen de esta propiedad son excluidas del canal central. Los receptores de transporte nuclear pueden ser monoméricos, con un solo polipéptido que puede unirse tanto a las SLN como a las repeticiones FG, o dimericos, con una subunidad que se une a las SLN, y la otra a las repeticiones FG.

El mecanismo de importación de proteínas carga citoplasmáticas, mediado por un receptor de importación nuclear, se muestra en la Figura 13-36. Receptores libres de transporte nuclear, presentes en el citoplasma, se unen a sus SLN semejantes en una proteína carga y forman un complejo importina-carga. Luego, el complejo de carga se transloca a través del canal del CPN cuando el receptor de transporte nuclear interactúa con las repeticiones FG. El complejo carga rápidamente llega al nucleoplasma y, allí, el receptor del transportador nuclear interactúa con Ran-GTP, lo que provoca un cambio de conformación en el receptor del transportador nuclear que desplaza la SLN y libera la proteína carga al nucleoplasma. El complejo receptor de transportador nuclear-Ran-GTP difunde nuevamente a través del CPN. Una vez que el complejo receptor del transportador nuclear-Ran-GTP llega al lado citoplasmático del CPN, la Ran interactúa con una **proteína activado-**

ra de la GTPasa (Ran-GAP), que es un componente de los filamentos citoplasmáticos del CPN. Esto estimula la Ran para que hidrolice su GTP unido a GDP, lo que produce la conversión a una conformación con baja afinidad por el receptor de transporte nuclear, de modo tal que el receptor de transporte nuclear libre se libera al citoplasma, donde puede participar de otro ciclo de importación. El Ran-GDP se desplaza nuevamente a través del poro hacia el nucleoplasma, donde se encuentra con un **factor de intercambio-guanina nucleótido (Ran-GEF)** que hace que la Ran libere su GDP unido en favor del GTP. El resultado neto de esta serie de reacciones es el acoplamiento de la hidrólisis de GTP a la transferencia de una proteína que lleva SLN desde el citoplasma hacia el interior del núcleo y proporciona, de este modo, una fuerza conductora para el transporte nuclear.

Aunque el complejo receptor de transporte nuclear-carga se desplaza a través del poro por difusión al azar, el proceso completo de transporte de la carga hacia el interior del núcleo es unidireccional. Dada la rápida disociación del complejo de importación cuando llega al nucleoplasma, hay un gradiente de concentración del receptor de transporte nuclear-carga a través del CPN: elevado en el citoplasma, donde el complejo se ensambla, y bajo en el nucleoplasma, donde se disocia. El gradiente de concentración es causante de la naturaleza unidireccional de la importación nuclear. Un gradiente de concentración similar impulsa el receptor de transporte nuclear del núcleo nuevamente al citoplasma. La concentración del complejo receptor de transporte nuclear-Ran-GTP es más elevada en el nucleoplasma, donde se ensambla, que en el lado citoplasmático del CPN, donde se disocia. Finalmente, la dirección del proceso de transporte depende de la distri-

bución asimétrica de la Ran-GEF y de la Ran-GAP. La Ran-GEF del nucleoplasma mantiene la Ran en el estado Ran-GTP, en el que promueve la disociación del complejo carga. La Ran-GAP del lado citoplasmático del CPN convierte Ran-GTP en Ran-GDP, por disociación el receptor del transporte nuclear-Ran-GTP y liberación del receptor de transporte nuclear hacia el citosol.

Un segundo tipo de receptores de transporte nuclear escoltan las proteínas que contienen señales nucleares de exportación hacia el exterior del núcleo

Se utiliza un mecanismo muy semejante para exportar proteínas, tRNA y subunidades ribosómicas desde el núcleo hacia el citoplasma. Inicialmente, este mecanismo fue descubierto en estudios de complejos nucleicos ribonucleares que “se trasladan” entre el núcleo y el citoplasma. Estas proteínas “de traslado” contienen una *señal de exportación nuclear (SEN)* que estimula su exportación desde el núcleo hacia el citoplasma a través de los poros nucleares, además de una SLN que es captada por el núcleo. Los experimentos con genes híbridos, programados mediante ingeniería genética, que codifican una proteína restringida al núcleo, fusionada en varios segmentos de una proteína que transporta hacia el interior y el exterior del núcleo, han permitido identificar tres clases diferentes de SEN: una secuencia rica en leucina que se encuentra en el PKI (un inhibidor de la proteína cinasa A) y en la proteína Rev del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), así como dos secuencias identificadas en dos partículas ribonucleoproteicas heterogéneas (hnRNP). Las características estructurales significativas, desde el punto de vista funcional, que especifican la exportación desde el núcleo aún son poco conocidas.

El mecanismo por el cual las proteínas de traslado se exportan desde el núcleo se comprende mejor en los casos de aquellas que contiene la SEN rica en leucina. De acuerdo con el modelo actual, que se muestra en la **Figura 13-37a**, un receptor de transporte nuclear específico en el núcleo, denominado exportina 1, primero forma un complejo con la Ran-GTP; luego, se une a la SEN en una proteína carga. La unión de la exportina 1 al Ran-GTP causa un cambio de conformación en la exportina 1, que incrementa su afinidad por la SEN, de modo tal que se forma un *complejo carga trimolecular*. Como sucede con otros receptores de transporte nuclear, la exportina 1 interactúa transitoriamente con las repeticiones FG en las nucleoporinas FG y difunde a través del CPN. El complejo de carga se disocia cuando encuentra el Ran-GAP en los filamentos citoplasmáticos del CPN, lo que estimula la Ran a hidrolizar el GTP unido, y produce a la Ran un cambio de conformación con baja afinidad por la exportina 1. La exportina 1 liberada cambia la conformación en una estructura que tiene baja afinidad por la SEN, lo que libera la carga en el citosol. La dirección del proceso de exportación es impulsada por la disociación de la carga desde la exportina 1 hacia el citoplasma, lo que genera un gradiente de concentración desde el complejo de carga a través del CPN, que es alta en el nucleoplasma y baja en el citoplasma. Luego, la exportina 1 y la Ran-GDP se transportan nuevamente hacia el núcleo a través de un CPN.

Comparando este modelo de exportación nuclear con el de la **Figura 13-36** para la importación nuclear, podemos observar una diferencia obvia: la Ran-GTP es parte del complejo de carga durante la exportación, pero no durante la importación. Fuera de esta dife-

rencia, los dos procesos de transporte son notablemente similares. En ambos, la asociación de un receptor de transporte nuclear con Ran-GTP en el nucleoplasma provoca un cambio de conformación que afecta su afinidad por la señal de transporte. Durante la importación, la interacción provoca la liberación de la carga; durante la exportación, la interacción promueve la asociación con ésta. Tanto en la exportación como en la importación, la estimulación de la hidrólisis Ran-GTP en el citoplasma, por el Ran-GAP, produce un cambio de conformación en la Ran que libera el receptor de señal de transporte. En el transcurso de la exportación nuclear, la carga también se libera. La localización de la Ran-GAP y Ran-GEF en el citoplasma y el núcleo, respectivamente, constituye la base del transporte unidireccional de proteínas de carga a través del CPN.

De un modo paralelo con su similitud de función, ambos tipos de receptores de transporte nuclear son homólogos en secuencia y estructura. La familia de receptores de transporte nuclear tiene 14 miembros en las levaduras y más de 20, en las células de mamífero. Las SEN o SLN, a las cuales se unen, han sido determinadas solo para una parte del proceso. Algunos receptores de transporte nuclear funcionan tanto en la importación como en la exportación.

Un mecanismo de transporte similar se ha mostrado para la exportación de otras cargas desde el núcleo. Por ejemplo, la exportina-t funciona para exportar los tRNA. La exportina-t se une a tRNA completamente procesado en un complejo con la Ran-GTP que difunde a través del CPN y se disocia cuando interactúa con Ran-GAP en los filamentos citoplasmáticos del CPN; esto produce la liberación del tRNA en el citosol. También se requiere un proceso dependiente de Ran para la exportación nuclear de las subunidades ribosómicas a través del CPN, una vez que los componentes RNA y proteína se han ensamblado de manera adecuada en el nucléolo. De modo similar, ciertos mRNA específicos, que se asocian con proteínas hnRNP particulares, pueden ser exportados por un mecanismo dependiente de Ran.

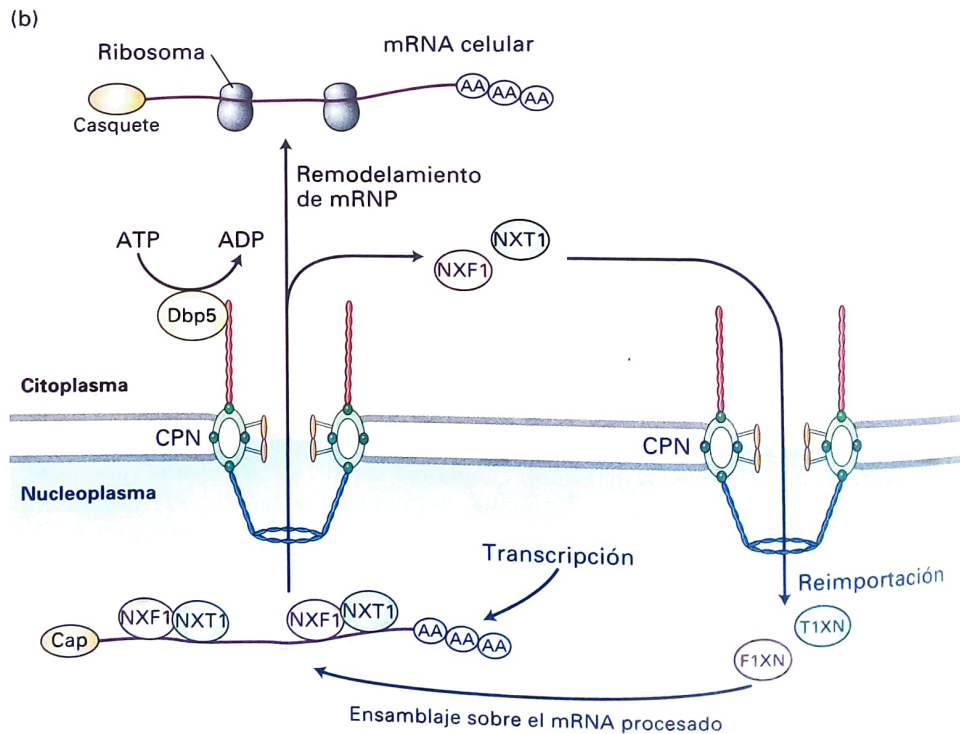
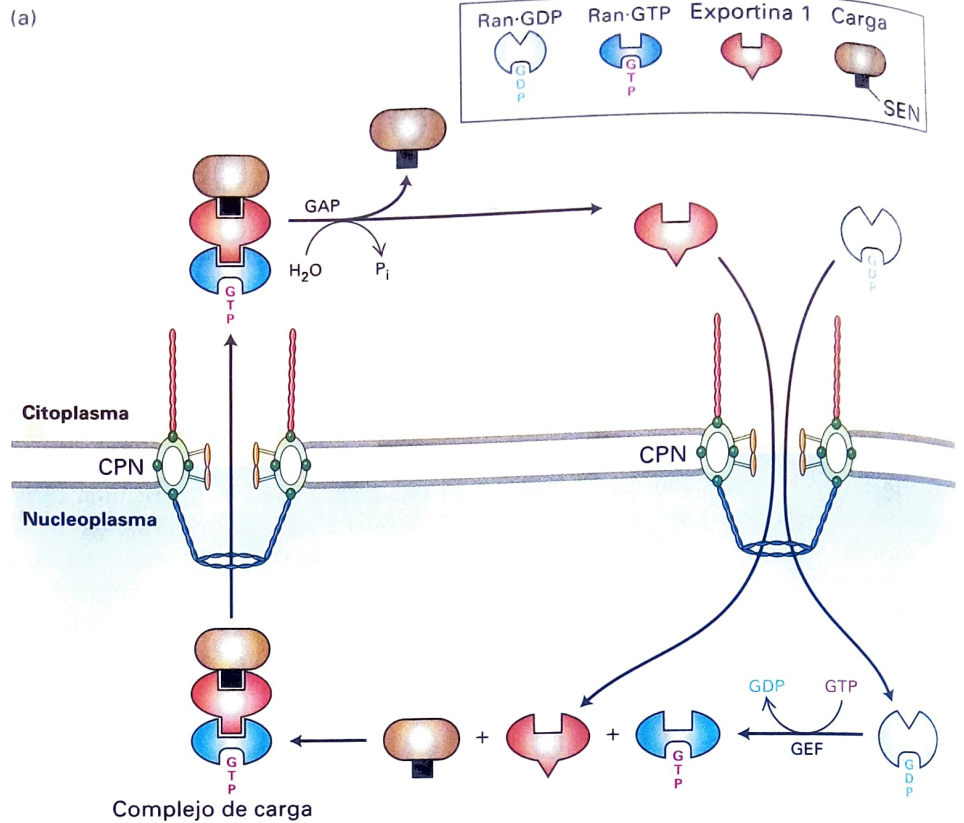
La mayoría de los mRNA se exportan desde el núcleo por un mecanismo independiente de Ran

Una vez que el procesamiento de un mRNA se ha completado en el núcleo, permanece asociado con proteínas específicas hnRNP en un *complejo mensajero proteína ribonuclear* o mRNP. El principal transportador de mRNP hacia el exterior del núcleo es el **exportador de mRNP**, una proteína heterodimérica compuesta por una subunidad grande denominada *factor 1 de exportación nuclear (F1XN)* y una subunidad pequeña, el *transportador 1 de exportación nuclear (T1XN)*. Múltiples dímeros F1XN/T1XN se unen a las mRNP nucleares a través de interacciones cooperativas con el RNA y otras mRNP adaptadoras, que se asocian con los pre mRNA nacientes durante la elongación de la transcripción y el procesamiento del pre mRNA. En muchos aspectos, la F1XN/T1XN actúa como un receptor de transportador nuclear que se une a una SLN o a una SEN, en el sentido en que ambas subunidades interactúan con los dominios FG de las nucleoporinas FG y les permiten difundir a través del canal central del CPN.

El proceso de exportación de las mRNP no requiere Ran; de este modo, para el transporte unidireccional de mRNA hacia el exterior del núcleo, es necesaria una fuente de energía distinta de la hidrólisis del GTP por la Ran. Una vez que el complejo mRNP-F1XN/T1XN llega a la cara citoplasmática del CPN, F1XN y T1XN se disocia de

FIGURA 13-37 Exportación nuclear dependiente de Ran e independiente de Ran. (a) El mecanismo dependiente de Ran para la exportación nuclear

de las proteínas carga, que contiene una señal de exportación nuclear rica en leucina (SEN). En el nucleoplasma (*abajo*), la proteína exportina 1 se une en forma cooperativa a la SEN de la proteína carga que será transportada y a la Ran-GTP. Después de que el complejo de carga resultante difunde a través de un CPN, mediante interacciones transitorias con las repeticiones FG en las nucleoporinas FG, el GAP asociado con los filamentos citoplasmáticos del CPN estimula la hidrólisis de GTP, lo que convierte la Ran-GTP en Ran-GDP. El cambio de conformación acompañante, en la Ran, conduce a la disociación del complejo. La proteína carga que contiene SEN se libera en el citosol, mientras que la exportina 1 y la Ran-GDP se transportan nuevamente hacia el núcleo a través de los CPN. Luego, la Ran-GEF, en el nucleoplasma, estimula la conversión de Ran-GDP en Ran-GTP. (b) Exportación nuclear independiente de Ran de los mRNA. El complejo heterodimérico F1XN/T1XN se une a complejos mRNA-proteína (mRNP) del núcleo. F1XN/T1XN actúa como un factor de exportación nuclear y dirige las mRNP asociadas hacia el canal central del CPN, mediante la interacción transitoria con las nucleoporinas FG. Una helicasa de RNA (Dbp5), localizada en la cara citoplasmática del CPN, elimina F1XN y T1XN del mRNA en una reacción impulsada por la hidrólisis de ATP. Las proteínas F1XN y T1XN se reciclan nuevamente al núcleo por el proceso de importación dependiente de Ran, que se ilustra en la Figura 13-36.



las mRNP, con ayuda de la helicasa de RNA, Dbp5, que se asocia con los filamentos citoplasmáticos del CPN. Recordemos que las helicasas de RNA utilizan la energía derivada de la hidrólisis del ATP para desplazarse a lo largo de las moléculas de RNA, separando las cadenas

de RNA bicatenario y disociando los complejos RNA-proteínas (Capítulo 4). Esto conduce a la idea simple de que Dbp5, que se asocia con la cara citoplasmática del complejo del poro nuclear, actúa como un motor impulsado por ATP para eliminar el F1XN/T1XN de los

complejos con mRNP, a medida que surgen en la cara citoplasmática del CPN. El ensamblaje de F1XN/T1XN dependiente de ATP sobre las mRNP, en la cara nucleoplasmática del CPN y el posterior desensamblaje del complejo F1XN/T1XN de las mRNP en la cara citoplasmática del CPN, crea un gradiente de concentración de mRNP-F1XN/T1XN que impulsa la exportación unidireccional. Después de ser eliminadas de las mRNP, las proteínas F1XN y T1XN que han sido separadas del mRNA por la helicasa Dbp5 se importan nuevamente hacia el núcleo mediante un proceso que depende de la Ran y de un receptor del transporte nuclear (Fig. 13-37b).

En la exportación nuclear dependiente de Ran (que se analizó en la subsección previa), la hidrólisis del GTP por la Ran de la cara citoplasmática del CPN provoca la disociación del receptor de transporte nuclear de su carga. En una descripción básica, la exportación nuclear independiente de Ran analizada aquí opera de un modo similar, excepto en que la Dbp5p de la cara citoplasmática del CPN emplea la hidrólisis de ATP para disociar el exportador de las mRNP del mRNA.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 13.6

Transporte hacia el interior y el exterior del núcleo

- La envoltura nuclear contiene numerosos complejos de poro nucleares (CPN), que son estructuras grandes, complejas, compuestas por múltiples copias de 30 proteínas denominadas *nucleoporinas* (véase la Fig. 13-33). Las nucleoporinas FG, que contienen múltiples repeticiones de secuencias hidrófobas cortas (repeticiones FG), tapizan el canal de transporte central y desempeñan una función en el transporte de todas las macromoléculas a través de los poros nucleares.
- El transporte de macromoléculas superiores a 20-40 kDa a través de los poros nucleares requiere la asistencia de receptores de transporte nuclear que interactúan tanto con la molécula transportada como con las repeticiones FG de las nucleoporinas FG.
- Las proteínas importadas o exportadas, hacia el núcleo o desde éste, contienen una secuencia específica de aminoácidos que funciona como una señal de localización nuclear (SLN) o una señal de exportación nuclear (SEN). Las proteínas restringidas del núcleo contienen una SLN pero no una SEN, mientras que las proteínas que se desplazan entre el núcleo y el citoplasma contienen ambas señales.
- Se han identificado varios tipos distintos de SEN y SLN. Se considera que cada tipo de señal de transporte nuclear interactúa con una proteína específica de transporte nuclear, que pertenece a una familia de proteínas homólogas.
- Una proteína carga que lleva una SEN o una SLN se transloca a través de los poros nucleares unida a su proteína de transporte nuclear semejante. Las interacciones transitorias entre los receptores de transporte nuclear y las repeticiones FG permiten una difusión muy rápida del complejo proteína-carga a través del canal central del CPN, lleno con una matriz hidrófoba de repeticiones FG.
- La naturaleza unidireccional de la exportación e importación de proteínas a través de los poros nucleares resulta de la participación de Ran, una proteína G monomérica que existe en diferentes conformaciones,

cuando está unida a GTP o GDP. La localización del factor de intercambio de guanina nucleótido (GEF) de la Ran, en el núcleo y de la proteína activadora de GTPasa (GAP) de la Ran en el citoplasma, crea un gradiente con una elevada Ran-GTP en el nucleoplasma, y Ran-GDP en el citoplasma. La interacción de complejos de importación de carga con Ran-GTP, en el nucleoplasma, provoca la disociación del complejo y libera la carga en el nucleoplasma (véase la Fig. 13-36), mientras que el ensamblaje de complejos de exportación de la carga se ve estimulado por la interacción con Ran-GTP en el nucleoplasma (véase la Fig. 13-37).

- La mayoría de las mRNP se exportan desde el núcleo, por su unión, a un exportador de mRNP heterodimérico presente en el nucleoplasma, que interactúa con las repeticiones FG. La dirección del transporte (del núcleo al citoplasma) resulta de la acción de una helicasa de RNA asociada con los filamentos citoplasmáticos de los complejos del poro nuclear que remueve el exportador mRNP heterodimérico, una vez que el complejo transportador ha llegado al citoplasma.

Perspectivas para el futuro

Como hemos visto en este capítulo, comprendemos ahora muchos aspectos de los procesos básicos, causantes del transporte selectivo de proteínas al retículo RE, la mitocondria, cloroplasto, peroxisoma y núcleo. Los estudios bioquímicos y genéticos, por ejemplo, han identificado las secuencias de señalización causantes del direccionamiento de las proteínas hacia el orgánulo correcto y los receptores de membrana que reconocen estas secuencias. También hemos aprendido mucho acerca de los mecanismos subyacentes que translocan las proteínas a través de las membranas de los orgánulos y han determinado si se emplea energía para empujar o traccionar las proteínas a través de la membrana en una dirección, el tipo de canal a través del cual pasan las proteínas y si las proteínas se translocan en estado plegado o no plegado. Sin embargo, quedan sin responder preguntas fundamentales; probablemente, la más intrigante sea de qué manera se mueven las proteínas completamente plegadas a través de una membrana.

La maquinaria de importación de los peroxisomas proporciona un ejemplo de translocación de proteínas plegadas. No solo es capaz de translocar proteínas completamente plegadas con cofactores unidos a la matriz del peroxisoma, sino que también puede dirigir la importación de grandes partículas de oro recubiertas con un péptido que direcciona hacia los peroxisomas (PTS1). Algunos investigadores han especulado con que el mecanismo de importación a los peroxisomas puede estar relacionado con el de importación al núcleo, el ejemplo mejor conocido de translocación postraducciona de proteínas plegadas. Tanto la maquinaria de importación de los peroxisomas como la nuclear pueden transportar moléculas plegadas de tamaños muy divergentes, y ambas parecen involucrar un componente que cicla entre el citosol y el interior del orgánulo —el receptor Pex5 PTS1, en el caso de la importación a los peroxisomas, y el complejo Ran-importina en el caso de la importación nuclear—. Sin embargo, aparecen también diferencias cruciales entre los dos procesos de translocación. Por ejemplo, los poros nucleares representan grandes ensamblajes macromoleculares estables, fácilmente observables al microscopio electrónico, mientras que no se han observado estructuras del tipo de poros similares en la membrana

de los peroxisomas. Más aún, las pequeñas moléculas pueden pasar fácilmente a través de los poros nucleares, mientras que las membranas de los peroxisomas mantienen una barrera permanente a la difusión de pequeñas moléculas hidrófilas. Tomadas en conjunto, estas observaciones sugieren que la importación a los peroxisomas puede requerir un tipo completamente distinto de mecanismo de translocación.

Los mecanismos evolutivos conservados para translocar proteínas plegadas a través de la membrana citoplasmática de las bacterias y por medio de la membrana tilacoide de los cloroplastos tampoco se conocen con certeza. Una mejor comprensión de todos estos procesos para translocar proteínas plegadas a través de una membrana probablemente constituirá una inflexión en el desarrollo futuro de los sistemas de translocación *in vitro*, que permitirá a los investigadores definir los mecanismos bioquímicos que impulsan la translocación e identificar las estructuras de intermediarios de translocación atrapados.

En comparación con nuestra comprensión acerca del modo en el que se translocan las proteínas solubles dentro de la luz del RE y la matriz mitocondrial, nuestro conocimiento en cuanto al modo en el que las secuencias direccionadoras especifican la topología de las proteínas de membrana de paso múltiple es bastante rudimentario. Por ejemplo, ignoramos de qué forma el canal del translocón acomoda los polipéptidos que se orientan de modo distinto con respecto a la membrana; tampoco comprendemos cómo las secuencias de los polipéptidos locales interactúan con el canal del translocón para establecer la orientación de la ubicación en la membrana y para señalar el paso lateral en la bicapa lipídica. Una mejor comprensión del modo en el que las secuencias de los aminoácidos de las proteínas de membrana pueden especificar la topología de la membrana será crucial para decodificar la enorme cantidad de información estructural para las proteínas de membrana que contienen las bases de datos de las secuencias genómicas.

Una comprensión más detallada de todos los procesos de translocación continuará surgiendo a partir de estudios genéticos y bioquímicos, tanto en levaduras como en mamíferos. Estos estudios, indiscutiblemente, revelarán proteínas clave adicionales, implicadas en el reconocimiento de secuencias de direccionamiento y en la translocación de proteínas a través de las bicapas lipídicas. Finalmente, es probable que los análisis estructurales de los canales de los translocos se extiendan, en el futuro, a resoluciones de escala atómica los estados conformacionales asociados con cada paso del ciclo de translocación.

Palabras clave

translocación	oligosacáridos <i>N</i> -ligados 594
cotraduccional 582	complejo de poro nuclear
dislocación 600	(CPN) 615
dolicol fosfato 595	receptor de transporte
nucleoporinas FG 615	nuclear 618
poro de importación general 604	oligosacáridos <i>O</i> -ligados 594
perfil de hidropatía 593	translocación
microsomos 580	postraduccional 584
chaperonas moleculares 585	proteína disulfuro isomerasa 597
proteínas de membrana de paso	proteína Ran 618
múltiple 588	RE rugoso 580

secuencia de
 señalización-anclaje 588
partícula de reconocimiento
 de la señal (PRS) 582
secuencias de señalización
 (captación-direccionamiento) 579
proteínas de membrana
 de paso único 587

secuencia de detención
 de la transferencia anclaje 588
secuencias topogénicas 587
topología (proteína de
 membrana) 587
translocón 583
complejo carga
 trimolecular 619
respuesta a proteína
 no plegada 599

Revisión de los conceptos

1. Los siguientes resultados se obtuvieron en estudios iniciales sobre la traducción de proteínas secretoras. Sobre la base de lo que sabemos actualmente acerca de este proceso, explique la razón por la cual se observó cada resultado. (a) Un sistema de traducción *in vitro* consistente solo en mRNA y ribosomas dio como resultado proteínas secretoras de mayor tamaño que la proteína idéntica, cuando se la traducía en una célula. (b) Un sistema similar que también incluyó microsomas produjo proteínas secretoras de tamaño idéntico a las presentes en la célula. (c) Cuando se añadieron los microsomas, después de la traducción *in vitro*, las proteínas sintetizadas nuevamente fueron de mayor tamaño que las desarrolladas en una célula.
2. Describa la fuente o las fuentes de energía necesarias para la translocación unidireccional a través de la membrana en (a) una translocación cotraduccional al interior del retículo endoplasmático (RE); (b) la translocación postraduccional al interior del RE; (c) la translocación al interior de la matriz mitocondrial.
3. La translocación a la mayoría de los orgánulos habitualmente requiere la actividad de una o más proteínas citosólicas. Describa la función básica de 3 factores citosólicos diferentes, requeridos para la translocación al interior del RE, las mitocondrias y los peroxisomas, respectivamente.
4. Describa los principios típicos empleados para identificar las secuencias topogénicas dentro de las proteínas, y de qué modo éstos pueden ser usados para desarrollar algoritmos de computación. ¿De qué manera la identificación de las secuencias topogénicas conduce a la predicción de la disposición en la membrana de una proteína de paso múltiple? ¿Cuál es la importancia de la disposición de las cargas positivas con relación a la orientación de la membrana de una secuencia de señalización-anclaje?
5. Una abundancia de proteínas mal plegadas en el RE puede dar como resultado la activación de la respuesta a las proteínas no plegadas y las vías de degradación en el RE. ¿La respuesta a las proteínas no plegadas disminuye la cantidad de proteínas no plegadas y altera la expresión génica de qué tipos de genes? ¿Cuál es una de las maneras en la cual la degradación asociada al RE puede identificar las proteínas mal plegadas? ¿Por qué la dislocación de estas proteínas mal plegadas al citoplasma es necesaria?
6. Se han aislado mutantes de levaduras sensibles a la temperatura que bloquean cada uno de los pasos enzimáticos de la síntesis del precursor oligosacárido dolicol para la glucosilación *N*-ligada. Proponga una explicación por la cual las mutaciones que bloquean las síntesis del intermediario con la estructura dolicol-PP-(GlcNAc)₂Man₅ evi-

ta por completo la adición de cadenas de oligosacáridos *N*-ligadas a las proteínas secretoras, mientras que las mutaciones que bloquean la conversión de este intermediario en el precursor completo –dicol-pp-(GlcNAc)₂Man₅Glc₁– permite la adición de las cadenas de oligosacáridos *N*-ligados a las glucoproteínas secretoras.

7. Nombre 4 proteínas diferentes que facilitan la modificación o el plegamiento de las proteínas secretoras dentro de la luz del RE. Indique cuáles de estas proteínas modifican de modo covalente las proteínas sustrato y cuál lleva a cabo solo cambios de conformación en las proteínas sustrato.

8. Describa qué le ocurriría al precursor de una proteína de la matriz mitocondrial en los siguientes tipos de mutantes mitocondriales: (a) una mutación en el receptor de la señal Tom22; (b) una mutación en el receptor de la señal Tom70; (c) una mutación en la Hsc70 de la matriz y (d) una mutación en la peptidasa señal de la matriz.

9. Describa las similitudes y diferencias entre el mecanismo de importación a la matriz de la mitocondria y del estroma del cloroplasto.

10. Programe un conjunto de experimentos que empleen proteínas quiméricas, compuestas de una proteína precursora mitocondrial fusionada con la dihidrofolato reductasa (DHFR), que podrían utilizarse para determinar cuánta proteína precursora debe sobresalir a la matriz de la mitocondria para que la secuencia de direccionamiento hacia la matriz sea escindida por la proteasa de procesamiento en la matriz.

11. Los peroxisomas contienen enzimas que emplean el oxígeno molecular para oxidar varios sustratos, pero en el proceso se forma peróxido de hidrógeno –un compuesto que puede dañar al DNA y las proteínas–. ¿Cuál es el nombre de la enzima que produce la degradación del peróxido de hidrógeno a agua? ¿Cuál es el mecanismo de importación de esta proteína al peroxisoma y qué proteínas están involucradas?

12. Suponga que ha identificado una nueva línea celular mutante que carece de peroxisomas funcionales. Describa cómo podría determinar experimentalmente si la mutante es primariamente defectuosa para la inserción/ensamblado de proteínas de la membrana del peroxisoma o proteínas de la matriz.

13. ¿La importación nuclear de proteínas superiores a 40 kDa requiere la presencia de qué secuencias de aminoácidos? Describa el mecanismo de importación nuclear. ¿Cómo son capaces los receptores de transporte nuclear de atravesar el complejo de poro nuclear?

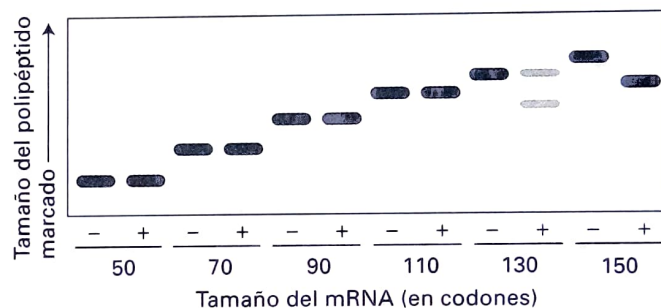
14. ¿Por qué es necesaria la localización de la Ran-GAP en el núcleo y de la Ran-GEF en el citoplasma para el transporte unidireccional de proteínas carga que contengan una SEN?

Análisis de los datos

1. Imagine que está evaluando los pasos iniciales en la translocación y el procesamiento de las proteínas de secreción prolactina. Empleando un enfoque experimental similar al que se muestra en la **Figura 13-7**, puede utilizar mRNA de prolactina truncada para controlar la longitud de los polipéptidos de prolactina naciente que se sintetizan. Cuando el mRNA de prolactina que carece de codón de terminación (detención) se traduce in vitro, la terminación del polipéptido recién sintetizado con el último codón incluido en el mRNA permanecerá

unida al ribosoma; esto permitirá que se extienda un polipéptido de longitud definida desde el ribosoma. Usted ha generado un conjunto de mRNA que codifican segmentos de la porción *N*-terminal de la prolactina con longitud creciente, y cada mRNA puede ser traducido in vitro por un extracto de traducción citosólico que contiene ribosomas, tRNA, aminoacil-tRNA sintetasas, GTP y factores de iniciación de la traducción y de elongación. Cuando se incluyen aminoácidos radiomarcados en la mezcla de traducción, solo el polipéptido codificado por el mRNA añadido estará marcado. Después de completar la traducción, cada mezcla de reacción se separó por electroforesis en gel de poliácridamida-SDS, y los polipéptidos marcados se identificaron por autorradiografía.

a. El autorradiograma que se exhibe más abajo muestra los resultados de un experimento en el cual cada reacción de traducción fue llevada a cabo en presencia (+) o en ausencia (–) de membranas microsomaes. Sobre la base de la movilidad en gel de los péptidos sintetizados, en presencia de microsomas o en ausencia de éstos, deduzca cuál deberá ser la longitud de la cadena naciente de prolactina para que el péptido señal de la prolactina ingrese en la luz de RE y sea segmentado por la peptidasa señal. (Nótese que los microsomas llevan cantidades significativas de PRS unidas débilmente a las membranas.)

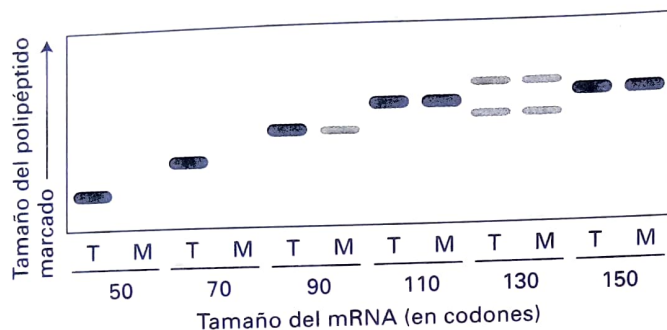


b. Dada esta longitud, ¿qué podría concluir acerca de los estados conformacionales del polipéptido de prolactina naciente cuando se segmenta por acción de una peptidasa señal? Serán útiles las siguientes longitudes para sus cálculos: la secuencia señal de la prolactina se segmenta después del aminoácido 31; el canal dentro del ribosoma, ocupado por un polipéptido naciente, tiene aproximadamente 150 Å; una bicapa de membrana tiene aproximadamente un grosor de 50 Å; en los polipéptidos con conformación helicoidal α , un residuo se extiende 1,5 Å, mientras que en los polipéptidos completamente extendidos, un residuo se extiende aproximadamente 3,5 Å.

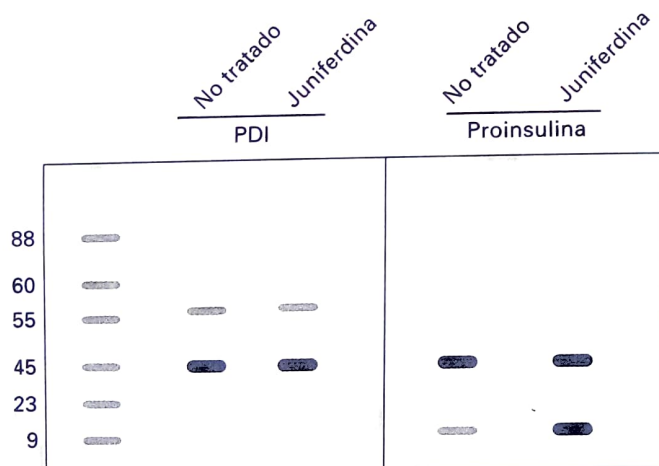
c. El experimento descrito en la parte (a) es llevado a cabo de manera idéntica, excepto porque las membranas microsomaes no están presentes durante la traducción, pero se agregan después de que ésta se ha completado. En este caso, ninguna de las muestras exhibe una diferencia de la movilidad en presencia de microsomas por ausencia de éstos. ¿Qué puede concluir acerca de por qué la prolactina puede ser translocada a los microsomas aislados después de la traducción?

d. En otro experimento, cada reacción de traducción fue llevada a cabo en presencia de microsomas; luego, las membranas de los microsomas y los ribosomas unidos se separaron de los ribosomas libres y de las proteínas solubles por centrifugación. Para cada reacción de

traducción, se separaron tanto la reacción total (T) como la fracción de membrana (M), en carriles vecinos de un gel. Sobre la base de las cantidades de polipéptido marcado en las fracciones de membrana, en la autorradiografía que se muestra más abajo, deduzca qué longitud deberá tener la cadena de prolactina naciente para que los ribosomas comprometidos en la traducción incluyan la PRS y, por lo tanto, se unan a las membranas microsomales.

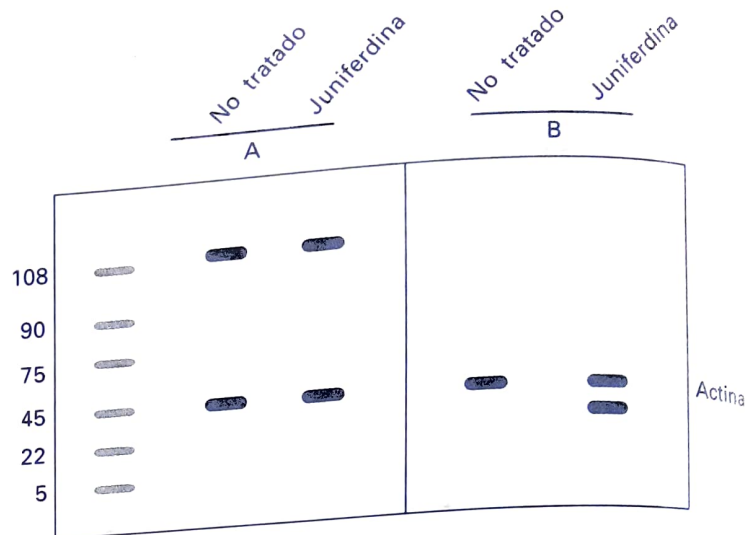


2. Recientemente, los investigadores descubrieron que al tratar las células de mamífero con juniferdina, un compuesto derivado de los vegetales, se afecta la secreción proteica, y han informado que la diana de esta droga es una *proteína disulfuro isomerasa* (PDI). En el siguiente experimento, las células pancreáticas β fueron tratadas con la juniferdina, y los lisados proteicos se aislaron y compararon con lisados de células no tratadas, mediante el análisis de inmunotransferencia. Las sondas de transferencia con anticuerpos contra PDI (57 kDa), actina (43 kDa) y proinsulina (9,8 kDa) muestran lo siguiente:



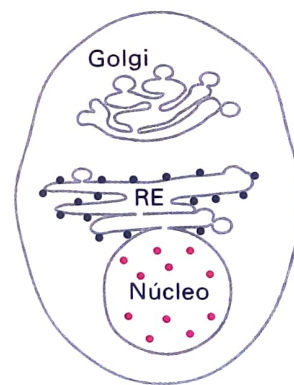
a. Puesto que aproximadamente la misma cantidad de proteínas se cargó en cada carril, como se evidencia por las señales de actina, ¿cómo explicaría el hecho de que los niveles de PDI también aparecen como los mismos, mientras que la mayoría de la proinsulina permanece acumulada en las células tratadas con la juniferdina?

b. Para confirmar sus resultados, se separaron lisados proteicos de células tratadas y no tratadas con juniferdina mediante SDS-PAGE y se transfirieron a membranas; luego, se hicieron pruebas con anticuerpos contra Ire1 y Hac1.



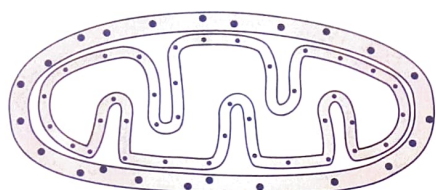
La marca de cada transferencia con el anticuerpo se empleó para el análisis. ¿Cómo explica el incremento en la intensidad de la señal que se observa en las células tratadas con juniferdina en la transferencia B?

c. Un análisis de inmunocitoquímica y microscopia de fluorescencia fue llevado a cabo con el anticuerpo utilizado en la transferencia B y un segundo anticuerpo marcado con rodamina (rojo). Puesto que la juniferdina afecta de modo específico la PDI, una proteína residente en el RE rugoso (RER), ¿cómo explica la localización de la señal en el núcleo?



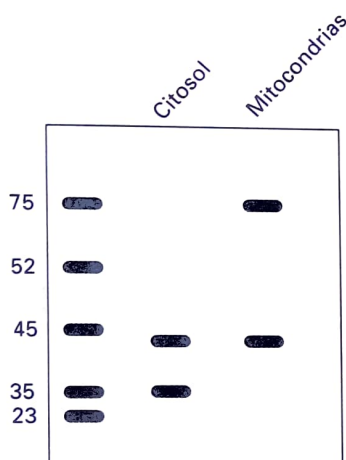
3. El marcaje de las proteínas con anticuerpos, como la empleada en el análisis de inmunofluorescencia, puede aplicarse en microscopia electrónica; pero en lugar de utilizar marcas fluorescentes unidas a los anticuerpos, los investigadores usan partículas de oro que son electródenas y se ven como manchas uniformes en una fotomicrografía electrónica. Más aún, al variar el tamaño de las partículas de oro (p. ej., 5 nm frente a 10 nm), puede identificarse la localización de más de una proteína en la célula.

a. Utilizando este enfoque, los investigadores han determinado la localización subcelular de las proteínas Tim y Tom, empleadas para la importación de proteínas a la mitocondria. En el dibujo de los resultados que aparece más abajo, las marcas de las partículas de oro muestran la localización de Tim44 y Tom40. ¿Qué le haría llegar a estas conclusiones?



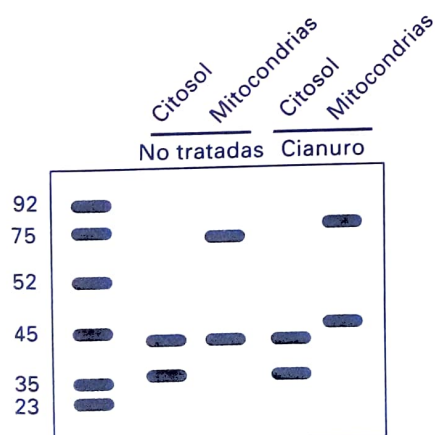
Mitocondria

b. El desarrollo, mediante ingeniería genética, del extremo N-terminal de la deshidrogenasa alcohólica (ADH) en una proteína citosólica altera la localización de dicha proteína. La siguiente transferencia se observó cuando las células se transfectaron con una construcción quimérica de ADH-actina y las proteínas fueron aisladas del citosol y las mitocondrias. Los anticuerpos contra la actina (43 kDa), la proteína citosólica GAPDH (37 kDa) y la proteína de la membrana interna de la mitocondria succinato deshidrogenasa A (72 kDa) se emplearon en el análisis.



¿Cómo explica la presencia de la actina en dos conjuntos subcelulares distintos de proteínas? ¿Cómo explica que haya la misma masa molecular en ambos conjuntos? Si la transferencia fuera cortada y vuelta a ensayar con un anticuerpo contra el extremo N-terminal de la deshidrogenasa alcohólica, ¿dónde esperaría encontrar la señal?

c. El cianuro es tóxico para las células porque inhibe un complejo proteico mitocondrial específico, causante de la producción del ATP. Un experimento como el que se describió más arriba fue repetido, y los resultados se compararon con aquellos para células expuestas al cianuro de hidrógeno. Los siguientes son los resultados del análisis de la inmunotransferencia:



¿Cómo explica el desplazamiento aparente de la masa molecular de la actina en la fracción mitocondrial de las células tratadas con cianuro? Note que hay un desplazamiento similar en la masa de la succinato deshidrogenasa A control. ¿Qué esperaría observar en las transferencias si las células tratadas con cianuro se suplementaran con ATP?

Referencias

Direccionamiento de las proteínas hacia la membrana del RE y a través de ésta

Egea, P. F., R. M. Stroud, and P. Walter. 2005. Targeting proteins to membranes: structure of the signal recognition particle. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 15:213-220.

Osborne, A. R., T. A. Rapoport, and B. van den Berg. 2005. Protein translocation by the Sec61/SecY channel. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 21:529-550.

Wickner, W., and R. Schekman. 2005. Protein translocation across biological membranes. *Science* 310:1452-1456.

Insertión de las proteínas de membrana dentro del RE

Englund, P. T. 1993. The structure and biosynthesis of glyco-sylphosphatidylinositol protein anchors. *Ann. Rev. Biochem.* 62:121-138.

Mothes, W., et al. 1997. Molecular mechanism of membrane protein integration into the endoplasmic reticulum. *Cell* 89:523-533.

Shao, S., and R. S. Hegde. 2011. Membrane protein insertion at the endoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 27:25-56.

Wang, F., et al. 2011. The mechanism of tail-anchored protein insertion into the ER membrane. *Mol. Cell* 43:738-750.

Modificaciones, plegamiento y control de calidad de las proteínas en el RE

Braakman, I., and N. j. Billelid. 2011. Protein folding and modification in the mammalian endoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Biochem.* 80:71-99.

Hegde, R. S., and H. L. Ploegh. 2010. Quality and quantity control at the endoplasmic reticulum. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22:437-446.

Helenius, A., and M. Aebi. 2004. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Ann. Rev. Biochem.* 73:1019-1049.

Kornfeld, R., and S. Kornfeld. 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Ann. Rev. Biochem.* 45:631-664.

Patil, C., and P. Walter. 2001. Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13:349-355.

Meusser, B., et al. 2005. ERAD: the long road to destruction. *Nat. Cell Biol.* 7:766-772.

Sevier, C. S., and C. A. Kaiser. 2002. Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:836-847.

Tsai, B., Y. Ye, and T. A. Rapoport. 2002. Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:246-255.

Direccionamiento de las proteínas hacia las mitocondrias y los cloroplastos

Dalbey, R. E., and A. Kuhn. 2000. Evolutionarily related insertion pathways of bacterial, mitochondrial, and thylakoid membrane proteins. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 16:51-87.

Dolezal, P., et al. 2006. Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria. *Science* 313:314-318.

Koehler, C. M. 2004. New developments in mitochondrial assembly. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 20:309-335.

Li, H.M., and C.-C. Chiu. 2010. Protein transport into chloroplasts. *Ann. Rev. Plant Biol.* **61**:157-180.

Matousehek, A., N. Pfanner, and W. Voos. 2000. Protein unfolding by mitochondria: the Hsp70 import motor. *EMBO Rep.* **1**:404-410.

Neupert, W., and M. Brunner. 2002. The protein import motor of mitochondria. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**:555-565.

Rapaport, D. 2005. How does the TOM complex mediate insertion of precursor proteins into the mitochondrial outer membrane? *J. Cell Biol.* **171**:419-423.

Robinson, C., and A. Bolhuis. 2001. Protein targeting by the twin-arginine translocation pathway. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**:350-356.

Truscott, K. N., K. Brandner, and N. Pfanner. 2003. Mechanisms of protein import into mitochondria. *Curr. Biol.* **13**:R326-R337.

Direccionamiento de las proteínas a los peroxisomas

Dammai, V., and S. Subramani. 2001. The human peroxisomal targeting signal receptor, Pex5p, is translocated into the peroxisomal matrix and recycled to the cytosol. *Cell* **105**:187-196.

Gould, S. J., and C. S. Collins. 2002. Opinion: peroxisomal-protein import: is it really that complex? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**:382-389.

Gould, S. J., and D. Valle. 2000. Peroxisome biogenesis disorders: genetics and cell biology. *Trends Genet.* **16**: 340-345.

Hoepfner, D., et al. 2005. Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation. *Cell* **122**:85-95.

Ma, C., G. Agrawal, and S. Subramani. 2011. Peroxisome assembly: matrix and membrane protein biogenesis. *J. Cell Biol.* **193**:7-16.

Purdue, P. and P. B. Lazaraw. 2001. Peroxisome biogenesis. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**:701-752.

Transporte hacia el interior y el exterior del núcleo

Chook, Y. M., and G. Blobel. 2001. Karyopherins and nuclear import. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **11**:703-715.

Cole, C. N., and J. J. Scarcelli. 2006. Transport of messenger RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**:299-306.

Johnson, A. W., E. Lund, and J. Dahlberg. 2002. Nuclear export of ribosomal subunits. *Trends Biochem. Sci.* **27**:530-585.

Ribbeck, K., and D. Gorlich. 2001. Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *EMBO J.* **20**: 1320-1330.

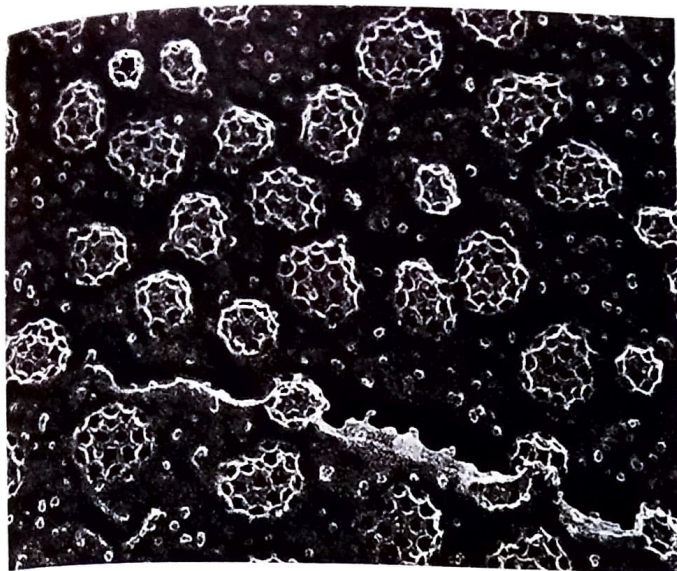
Rout, M. P., and J. D. Aitchison. 2001. The nuclear pore complex as a transport machine. *J. Biol. Chem.* **276**:16593-16596.

Schwartz, T. U. 2005. Modularity within the architecture of the nuclear pore complex. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **15**:221-226.

Stewart, M. 2010. Nuclear export of mRNA. *Trends Biochem. Sci.* **35**:609-617.

Terry, L. J., and S. R. Wenthe. 2009. Flexible gates: dynamic topologies and functions for FG nucleoporins in nucleocytoplasmic transport. *Eukaryot. Cell* **8**:1814-1827.

Tráfico, secreción y endocitosis vesiculares



Microfotografía electrónica de barrido que muestra la formación de vesículas cubiertas de clatrina sobre la cara citosólica de la membrana plasmática. (John Heuser, Washington University School of Medicine)

En el capítulo anterior hemos explorado el modo en que las proteínas se etiquetan y translocan a través de las membranas de varios orgánulos intracelulares que incluyen el retículo endoplasmático, las mitocondrias y los cloroplastos, los peroxisomas y el núcleo. En este capítulo centraremos nuestra atención en la **vía secretora** y en los mecanismos del tránsito vesicular que permiten que las proteínas se secreten desde la célula o lleguen a la membrana plasmática y al lisosoma. También analizaremos los procesos relacionados de la endocitosis y de la autofagia que emplean las proteínas de moléculas pequeñas desde el exterior de la célula o desde el citoplasma hacia el interior del lisosoma para su degradación.

La vía secretora lleva tanto proteínas solubles como proteínas de membrana desde el RE hasta su destino final en la superficie celular o en el lisosoma. Las proteínas entregadas a la membrana plasmática incluyen los receptores de la superficie celular, los transportadores para la captación de nutrientes y los canales iónicos que mantienen el equilibrio iónico y electroquímico adecuado a través de la membrana plasmática. Estas proteínas de membrana, una vez que han alcanzado la membrana plasmática, quedan incrustadas en ella. Las proteínas solubles secretadas también siguen la vía secretora hasta la superficie de la célula, pero, en lugar de quedar insertadas en la membrana, se liberan hasta el ambiente acuoso extracelular. Ejemplos de proteínas secretadas son las enzimas digestivas, las hormonas peptídicas, las proteínas del suero y el colágeno. Como se describió en el Capítulo 9, el lisosoma es un orgánulo con un

interior ácido, empleado, generalmente, para degradar proteínas innecesarias y para almacenar moléculas pequeñas como los aminoácidos. De acuerdo con ello, los tipos de proteínas que llegan a la membrana del lisosoma incluyen las subunidades de la bomba protónica de clase V que bombea H^+ del citosol a la luz ácida del lisosoma, así como los transportadores que liberan moléculas pequeñas almacenadas en el lisosoma al interior del citoplasma. Las proteínas solubles entregadas por esta vía incluyen las enzimas digestivas lisosómicas como proteasas, glucosidasas, fosfatasas y lipasas.

A diferencia de la vía secretora, que permite que las proteínas sean dirigidas a la superficie de la célula, la **vía endocítica** se emplea para captar sustancias desde la superficie de la célula y hacerlas mover hacia su interior. La vía endocítica se emplea para ingerir ciertos nutrientes que son demasiado grandes para ser transportados a través de la membrana plasmática por uno de los mecanismos de transporte analizados en el Capítulo 11; por ejemplo, la vía endocítica se emplea en la captación de colesterol transportado en las partículas de LDL y de los átomos de hierro transportados por la proteína transferrina que une hierro; además, puede emplearse para eliminar proteínas receptoras de la superficie celular como manera de regular negativamente su actividad.

Un principio unificador gobierna todo el movimiento de las proteínas en las vías secretora y endocítica: el transporte de las proteínas de membrana insolubles de un compartimiento limitado por membrana a otro está mediado por **vesículas de transporte** que reúnen

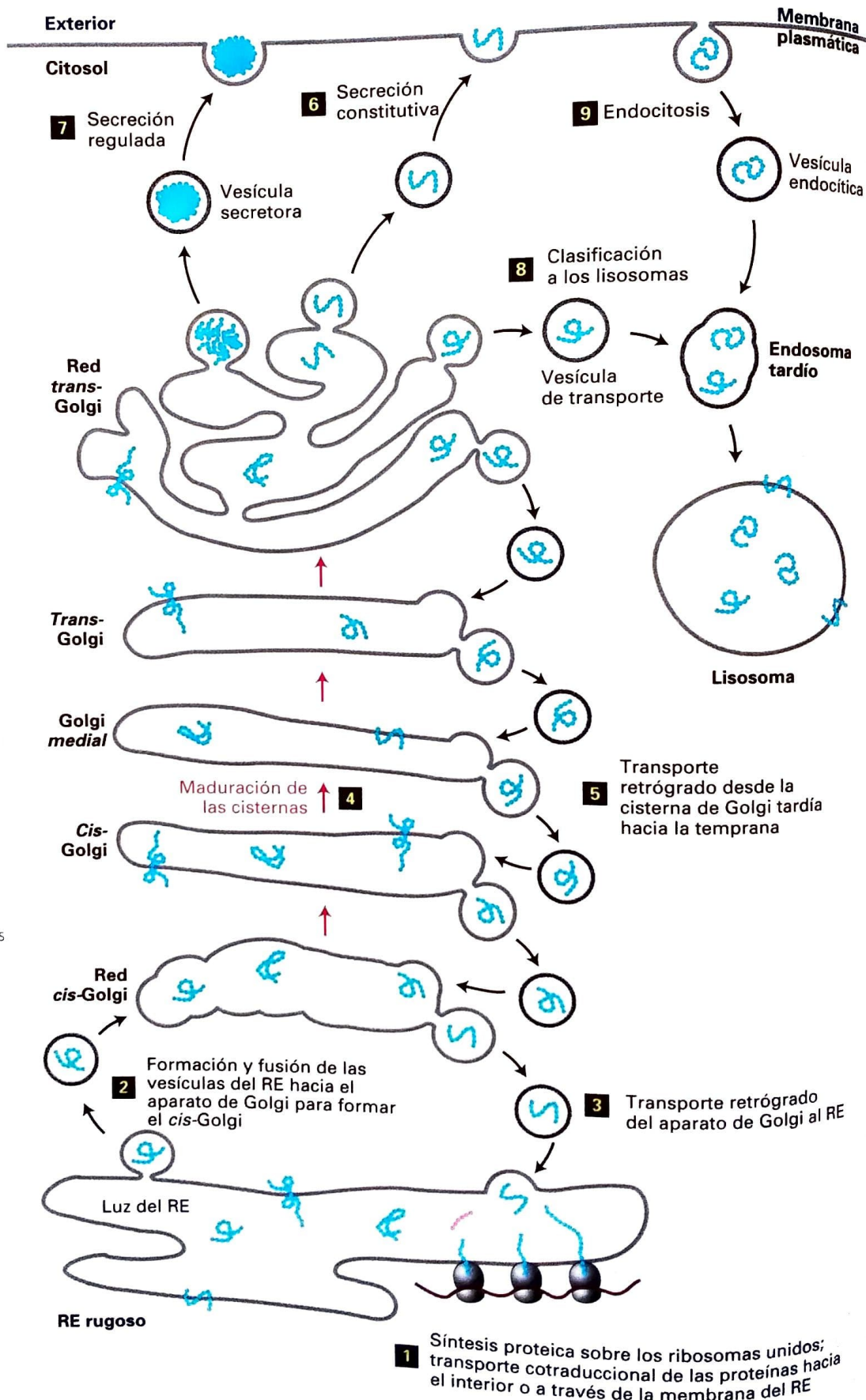
CONTENIDO

14.1 Técnicas para el estudio de la vía secretora	629	14.4 Etapas finales de la vía secretora	646
14.2 Mecanismos moleculares de formación y fusión de las vesículas	634	14.5 Endocitosis mediada por receptor	654
14.3 Etapas iniciales de la vía secretora	640	14.6 Direccionamiento de las proteínas de membrana y materiales citosólicos al lisosoma	661

FIGURA 14-1 Panorama de las vías secretora y endocítica de la clasificación de las proteínas.

Vía secretora: la síntesis de proteínas que llevan una secuencia de señal RE se completa en el RE rugoso **1**, y las cadenas polipeptídicas recién sintetizadas se insertan en la membrana del RE o lo atraviesan por la luz (Cap. 13). Algunas proteínas (p. ej., las enzimas del RE o las proteínas estructurales) permanecen dentro del RE. Las restantes se empaquetan en vesículas de transporte **2** que brotan desde el RE y se fusionan para formar nuevas cisternas *cis*-Golgi. Las proteínas residentes del RE mal clasificadas y las proteínas de las vesículas de la membrana que requieren ser reutilizadas son recuperadas al RE por vesículas **3** que brotan desde el *cis*-Golgi y se fusionan con el RE. Cada cisterna del *cis*-Golgi, con su contenido proteico, se mueve físicamente desde la cara *cis* hacia la cara *trans* del complejo de Golgi **4** por un proceso sin vesículas llamado maduración de la cisterna. Las vesículas de transporte retrógrado **5** mueven las proteínas residentes en el aparato de Golgi al compartimiento adecuado en él. En todas las células, ciertas proteínas solubles se mueven a la superficie de la célula en vesículas de transporte **6** que se secretan continuamente (secreción constitutiva). En ciertos tipos celulares, algunas proteínas solubles son almacenadas en vesículas secretoras **7** que son liberadas solo después de que la célula recibe una señal neural u hormonal apropiada (secreción regulada). Las proteínas de membrana destinadas a los lisosomas y aquellas solubles que son transportadas en vesículas, que brotan desde el *trans*-Golgi **8**, se mueven primero al endosoma tardío y, luego, al lisosoma.

Vía endocítica: las proteínas de membrana y extracelulares solubles captadas en vesículas que brotan desde la membrana plasmática **9** también pueden moverse al lisosoma vía el endosoma.



las proteínas “carga” en vesículas que surgen de las membranas de un compartimiento y, luego, entregan estas proteínas carga al compartimiento siguiente al fusionarse con la membrana de ese compartimiento. Es importante destacar que, a medida que las vesículas de transporte forman brotes desde una membrana y se fusionan con la siguiente, la misma cara de la membrana permanece orientada hacia el citosol; por lo tanto, una vez que una proteína se ha insertado en la membrana o en la luz del RE puede ser llevada a lo largo de toda la vía secretora moviéndose de un orgánulo al siguiente sin ser translocada a través de otra membrana ni alterar su orientación dentro de ella. De modo similar, la vía endocítica emplea el tránsito de vesículas para transportar las proteínas de la membrana plasmática al endosoma y al lisosoma, y preserva, de esta manera, su orientación en la membrana de estos orgánulos. La Figura 14-1 muestra las vías secretoras y endocíticas principales de la célula.

Reducida a sus elementos más simples, la vía secretora opera en dos etapas. La primera de ellas ocurre en el retículo endoplasmático rugoso (RE) (Fig. 14-1, paso 1). Como se describió en el Capítulo 13, las proteínas solubles y de membrana recién sintetizadas se translocan dentro del RE, donde se pliegan en su conformación adecuada y se modifican covalentemente por la adición de hidratos de carbono ligados al N o al O y por puentes disulfuro. Una vez que las proteínas recién sintetizadas se han plegado adecuadamente y han recibido sus modificaciones correctas en la luz del RE, avanzan a la segunda etapa de la vía de secreción y se transportan hacia el aparato de Golgi y a través de él.

La segunda etapa de la vía secretora puede ser resumida de la siguiente manera: en el RE, las proteínas carga son empaquetadas en vesículas anterógradas (que se mueven hacia adelante) (Fig. 14-1, paso 2). Estas vesículas se fusionan para formar un compartimiento aplanado, limitado por membrana, conocido como red *cis*-Golgi o **cisterna cis-Golgi** (una cisterna es un contenedor de agua o de otro líquido). Ciertas proteínas, principalmente las proteínas que funcionan en el RE, pueden recuperarse de la cisterna *cis*-Golgi al RE por medio de un conjunto distinto de vesículas de transporte retrógradas (que se mueven hacia atrás) (paso 3). De una forma que asemeja una línea de ensamblaje, una nueva cisterna *cis*-Golgi con sus proteínas carga se mueve físicamente de la posición *cis* (la más cercana al RE) a la posición *trans* (la más distante al RE), volviéndose sucesivamente, en primer lugar, una cisterna de Golgi *medial* y, luego, una cisterna de Golgi *trans* (paso 4). Este proceso, conocido como *maduración de la cisterna*, implica primariamente vesículas de transporte retrógradas (paso 5) que mueven enzimas y otras proteínas residentes en el aparato de Golgi de cisternas tardías a cisternas tempranas de Golgi, “madurando”, por lo tanto, las *cis*-Golgi a Golgi *medial* y las Golgi *medial* a Golgi *trans*. A medida que las proteínas que serán secretadas se mueven a través del aparato de Golgi, pueden recibir modificaciones adicionales con hidratos de carbono unidos por glucosilo-transferasas que se encuentran albergadas en diferentes compartimientos del aparato de Golgi.

Las proteínas de la vía secretora pasan, finalmente, a una red compleja de membranas y vesículas llamada **red trans-Golgi (RTG)**. La RTG es un punto de ramificación central en la vía secretora. En este punto, las proteínas se cargan en diferentes tipos de vesículas y, por lo tanto, se dirigen a distintos destinos. Dependiendo del tipo de vesícula en el que se cargue la proteína, esta será transportada a la membrana plasmática y secretada de inmediato, almacenada para su liberación posterior o dirigida al lisosoma (pasos 6-8). El proceso

por el cual una vesícula se mueve hacia la membrana plasmática y se fusiona con ella liberando su contenido se conoce como **exocitosis**. En todos los tipos celulares, al menos algunas proteínas se secretan continuamente, mientras que otras se almacenan dentro de la célula hasta que una señal de exocitosis provoca su liberación. Las proteínas secretoras destinadas a los lisosomas son transportadas, primero, por vesículas desde la red *trans*-Golgi hasta un compartimiento, llamado habitualmente **endosoma tardío**; luego, las proteínas se transfieren al lisosoma por fusión directa del endosoma con la membrana del lisosoma.

La **endocitosis** se relaciona mecánicamente con la vía de secreción. En la vía endocítica, las vesículas brotan hacia el interior desde la membrana plasmática trayendo hacia el interior de la célula proteínas de membrana y sus ligandos unidos (véase la Fig. 14-1, *derecha*). Después de internalizarse por endocitosis, algunas proteínas se transportan a los lisosomas por medio del endosoma tardío, mientras que otras son recicladas nuevamente a la superficie celular.

En este capítulo analizaremos, primero, las técnicas experimentales que han contribuido a nuestro conocimiento de la vía secretora y de la endocitosis. Nos enfocaremos, luego, en los mecanismos generales de la formación de vesículas de membrana y de su fusión. Después veremos que, aunque diferentes tipos de vesículas de transporte utilizan diferentes conjuntos de proteínas para su formación y su fusión, todas ellas emplean el mismo mecanismo general para brotar, seleccionar conjuntos particulares de moléculas carga y fusionarse con la membrana diamina apropiada. En las secciones restantes del capítulo analizaremos los estadios temprano y tardío de la vía de secreción, incluyendo el modo en que la especificidad de la selección de los diferentes destinos se logra, y concluiremos con un debate acerca del modo en que las proteínas se transportan hacia los lisosomas mediante la vía endocítica.

14.1 Técnicas para el estudio de la vía secretora

La clave para comprender el modo en que se transportan las proteínas a través de los orgánulos de la vía secretora ha sido desarrollar una descripción básica de la función de las vesículas de transporte. Muchos componentes requeridos para la formación y la fusión de las vesículas de transporte se han identificado en la década pasada por la notable convergencia de los enfoques genético y bioquímico, que se describirán en esta sección. Todos los estudios del movimiento intracelular de proteínas emplean algún método para ensayar el transporte de una proteína dada desde un compartimiento hacia otro. Comenzaremos por describir el modo en que puede hacerse el seguimiento del transporte intracelular de las proteínas en las células vivas, y consideraremos luego los sistemas genéticos *in vitro*, que han mostrado ser útiles para dilucidar la vía secretora.

El transporte de una proteína a través de la vía secretora puede ser ensayado en las células vivas

Los estudios clásicos de G. Palade y sus colegas en la década de 1960 establecieron inicialmente el orden en el cual se mueven las proteínas desde un orgánulo hasta el siguiente en la vía secretora. Estos estudios pioneros mostraron también que las proteínas secretoras nunca se liberan al citosol, la primera indicación de que las proteínas transporta-

das siempre están asociadas con algún tipo de intermediario limitado por membrana. En estos experimentos, que combinaron el marcado de pulso y caza (véase la Fig. 3-40) y la autorradiografía, aminoácidos marcados radiactivamente se inyectaron en páncreas de hámsteres. En diferentes momentos, después de la inyección, los animales fueron sacrificados y las células pancreáticas fueron fijadas de inmediato con glutaral, cortadas y sometidas a autorradiografía para visualizar la localización de las proteínas radiomarcadas. Dado que los aminoácidos radiactivos se administraron en un pulso corto, solo aquellas proteínas sintetizadas inmediatamente después de la inyección estaban marcadas, formando una cohorte distintiva de proteínas marcadas cuyo transporte podía ser detectado; además, dado que las células acinosas pancreáticas son células dedicadas a la secreción, casi todos los aminoácidos marcados de estas células se incorporaron a proteínas que serían secretadas, lo cual facilitó la observación de las proteínas transportadas.

Si bien la autorradiografía se emplea actualmente en raras ocasiones para localizar proteínas en el interior de las células, estos experimentos iniciales ilustraron los dos requisitos básicos para cualquier ensayo de transporte intercompartimental. En primer lugar, es necesario marcar una cohorte de proteínas en un compartimiento inicial de modo tal que su posterior transferencia a compartimientos posteriores pueda ser seguida en el tiempo. En segundo término, es necesario tener un modo de identificar el compartimiento en el cual reside una proteína marcada. Aquí describimos dos procedimientos experimentales modernos para observar el tránsito intracelular de una proteína que sería secretada en casi cualquier tipo celular.

En ambos procedimientos, un gen que codifica una glucoproteína de membrana abundante (la proteína G) del virus de la estomatitis vesicular (VSV) se introdujo a un cultivo de células de mamífero por transfección o, simplemente, infectando las células con el virus. Las células

tratadas, aun si no están especializadas para la secreción, sintetizan rápidamente la proteína G del VSV en el RE como proteínas de secreción celular normal. El uso de un mutante que codifica una proteína G del VSV sensible a la temperatura permite a los investigadores activar el transporte posterior de esta proteína o desactivarlo. A la temperatura restrictiva de 40 °C, la proteína G del VSV recién sintetizada estará mal plegada y, por lo tanto, quedará retenida dentro del RE por los mecanismos de control de calidad analizados en el Capítulo 13, mientras que a la temperatura permisiva de 32 °C, la proteína estará plegada correctamente y se transportará a través de la vía secretora a la superficie de la célula. Es importante considerar que el plegamiento inadecuado de la proteína G del VSV sensible a la temperatura es reversible; así, si las células que sintetizan la proteína G del VSV mutante se hacen crecer a 40 °C y, luego, se cambian a 32 °C, la proteína G mutante de VSV mal plegada que se había acumulado en el RE volverá a plegarse y se transportará normalmente. Este uso inteligente de una mutación sensible a la temperatura define, en efecto, una cohorte proteica cuyo transporte posterior puede seguirse.

En dos variaciones de este procedimiento básico, el transporte de la proteína G del VSV es monitorizado mediante técnicas diferentes. Tanto los estudios que emplearon estos ensayos de seguimiento del tránsito modernos como los experimentos iniciales de Palade llegaron a la misma conclusión: en las células de mamífero, el transporte de una molécula de proteína mediado por vesículas desde su sitio de síntesis en el RE rugoso hasta su llegada a la membrana plasmática consume entre treinta y sesenta minutos.

La microscopía de la proteína G del VSV marcada con PFV Un enfoque empleado para observar el transporte de la proteína G del VSV emplea un gen híbrido en el cual el gen del virus se fusiona con un gen que codifica para la *proteína fluorescente verde (PFV)*, una protei-

VIDEO: Transporte de la PFV del VSVG a través de la vía secretora

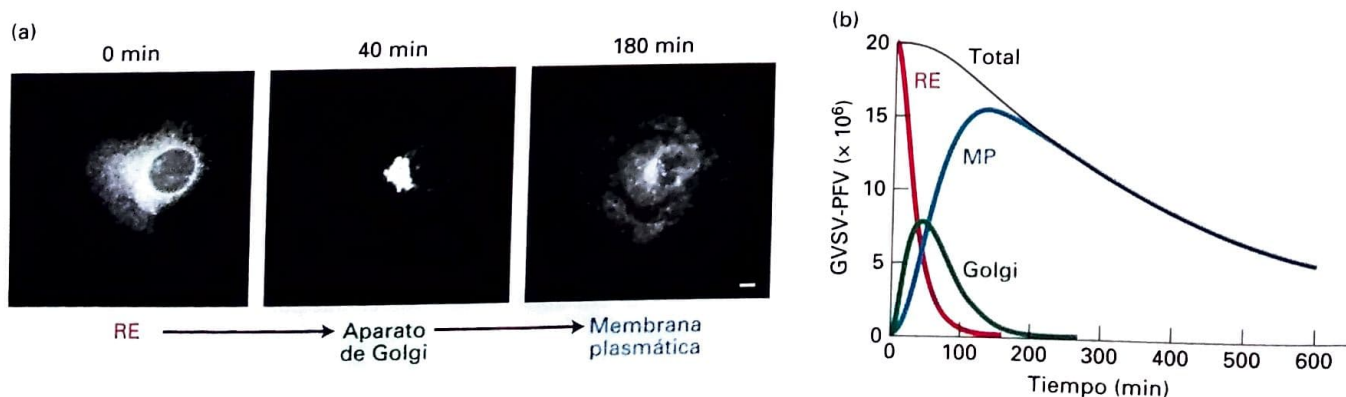


FIGURA EXPERIMENTAL 14-2 El transporte de proteínas a través de la vía secretora puede verse mediante la microscopía de fluorescencia de las células que producen la proteína de membrana marcada con la PFV. Las células cultivadas fueron transfectadas con un gen híbrido que codifica la glucoproteína de la membrana del virus VSV G ligada al gen para la proteína fluorescente verde (PFV). Una versión mutante del gen del virus se usó de modo tal que la proteína híbrida recién sintetizada (VSVG-PFV) quedaba retenida en el RE a 40 °C pero se liberaba para el transporte a 32 °C. (a) Microfotografías de fluorescencia de las células justo antes y en dos ocasiones después de haber sido cambiadas a la temperatura más baja. El movimiento

de la VSVG-PFV del RE al aparato de Golgi y, finalmente, a la superficie celular ocurrió en 180 minutos. La barra de la escala es de 5 μ m. (b) Gráfica de los niveles de VSVG-PFV en el retículo endoplasmático (RE), el aparato de Golgi y la membrana plasmática (MP) en diferentes momentos después del paso a la temperatura más baja. La cinética de transporte de un orgánulo a otro puede reconstruirse a partir de un análisis por computadora de estos datos. El descenso en la fluorescencia total que se produce en momentos posteriores probablemente resulte de la lenta inactivación de la fluorescencia de la PFV. (Tomada de Jennifer Lippincott-Schwartz y Koret Hirschberg, Metabolism Branch, National Institute of Child Health and Human Development).

na fluorescente natural (Cap. 9). El gen híbrido se transfecta a células cultivadas mediante las técnicas descritas en el Capítulo 5. Cuando las células que expresan la forma de la proteína híbrida sensible a la temperatura (VSVG-PFV) se hacen crecer a temperatura restrictiva se acumula la VSVG-PFV en el RE, donde aparece como una red de encaje de membranas cuando se observan las células en un microscopio de fluorescencia. Luego, cuando las células se cambian a una temperatura permisiva, puede verse que la VSVG-PFV se mueve primero a las membranas del aparato de Golgi que están densamente concentradas en el borde del núcleo y, luego, a la superficie celular (Fig. 14-2a). Al observar la distribución de la VSVG-PFV en diferentes momentos después de cambiar las células a temperatura permisiva, los investigadores han determinado durante cuánto tiempo la VSVG-PFV permanece en cada orgánulo de la vía de secreción (Fig. 14-2b).

Detección de las modificaciones con oligosacáridos específicos en compartimientos Una segunda manera de seguir el transporte de las proteínas que serán secretadas aprovecha las modificaciones de las cadenas laterales de hidratos de carbono que se producen en diferentes etapas de la vía secretora. Para comprender este enfoque, recuer-

dese que muchas proteínas secretadas que dejan el RE contienen una copia o más del oligosacárido unido a N $\text{Man}_8(\text{GlcNAc})_2$, que es sintetizado y unido a las proteínas que serán secretadas en el RE (véase la Fig. 13-18). A medida que la proteína se mueve a través del complejo Fig. 13-18). A medida que la proteína se mueve a través del complejo *cis*, de Golgi, diferentes enzimas localizadas en las cisternas de Golgi *cis*, *medial* y *trans* catalizan una serie ordenada de reacciones a estas cadenas centrales de $\text{Man}_8(\text{GlcNAc})_2$, según se analizará en la última sección de este capítulo; por ejemplo, las glucosidasas que residen específicamente en el compartimiento *cis*-Golgi secuencialmente cortan los residuos de manosa del oligosacárido central para producir una forma "recortada", la $\text{Man}_5(\text{GlcNAc})_2$. Los científicos pueden emplear una enzima especializada que escinde hidratos de carbono, conocida como endoglucosidasa D, para distinguir las proteínas glucosiladas que permanecen en el RE de aquellas que han entrado al *cis*-Golgi: los oligosacáridos *cis*-Golgi específicos recortados son separados de las proteínas por la endoglucosidasa D, mientras que los oligosacáridos centrales (no recortados) de las proteínas de secreción que se encuentran dentro del RE son resistentes a la escisión que realiza esta enzima (Fig. 14-3a). Dado que una proteína desglucosilada producida por la digestión de la endoglucosidasa D se mueve más rápido en un gel

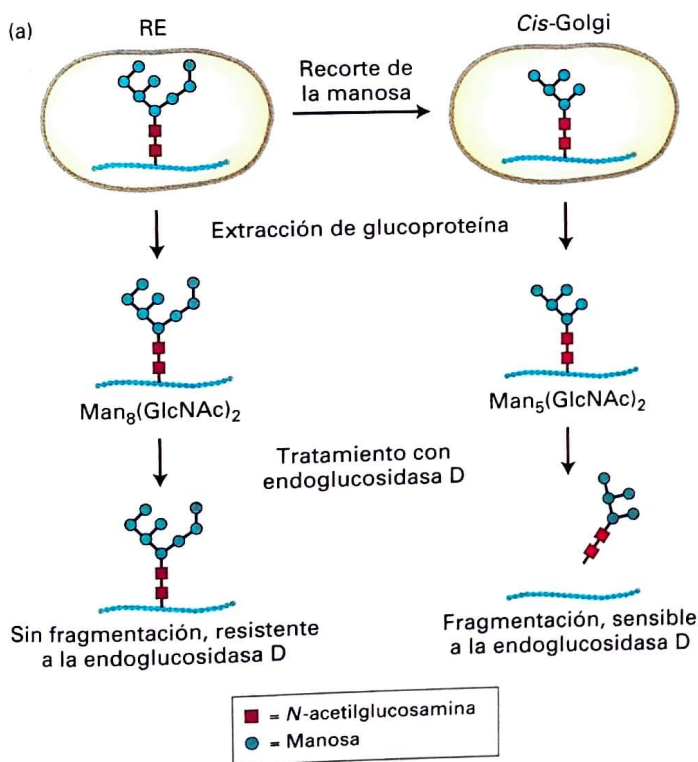
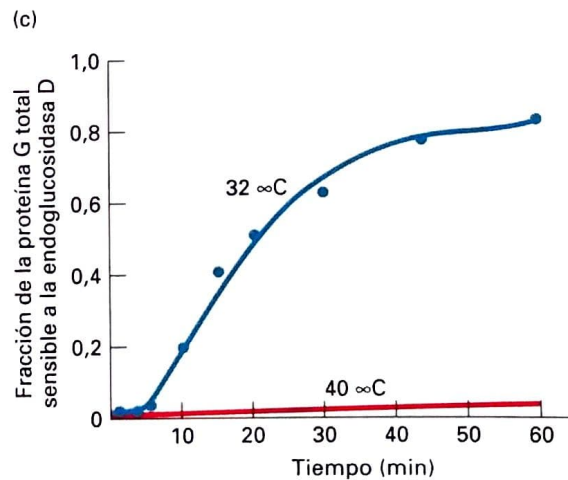
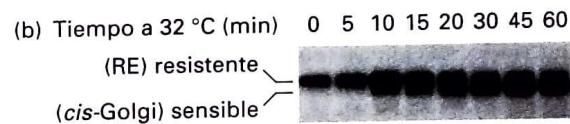


FIGURA EXPERIMENTAL 14-3 El transporte de una glucoproteína de membrana del RE al aparato de Golgi puede ser analizado sobre la base de su sensibilidad al corte por la endoglucosidasa D. Las células que expresan una proteína G del VSV sensible a la temperatura (VSVG) fueron marcadas con un pulso de aminoácidos radiactivos a la temperatura no permisiva, de modo tal que la proteína marcada se retuvo en el RE. A tiempos periódicos después del retorno a la temperatura permisiva de 32 °C, la VSVG se extrajo de las células y se digirió con la endoglucosidasa D. (a) A medida que las proteínas se mueven al *cis*-Golgi desde el RE, el oligosacárido central $\text{Man}_8(\text{GlcNAc})_2$ es recortado a $\text{Man}_5(\text{GlcNAc})_2$ por enzimas que residen en el compartimiento *cis*-Golgi. La endoglucosidasa D corta cadenas de oligosacáridos de las proteínas procesadas en el *cis*-Golgi, pero no de las



proteínas en el RE. (b) Electroforesis en gel SDS de la mezcla de digestión que resuelve las formas resistente, no escindida (de migración más lenta) y sensible, escindida (de migración más rápida) de la VSVG marcada. Como muestra el electrofotograma, inicialmente toda la VSVG era resistente a la digestión, pero, con el tiempo, una mayor fracción fue sensible a la digestión, reflejando la proteína que se transportó del RE al aparato de Golgi y se procesó en él. En las células control, mantenidas a 40 °C, solo la VSV de movimiento lento resistente a la digestión se detectó después de 60 minutos (no se muestra). (c) Gráfico de la proporción de VSVG que es sensible a la digestión derivada de los datos electroforéticos que revela el curso temporal del transporte RE → Golgi. (De C. J. Beckers y cols., 1987, *Cell*, 50:523).

Este tipo de ensayo puede emplearse para rastrear el movimiento de la proteína G del VSV en células infectadas por virus mediante pulsos de marcaje con aminoácidos radiactivos. Inmediatamente después del marcado, todas las proteínas G marcadas del VSV aún se encontrarán en el RE, y en el momento de la extracción serán resistentes a la digestión por la endoglucosidasa D, pero, con el tiempo, la fracción de la glucoproteína extraída sensible a la digestión aumentará. Esta conversión de la proteína G del VSV de una forma resistente a la endoglucosidasa D a una forma sensible a esta enzima corresponde al transporte vesicular de la proteína desde el RE hasta el *cis*-Golgi. Nótese que el transporte de la proteína G del VSV del RE al aparato de Golgi consume aproximadamente treinta minutos, según fue medido por el ensayo basado en el procesamiento de oligosacáridos o de acuerdo con la microscopia de fluorescencia hecha de la VSVG-PFV (Fig. 14-3c). Se han desarrollado una diversidad de ensayos basados en modificaciones específicas de los hidratos de carbono que ocurren en compartimientos tardíos del aparato de Golgi para medir la progresión de la proteína G del VSV a través de cada etapa del aparato de Golgi.

Los mutantes de levaduras definen etapas principales y muchos componentes del transporte de las vesículas

La organización general de la vía secretora y muchos de los componentes moleculares requeridos para el transporte de las vesículas son similares en todas las células eucariontes. Dada esta conservación, los estudios genéticos con levaduras han resultado de utilidad para confirmar la secuencia de pasos de la vía secretora y para identificar muchas de las proteínas que participan en el tránsito vesicular. Si bien las levaduras secretan pocas proteínas en el medio de crecimiento, continuamente secretan varias enzimas que permanecen en el estrecho espacio entre la

Un gran número de levaduras mutantes se han obtenido recientemente sobre la base de su capacidad para secretar proteínas a una temperatura y su incapacidad de hacerlo a otra temperatura más elevada, no permisiva. Cuando estas *mutantes de secreción (sec)* se transfieren desde la temperatura más baja hacia la más alta acumulan proteínas de secreción en el punto de la vía bloqueada por la mutación. El análisis de estas mutantes identificó cinco clases (A-E), caracterizadas por la acumulación de proteína en el citosol, el RE rugoso, pequeñas vesículas que llevaban proteínas del RE al complejo de Golgi, cisternas de Golgi o vesículas de secreción constitutivas (Fig. 14-4). La caracterización ulterior de las mutantes *sec* en las diferentes clases ha ayudado a elucidar los componentes fundamentales y los mecanismos moleculares del movimiento de las vesículas que analizaremos en secciones posteriores.

Para determinar el orden de los pasos en la vía, los investigadores analizaron mutantes dobles *sec*; por ejemplo, cuando las levaduras contienen mutaciones en las funciones de clase D tanto como en las de clase B, se acumulan proteínas en el RE rugoso, no en las cisternas de Golgi. Dado que las proteínas se acumulan en el paso bloqueado más temprano, este hallazgo muestra que las mutaciones de clase B deben actuar en un punto anterior en la vía de secreción que las mutaciones de clase D. Estos estudios confirmaron que a medida que las proteínas secretadas se sintetizan y procesan, se mueven secuencialmente: citosol → RE rugoso → RE a vesículas de transporte del aparato de Golgi → cisternas de Golgi → vesículas de secreción y, finalmente, exocitosis.

Los tres métodos que se describen en esta sección han delineado los pasos principales de la vía secretora y han contribuido a la identificación de muchas de las proteínas responsables de la formación de vesículas y de su fusión. En la actualidad, cada uno de los pasos individuales de la vía secretora se estudia en detalle mecánico, y, cada vez más, se emplean ensayos bioquímicos y de genética molecular para estudiar cada uno de estos pasos en términos de la función de las moléculas proteicas individuales.

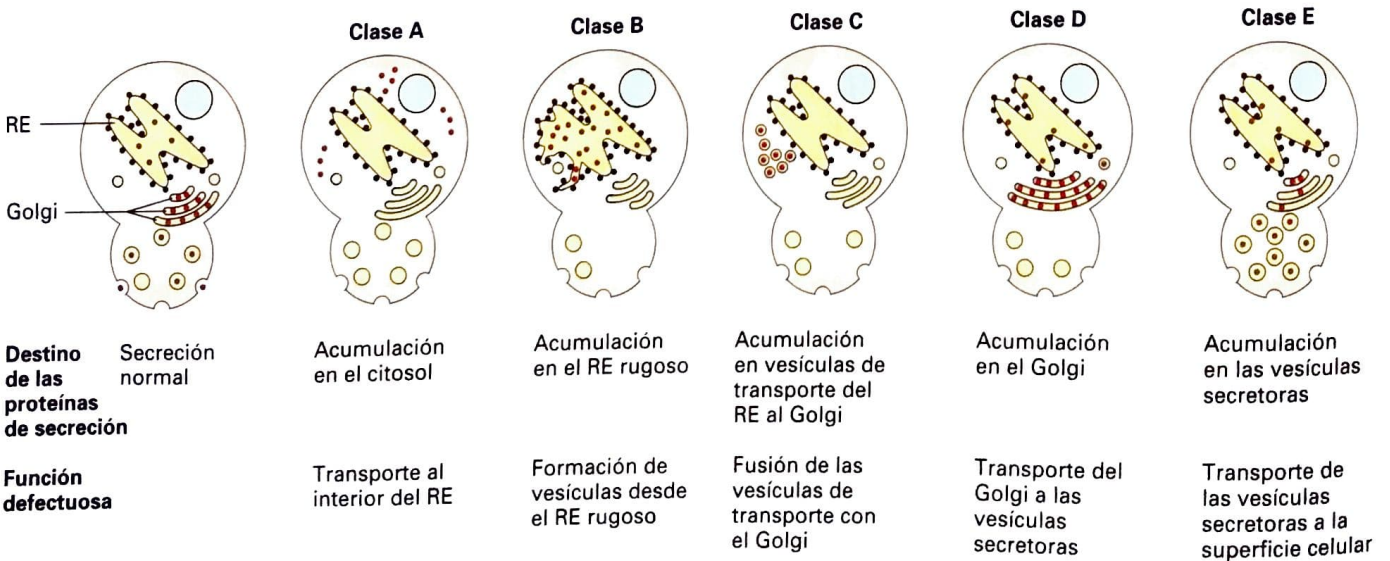


FIGURA EXPERIMENTAL 14-4 Fenotipos de las mutantes *sec* de las levaduras que identifican cinco etapas de la vía de secreción. Estos mutantes sensibles a la temperatura pueden agruparse en cinco clases, de acuerdo con el sitio en que se acumulan las proteínas por ser secretadas recién

Intetizadas (puntos rojos) cuando las células se cambian de la temperatura permisiva a la temperatura más elevada, no permisiva. El análisis de los mutantes dobles permitió que se determinara el orden secuencial de los pasos. (Véase P. Nowicki et cols., 1981, *Cell* **25**:461, y C. A. Kaiser y R. Schekman, 1990, *Cell* **61**:723).

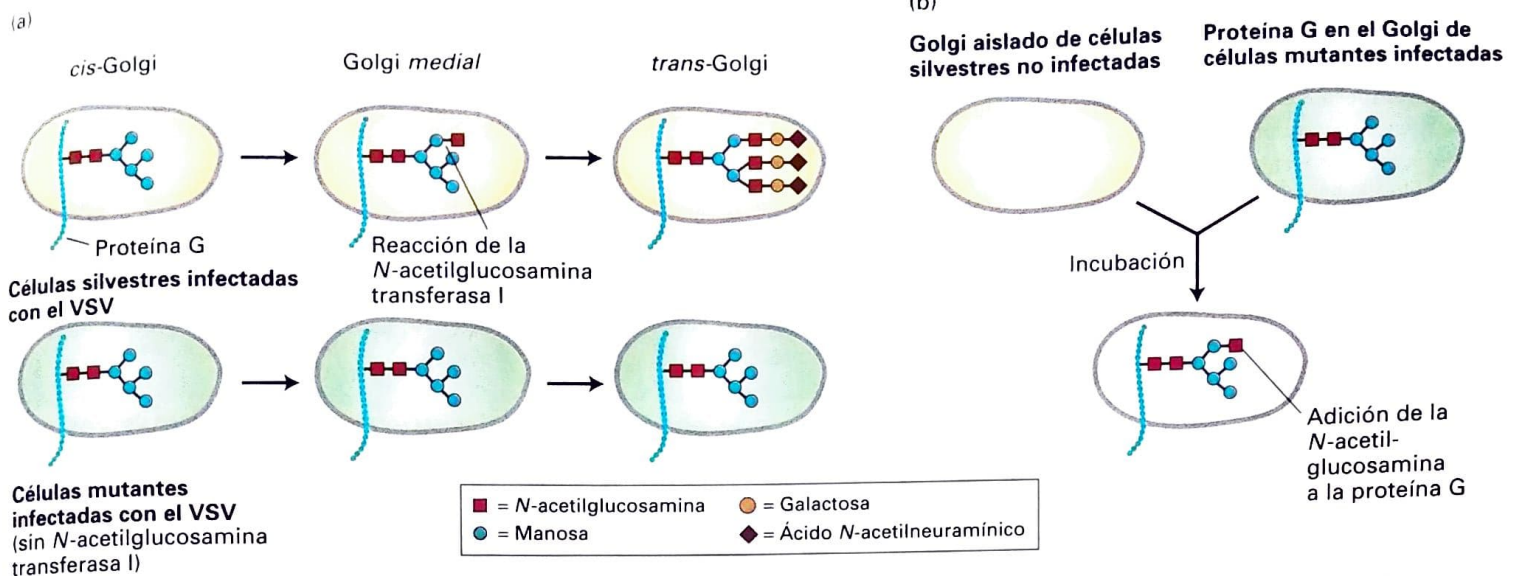


FIGURA EXPERIMENTAL 14-5 Un ensayo libre de células demuestra el transporte de proteínas de una cisterna de Golgi a otra. (a) Una línea mutante de fibroblastos en cultivo es esencial en este tipo de ensayo. En este ejemplo, las células carecen de la enzima *N*-acetilglucosamina transferasa I (paso 2 de la Fig. 14-14). En las células silvestres, esta enzima se localiza en el Golgi *medial* y modifica los oligosacáridos unidos a N por la adición de una *N*-acetilglucosamina. En las células silvestres infectadas con VSV, el oligosacárido que se encuentra en la proteína G viral se modifica a un oligosacárido complejo típico, según se muestra en el panel *trans*-Golgi; sin embargo, en las células mutantes infectadas la proteína G llega a la superficie

con un oligosacárido de alta manosa más simple, que contiene solo dos residuos de *N*-acetilglucosamina y cinco residuos de manosa. (b) Cuando las cisternas de Golgi aisladas de las células mutantes infectadas se incuban con las cisternas de Golgi de células normales no infectadas, la proteína G del VSV producida *in vitro* contiene la *N*-acetilglucosamina adicional. Esta modificación es llevada a cabo por la enzima transferasa que es desplazada por las vesículas de transporte desde las cisternas del Golgi *medial* tipo silvestre hacia las cisternas del *cis*-Golgi mutante de la mezcla de reacción. (Véanse W. E. Balch y cols., 1984, *Cell* **39**:405 y 525, W. A. Braell y cols., 1984, *Cell* **39**:511, y J. E. Rothman y T. Sollner, 1997, *Science* **276**:1212)

Los ensayos de transporte libre de células permiten la disección de los pasos individuales en el transporte de vesículas

Los ensayos *in vitro* sobre transporte intercompartimental son poderosos enfoques complementarios a los estudios con mutantes *sec* de levaduras para identificar y analizar los componentes celulares responsables del tráfico de vesículas. En una aplicación de este enfoque, las células mutantes cultivadas carentes de una de las enzimas que modifican las cadenas laterales de oligosacáridos unidas al extremo N-terminal en el aparato de Golgi se infectan con virus de la estomatitis vesicular (VSV) y se hace un seguimiento del destino de la proteína G del VSV; por ejemplo, si las células infectadas carecen de la transferasa I de la *N*-acetilglucosamina producen cantidades abundantes de la proteína G del VSV, pero no pueden añadir *N*-acetilglucosamina a las cadenas de oligosacáridos en el Golgi *medial* tal como lo hacen las células silvestres (Fig. 14-5a). Cuando las membranas de Golgi aisladas de estas células mutantes se mezclan con membranas celulares del aparato de Golgi de células silvestres no infectadas, la adición de la *N*-acetilglucosamina a la proteína G del VSV se restablece (Fig. 14-5b). Esta modificación es consecuencia del transporte vesicular de la *N*-acetilglucosamina transferasa I del Golgi *medial* de tipo silvestre al Golgi *cis* aislado de células mutantes infectadas por el virus. El transporte intercompartimental exitoso en este sistema libre de células depende de los requerimientos típicos de un proceso fisiológico normal, que incluyen un extracto citosólico, una fuente de energía química en forma de ATP y de GTP y la incubación a temperaturas fisiológicas.

Además, en condiciones apropiadas, una población uniforme de vesículas de transporte que mueven la *N*-acetilglucosamina transferasa

I del Golgi *medial* al *cis* puede purificarse de las membranas de Golgi donante de tipo silvestre por centrifugación. Al examinar las proteínas enriquecidas en estas vesículas, los científicos han podido identificar muchas de las proteínas integrales de membrana y de las proteínas de cubierta de vesícula periféricas que son componentes estructurales de este tipo de vesícula. Más aún, el fraccionamiento de los extractos citosólicos requeridos para el transporte en las mezclas de reacción libres de células ha permitido aislar varias proteínas requeridas para la formación de las vesículas de transporte y de las proteínas necesarias para el direccionamiento y la fusión de las vesículas con las membranas aceptoras apropiadas. Ensayos *in vitro* similares, en diseño general, al que se muestra en la Figura 14-5 se han empleado para estudiar varios pasos de transporte en la vía secretora.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 14.1

Técnicas para el estudio de la vía secretora

- Todos los ensayos para seguir el tránsito de proteínas a través de la vía secretora en las células vivas requieren un modo de marcar una cohorte de proteínas secretoras y una forma de identificar los compartimientos en los que las proteínas marcadas se localizan posteriormente.
- El marcado en pulso con aminoácidos radioactivos puede marcar de modo específico una cohorte de proteínas recién sintetizadas en el RE. Alternativamente, una proteína mutante sensible a la temperatura retenida en el RE debido al plegamiento incorrecto a temperatura no

permisiva será liberada como una cohorte para el transporte cuando las células se desplacen a temperatura permisiva.

- El transporte de una proteína marcada con fluorescencia a lo largo de la vía secretora puede ser observado por microscopía (véase la Fig. 14-2). El transporte de una proteína radiomarcada, por lo común, es seguido mediante modificaciones covalentes específicas del compartimiento a la proteína.

- Muchos de los componentes necesarios para el tránsito de proteínas intracelulares se identificaron en las levaduras analizando los mutantes *sec* sensibles a la temperatura, defectuosos para la secreción de proteínas a temperatura no permisiva (véase la Fig. 14-4).

- Los ensayos libres de células para el transporte intercompartimental de proteínas han permitido la disección bioquímica de los pasos individuales de la vía secretora. Estas reacciones *in vitro* pueden emplearse para producir vesículas de transporte puras y para probar la función bioquímica de las proteínas de transporte individuales.

14.2 Mecanismos moleculares de formación y fusión de las vesículas

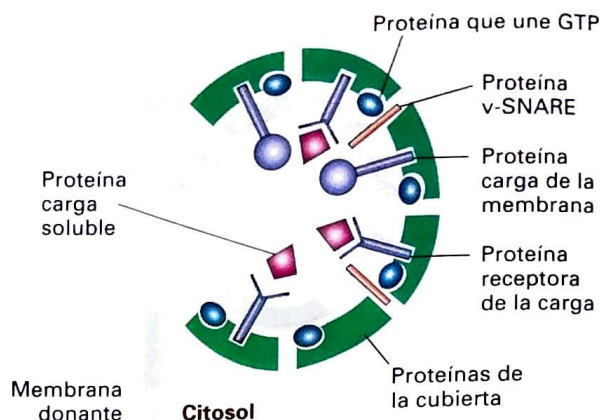
Las pequeñas vesículas rodeadas por membrana que transportan proteínas de un orgánulo a otro son elementos comunes en las vías secretora y endocítica (véase la Fig. 14-1). Estas vesículas brotan desde la membrana de un orgánulo "parental" (*donante*) y se fusionan con la membrana de un orgánulo "diana" (*de destino*). Si bien cada paso de las vías secretora y endocítica emplea un tipo distinto de vesícula, los estudios que emplean técnicas genéticas y bioquímicas han mostrado que cada uno de los diferentes pasos de transporte vesicular es, simplemente, una variación de un tema común. En esta sección exploramos los mecanismos básicos subyacentes al brote de las vesículas, y a la fusión de todos los tipos de vesículas en común, antes de analizar los detalles propios de cada vía.

El ensamblaje de una cubierta de proteína conduce a la formación de vesículas y la selección de moléculas carga

El brote de vesículas desde sus membranas parentales es impulsado por la polimerización de complejos de proteínas solubles en la membrana para formar una cubierta vesicular proteinácea (Fig. 14-6a). Las interacciones entre las porciones citosólicas de las proteínas integrales de la membrana y la cubierta de las vesículas reúnen las proteínas carga adecuadas en la vesícula en formación; así, la cubierta proporciona la curvatura a la membrana para formar una vesícula que actúa como filtro para determinar qué proteínas serán admitidas a la vesícula.

La cubierta también es responsable de incluir en la vesícula proteínas de fusión conocidas como **v-SNARE**. Después de que se completa la formación de una vesícula, la cubierta se desprende, exponiendo las proteínas v-SNARE de ella. La unión específica para las v-SNARE en la membrana de la vesícula con las **t-SNARE** afines en la membrana diana a la cual la vesícula se encuentra anclada hace que las membranas se aproximen íntimamente, permitiendo que las dos bicapas se fusionen (Fig. 14-6b). Independientemente del orgánulo

(a) Formación de vesícula recubierta



(b) Fusión de la vesícula no cubierta

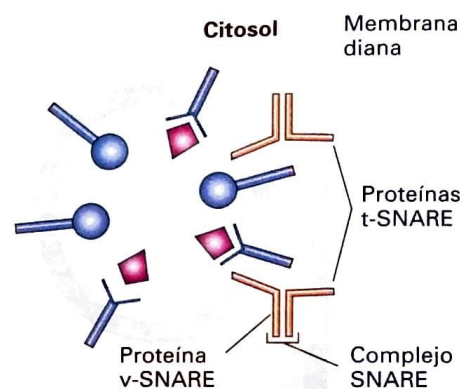


FIGURA 14-6 Panorama de la formación de vesículas y de la fusión con una membrana diana. (a) La formación se inicia por el reclutamiento de una pequeña proteína que une GTP a un región de una membrana donante. Los complejos de las proteínas cubiertas en el citosol se unen luego al dominio citosólico de las proteínas carga de la membrana, partes de las cuales actúan también como receptores que se unen a las proteínas solubles de la luz, reclutando, por lo tanto, proteínas carga luminales al interior de la vesícula en formación. (b) Después de ser liberada y perder su cubierta, la vesícula se fusiona con su membrana diana, en un proceso que involucra la interacción con proteínas SNARE afines.

diana, todas las vesículas de transporte emplean v-SNARE y t-SNARE para brotar y fusionarse.

Se han caracterizado tres tipos principales de vesículas cubiertas, cada una con un tipo diferente de cubierta proteica y formada por la polimerización reversible de un conjunto distinto de subunidades proteicas (Cuadro 14-1). Cada tipo de vesícula que recibe su nombre de acuerdo con las cubiertas proteicas primarias transporta proteínas carga de orgánulos parentales particulares a orgánulos de destino particulares:

- Las vesículas **COPII** transportan proteínas del RE al aparato de Golgi.
- Las vesículas **COPI** transportan principalmente proteínas en dirección retrógrada, entre las cisternas de Golgi y desde el *cis*-Golgi hacia atrás, en dirección al RE.
- Las vesículas de **clatrina** transportan proteínas de la membrana plasmática (superficie celular) y la red *trans*-Golgi a los endosomas tardíos.

Cuadro 14-1 Vesículas recubiertas involucradas en el tránsito de proteínas

Tipo de vesículas	Paso de transporte mediado	Proteínas de la cubierta	GTPasa asociada
COPII	RE al <i>cis</i> -Golgi	Complejos Sec23/Sec24 y Sec13/Sec31, Sec16	Sar1
COPI	<i>cis</i> -Golgi al RE cisternas de Golgi tardías a tempranas	Coatómetros que contienen siete subunidades COP diferentes	ARF
Clatrina y proteínas adaptadoras*	<i>trans</i> -Golgi a endosoma	Complejos clatrina + PA1	ARF
	<i>trans</i> -Golgi a endosoma	Clatrina + GGA	ARF
	Membrana plasmática a endosoma	Clatrina + complejos PA2	ARF
	Golgi a lisosoma, melanosoma o vesículas de las plaquetas	Complejos PA3	ARF

*Cada tipo de complejo PA consiste en cuatro subunidades distintas. No se sabe si la cubierta de las vesículas PA3 contiene clatrina.

Se cree que cada paso del tránsito mediado por vesículas emplea cierto tipo de cubierta vesicular; sin embargo, no se ha identificado un complejo proteico de cubierta específico para cada tipo de vesícula. Las vesículas que mueven las proteínas desde el *trans*-Golgi hacia la membrana plasmática durante la secreción constitutiva o regulada, por ejemplo, muestran tamaño y morfología uniformes, sugiriendo que su formación está impulsada por el ensamblaje de una estructura de cubierta regular, si bien los investigadores no han identificado proteínas de cubierta específicas que rodeen estas vesículas.

El esquema general de gemación de las vesículas que se muestra en la Figura 14-6a se aplica a los tres tipos conocidos de vesículas cubiertas. Los experimentos hechos con membranas aisladas o artificiales y proteínas de cubierta purificadas han mostrado que la polimerización de las proteínas de cubierta en la cara citosólica de la membrana parental es necesaria para producir la alta curvatura de la membrana típica de una vesícula de transporte de alrededor de 50 nm de diámetro. Las microfotografías electrónicas de las reacciones de brote hechas *in vitro* con frecuencia muestran estructuras que exhiben regiones discretas de la membrana parental que tienen una cubierta densa que acompaña la curvatura característica de una vesícula completa (Fig. 14-7). Estas estructuras, llamadas habitualmente *brotes vesiculares*, parecen ser intermediarios visibles una vez que la cubierta ha comenzado a polimerizarse, pero antes de que la vesícula completa se desprenda de la

membrana parental. Se cree que las proteínas de cubierta polimerizadas forman una red curva que conduce la formación de un brote vesicular que se adhiere a la cara citosólica de la membrana.

Un conjunto conservado de proteínas GTPasas interruptoras controla el ensamblaje de diferentes cubiertas vesiculares

Sobre la base de reacciones de brote de vesículas *in vitro* con membranas aisladas y proteínas de cubierta purificadas, los científicos han determinado el conjunto mínimo de componentes de cubierta requeridos para formar cada uno de los tres tipos principales de vesículas. Si bien la mayoría de las proteínas de la cubierta difieren considerablemente de un tipo de vesícula a otro, las cubiertas de las tres vesículas contienen una pequeña proteína que une GTP que actúa como subunidad reguladora para controlar el ensamblaje de la cubierta (véase la Fig. 14-6a). Para las vesículas COPI y las de clatrina, esta proteína de unión al GTP se conoce como *proteína ARF*. Una proteína diferente que une GTP—si bien relacionada con ella—, conocida como *proteína SAR1*, está presente en la cubierta de las vesículas COPII. Tanto la ARF como la SAR1 son proteínas monoméricas con una estructura general semejante a la de la RAS, una proteína intracelular clave en la transducción de las señales (véase la Fig. 16-19). Las proteínas ARF y SAR1, al igual que la RAS, pertenecen a la **superfamilia de la GTPasa** de proteínas interruptoras que ciclan entre las formas de unión al GDP y al GTP (véase la Fig. 3-32 para una reseña del mecanismo de las proteínas “interruptoras” GTPasas).

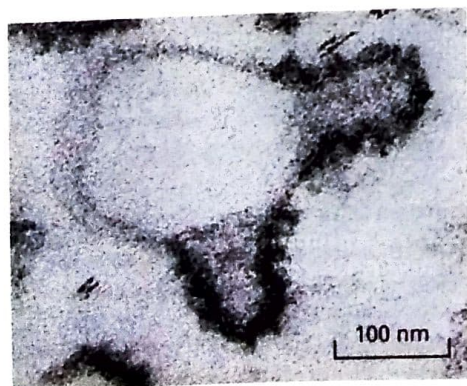


FIGURA EXPERIMENTAL 14-7 Los brotes vesiculares pueden visualizarse durante las reacciones de formación *in vitro*.

Cuando los componentes de la cubierta COPII purificada se incuban con vesículas de RE aisladas o con vesículas fosfolipídicas artificiales (liposomas), la polimerización de las proteínas de la cubierta sobre la superficie de la vesícula induce la emergencia de brotes muy curvados. Note, en esta microfotografía electrónica de una reacción de formación *in vitro*, la cubierta de membrana característica visible como una capa de proteína oscura presente sobre los brotes de la vesícula. (Tomado de K. Marsuoka y cols., 1988, *Cell* 93(2):263,1)

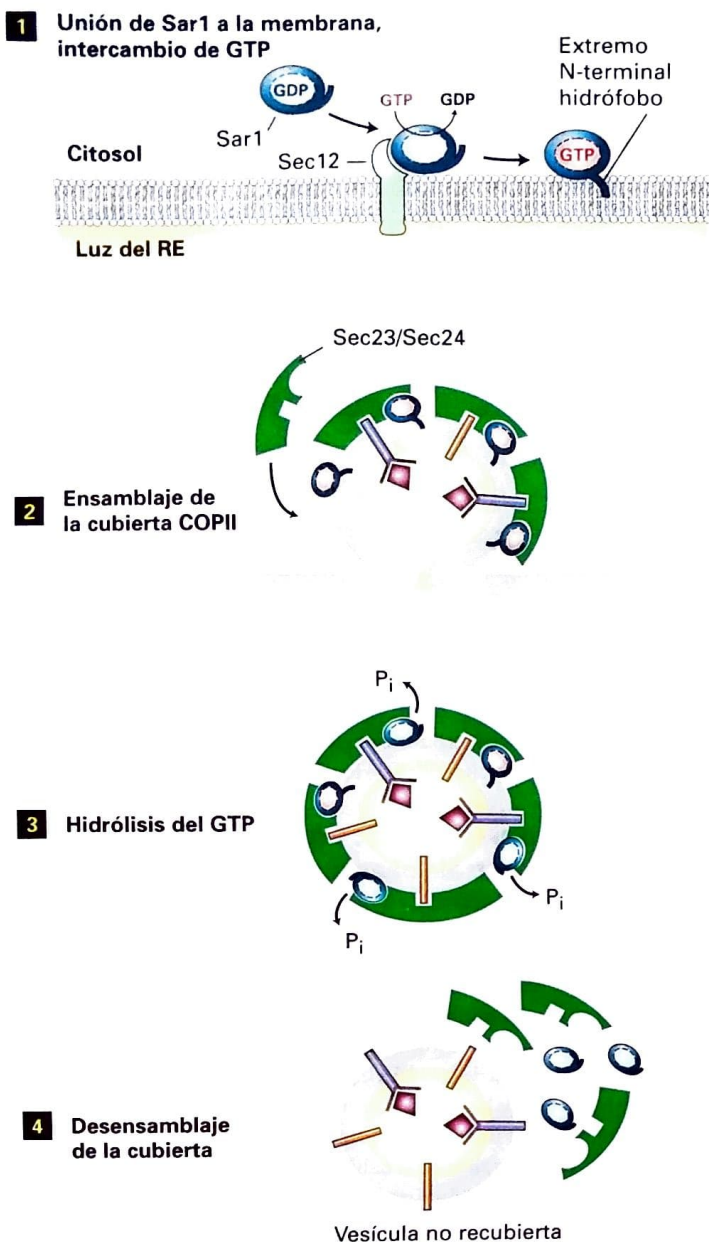


FIGURA 14-8 Modelo del papel de la Sar1 en el ensamblaje y el desensamblaje de las cubiertas de COPII. Paso **1**: la interacción de la Sar1 soluble unida a GDP con el factor de intercambio Sec12, una proteína integral de la membrana del RE, cataliza el intercambio de GDP por GTP en la Sar1. En la forma de la Sar1 unida a GTP, su extremo N-terminal hidrófobo se extiende hacia el exterior desde la superficie de la proteína y ancla la Sar1 a la membrana del RE. Paso **2**: la Sar1 unida a la membrana sirve como sitio de unión para el complejo de la proteína de cubierta Sec23/Sec24. Las proteínas carga de la membrana se reclutan en el interior de la vesícula de brote en formación, uniéndose a secuencias cortas específicas (señales de clasificación) en sus regiones citosólicas a sitios del complejo Sec23/Sec24. Algunas proteínas carga de la membrana actúan, además, como receptores que unen proteínas solubles en la luz. La cubierta se completa por el ensamblaje de un segundo tipo de complejo, compuesto por Sec13 y Sec31 (que no se muestra). Paso **3**: una vez completa la cubierta de la vesícula, la subunidad Sec23 de la cubierta promueve la hidrólisis del GTP por la Sar1. Paso **4**: la liberación de la Sar1-GDP desde la membrana de la vesícula provoca el desensamblaje de la cubierta. (Véase S. Springer y cols., 1999, *Cell* **97**:145)

Se cree que el ciclo de unión al GTP y la hidrólisis por la ARF y la SAR1 controlan la iniciación del ensamblaje de la cubierta, como se muestra esquemáticamente, para el ensamblaje de las vesículas COPII, en la Figura 14-8. En primer lugar, una proteína de la membrana del RE conocida como Sec12 cataliza la liberación de GDP desde el SAR1-GDP y la unión de GTP. Este factor de intercambio *guanina-nucleótido* recibe e integra, en apariencia, múltiples señales aún desconocidas, que incluyen probablemente la presencia de proteínas carga en la membrana del RE listas para su transporte. La unión del GTP provoca un cambio de conformación en la SAR1 que expone su extremo N-terminal hidrófobo, que, entonces, queda inmerso en la bicapa fosfolipídica y ata el SAR1-GTP a la membrana del RE (Fig. 14-8, paso **1**). El SAR1-GTP unido a la membrana conduce la polimerización de los complejos citosólicos de subunidades de la COPII que se encuentra sobre la membrana, conduciendo finalmente a la formación de brotes de vesículas (paso **2**). Una vez que se liberan las vesículas COPII desde la membrana donante, la actividad GTPasa de la SAR1 hidroliza el SAR1-GTP presente en la membrana de la vesícula a SAR1-GDP con la ayuda de una de las subunidades de la cubierta (paso **3**). Esta hidrólisis desencadena el desensamblaje de la cubierta de COPII (paso **4**); así, la SAR1 acopla un ciclo de unión e hidrólisis de GTP a la formación y, luego, a la disociación de la cubierta de COPII.

La proteína ARF transita un ciclo similar de intercambio de nucleótidos e hidrólisis acoplado al ensamblaje de cubiertas de las vesículas compuestas por COPI o por clatrina y otras proteínas de cubiertas (complejos PA) que se analizan más adelante. Una modificación proteica covalente conocida como anclaje de miristato en el N-terminal de la proteína ARF ata débilmente el ARF-GDP a la membrana de Golgi. Cuando el GDP se intercambia por el GTP unido por un factor de intercambio de nucleótidos unido a la membrana del aparato de Golgi, el cambio de conformación resultante en la ARF permite que los residuos hidrófobos en su segmento N-terminal se inserten en la bicapa de la membrana. La estrecha asociación resultante de ARF-GTP con la membrana sirve como fundamento para un ensamblaje adicional de cubierta.

Al delinear las similitudes estructurales de la SAR1 y de la ARF con otras proteínas interruptoras GTPasas pequeñas, los investigadores han construido genes que codifican para versiones mutantes de las dos proteínas con efectos predecibles en el tránsito vesicular cuando se transfectan a células cultivadas; por ejemplo, en las células que expresan versiones mutantes de SAR1 o de ARF que no pueden hidrolizar el GTP, las cubiertas vesiculares se forman y se desprenden las vesículas que brotan. Sin embargo, dado que las proteínas mutantes no pueden desencadenar el desensamblaje de la cubierta, todas las subunidades de la cubierta disponibles quedan, finalmente, ensambladas de forma permanente en vesículas cubiertas incapaces de fusionarse con las membranas de destino. La adición de GTP no hidrolizable, análogo a las reacciones de brote de vesículas in vitro, provoca un bloqueo similar del desensamblaje de la cubierta. Las vesículas que se forman en estas reacciones tienen cubiertas que nunca se disocian, permitiendo que su composición y su estructura puedan analizarse con mayor facilidad. Las vesículas COPI purificadas que se muestran en la Figura 14-9 se produjeron en una reacción de brote de este tipo.

Las secuencias diana de las proteínas carga hacen contactos moleculares específicos con las proteínas de la cubierta

Para transportar vesículas que muevan proteínas específicas de un compartimiento al siguiente, los brotes vesiculares deben ser capaces

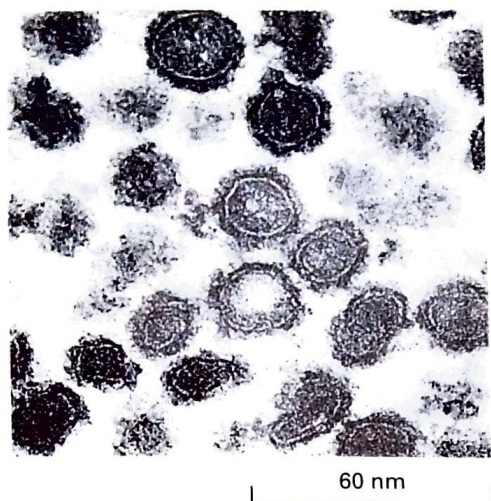


FIGURA EXPERIMENTAL 14-9 Las vesículas cubiertas se acumulan durante las reacciones de formación in vitro en presencia de un análogo no hidrolizable de GTP. Cuando las membranas de Golgi aisladas se incuban con un extracto citosólico que contiene proteínas de la cubierta COPII, las vesículas se forman y brotan desde las membranas. La inclusión de un análogo no hidrolizable de GTP en la reacción de formación evita el desensamblaje de la cubierta después de la liberación de la vesícula. Esta microfotografía muestra las vesículas COPII generadas en una reacción de este tipo y separadas desde las membranas por centrifugación. Las vesículas cubiertas preparadas de este modo pueden ser analizadas para determinar sus componentes y propiedades. (Cortesía de L. Orci)

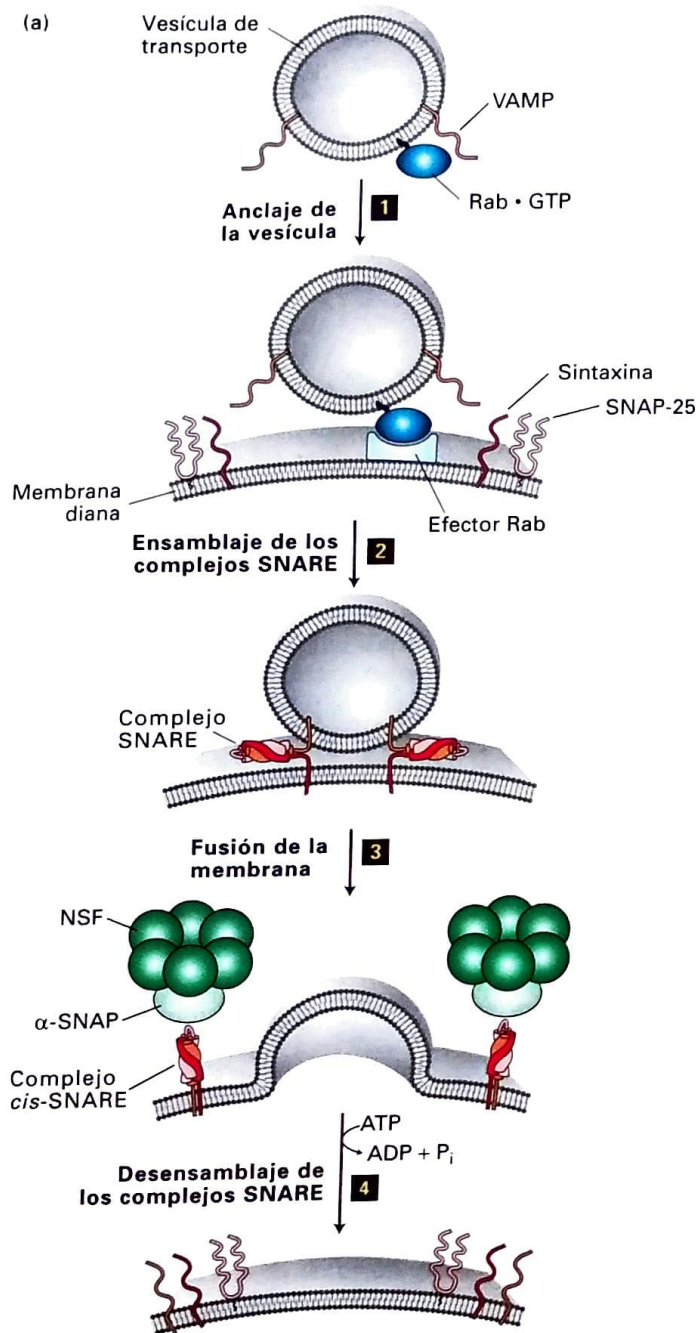
de discriminar entre proteínas potenciales de la membrana y proteínas carga solubles y de aceptar solo aquellas proteínas carga que avanzarán al compartimiento siguiente, excluyendo las que deberían permanecer como residentes en el compartimiento donante. Además de esculpir la curvatura de una membrana donante, la cubierta de la vesícula funciona como selectora de proteínas específicas en su calidad de proteínas carga. El mecanismo primario mediante el cual la cubierta de la vesícula selecciona las moléculas carga es por unión directa a secuencias específicas o **señales de clasificación** en la porción citosólica de las proteínas

carga de la membrana (véase la Fig. 14-6a). La cubierta polimerizada actúa, de este modo, como una matriz de afinidad para agrupar las proteínas carga de la membrana seleccionada en los brotes de vesículas en formación. Dado que las proteínas solubles no pueden contactar la cubierta de la luz de los orgánulos parentales un tipo diferente de señal de clasificación. Las proteínas lumenales solubles con frecuencia contienen lo que puede pensarse como **señales de clasificación lumenales** que se unen a los dominios lumenales de ciertas proteínas carga de la membrana que actúan como receptores para las proteínas carga lumenales. Las propiedades de varias señales de clasificación conocidas en las proteínas solubles y de la membrana se resumen en el Cuadro 14-2. En secciones posteriores, describimos el papel de estas señales con mayor detalle.

Cuadro 14-2 Señales de clasificación conocidas que dirigen las proteínas a vesículas de transporte específicas

Secuencia señal*	Proteínas con señal	Receptor de la señal	Vesículas que incorporan proteínas que llevan señales
SEÑALES DE CLASIFICACIÓN LUMINAL			
Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL)	Proteínas solubles residentes en el RE	Receptor KDEL en la membrana <i>cis</i> -Golgi	COPI
Manosa 6-fosfato (M6P)	Enzimas lisosómicas solubles después del procesamiento en el <i>cis</i> -Golgi	Receptor M6P en la membrana <i>trans</i> -Golgi	Clatrina/PA1
	Enzimas lisosómicas secretadas	Receptor M6P en la membrana plasmática	Clatrina/PA2
SEÑALES DE CLASIFICACIÓN CITOPASMÁTICA			
Lys-Lys-X-X (KKXX)	Proteínas de membrana residentes en el RE	Subunidades α y β COPI	COPI
Diarginina (X-Arg-Arg-X)	Proteínas de membrana residentes en el RE	Subunidades α y β COPI	COPI
Diácídica (p. ej., Asp-X-Glu)	Proteínas carga residentes en el RE	Subunidad Sec24 COPII	COPII
Asn-Pro-X-Tyr (NPXY)	Receptor de LDL en la membrana plasmática	Complejo PA2	Clatrina/PA2
Tyr-X-X- Φ (YXX Φ)	Proteínas de membrana en el <i>trans</i> -Golgi	PA1 (subunidad μ 1)	Clatrina/PA1
	Proteínas de la membrana plasmática	PA2 (subunidad μ 2)	Clatrina/PA2
Leu-Leu (LL)	Proteínas de la membrana plasmática	Complejos PA2	Clatrina/PA2

*X = cualquier aminoácido; Φ = aminoácido hidrófobo. Las abreviaturas de una sola letra de los aminoácidos están entre paréntesis.



Las GTPasas Rab controlan el anclaje de las vesículas en las membranas diana

Un segundo conjunto de proteínas pequeñas que unen GTP, conocidas como *proteínas Rab*, participa en el direccionamiento de las vesículas a la membrana diana adecuada. Al igual que la SAR1 y la ARF, las proteínas Rab pertenecen a la superfamilia GTPasa de proteínas interruptoras. Las proteínas Rab contienen también un ancla isoprenoide que les permite unirse a la membrana de la vesícula. La conversión de Rab-GDP citosólica a Rab-GTP catalizada por un factor de intercambio específico de guanina-nucleótido induce un cambio de

(b) Complejo SNARE

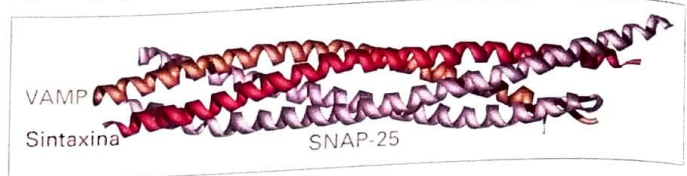


FIGURA 14-10 Modelo de anclaje y fusión de las vesículas de transporte con sus membranas diana. (a) Las proteínas que se muestran en este ejemplo participan en la fusión de vesículas de secreción con la membrana plasmática, pero proteínas similares median todos los eventos de fusión de las vesículas. Paso **1**: una proteína Rab unida por medio de un ancla lipídica a una vesícula de secreción está ligada a un complejo de proteína efectora sobre la membrana plasmática, anclándose, por lo tanto, a la vesícula de transporte sobre la membrana diana apropiada. Paso **2**: una proteína v-SNARE (en este caso, VAMP) interactúa con los dominios citosólicos de las t-SNARE afines (en este caso, sintaxina y SNAP-25). Los complejos muy estables de espiral enrollada SNARE que se forman mantienen la vesícula cerca de la membrana diana. Paso **3**: la fusión de las dos membranas inmediatamente sigue a la formación de los complejos SNARE, pero no se sabe con precisión cómo ocurre esto. Paso **4**: después de la fusión de la membrana, la NSF, en conjunción con la proteína α -SNAP, se une a los complejos SNARE. La hidrólisis del ATP catalizado por NSF impulsa luego la disociación de los complejos SNARE, liberando las proteínas SNARE para otro ciclo de fusión de las vesículas. También en ese momento, el Rab-GTP se hidroliza a Rab-GDP y se disocia del efector Rab (no se muestra). (b) El complejo SNARE. Numerosas interacciones no covalentes entre las cuatro hélices o largas, dos de las SNAP-25 y una de la sintaxina y una de la VAMP estabilizan la estructura de espiral enrollada. (Véanse J. E. Rothman y T. Söllner, 1997, *Science* **276**:1212, y W. Weis y R. Scheller, 1998, *Nature* **395**:328. La parte (b) es tomada de Y. A. Chen y R. H. Scheller, 2001, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**(2):98)

conformación en la Rab que le permite interactuar con una proteína de superficie sobre una vesícula de transporte en particular e inserta su ancla isoprenoide en la membrana de la vesícula. Una vez que Rab-GTP está atada a la superficie de la vesícula, se cree que interactúa con una de varias proteínas diferentes, conocidas como efectores Rab, unidas a la membrana diana. La unión del Rab-GTP a la diana Rab mantiene fija la vesícula sobre una membrana diana adecuada (Fig. 14-10, paso **1**). Después de que ocurre la fusión de la vesícula, el GTP unido a la proteína Rab se hidroliza a GDP, desencadenando la liberación de Rab-GDP, que, luego, puede sufrir otro ciclo de intercambio, unión e hidrólisis GDP-GTP.

Varias líneas de evidencia apoyan el compromiso de proteínas Rab específicas en los eventos de fusión de las vesículas; por ejemplo, el gen de las levaduras *SEC4* codifica una proteína Rab, y las levaduras que expresan las proteínas mutantes Sec4 acumulan vesículas secretoras incapaces de fusionarse con la membrana plasmática (mutantes de clase E de la Fig. 14-4). En las células de mamífero, la proteína Rab5 se localiza en las vesículas endocíticas conocidas también como endosomas tempranos. Estas vesículas no cubiertas se forman a partir de vesículas cubiertas con clatrina inmediatamente después de que brotan de la membrana plasmática durante la endocitosis (véase la Fig. 14-1, paso **9**). La fusión de los endosomas tempranos entre sí en sistemas libres de células requiere la presencia de Rab5, y la adición de Rab5 y GTP a los estratos libres de células acelera la velocidad a la cual las vesículas se fusionan entre sí. Una proteína larga, espiralada, conocida como EEA1 (*early endosome antigen 1*), que reside

en la membrana del endosoma temprano, funciona como el efector de Rab5. En este caso, se cree que el Rab5-GTP que se encuentra sobre una vesícula endocítica se une de forma específica al EEA1 de la membrana de otra vesícula endocítica, estableciendo las bases para la fusión de ambas vesículas.

Un tipo distinto de efector Rab parece funcionar para cada tipo de vesícula de la vía secretora. Siguen pendientes muchas preguntas acerca del modo en que las proteínas Rab se dirigen a la membrana correcta y de la manera en que se forman complejos específicos entre las diferentes proteínas Rab y sus proteínas efectoras correspondientes.

Conjuntos apareados de proteínas SNARE median la fusión de las vesículas con las membranas diana

Como se señaló previamente, poco después de que las vesículas se desprenden de la membrana donante, la cubierta de la vesícula se desagrega para dejar al descubierto la proteína específica de la membrana de la vesícula, una v-SNARE (véase la Fig. 14-6b). De modo similar, cada tipo de membrana diana de una célula contiene proteínas de membrana t-SNARE que interactúan de modo específico con las v-SNARE. Después de la fijación mediante Rab de una vesícula sobre su membrana diana (de destino), la interacción de las SNARE afines mantiene las dos membranas suficientemente cerca como para que puedan fusionarse.

Uno de los ejemplos mejor comprendidos de fusión mediada por SNARE ocurre durante la exocitosis de las proteínas secretadas (véase la Fig. 14-10, pasos 2 y 3). En este caso, la v-SNARE conocida como VAMP (*vehicle-associated membrane protein*, proteína asociada a la membrana de la vesícula) se incorpora a las vesículas secretoras a medida que estas brotan de la red *trans*-Golgi. Las t-SNARE son la *syntaxina*, una proteína integral de la membrana plasmática, y la SNAP-25, que está unida a la membrana plasmática mediante un ancla lipídica hidrófoba en medio de la proteína. La región citosólica de cada una de las tres proteínas SNARE contiene una secuencia héptada repetida que permite que cuatro hélices α (una de la VAMP, una de la *syntaxina* y dos de la SNAP-25) se enrollen, la una alrededor de la otra, para formar un haz de cuatro hélices (Fig. 14-10b). La estabilidad inusual de este complejo de SNARE que forma un haz es conferida por la configuración de los residuos de aminoácidos hidrófobos y cargados en la repetición de la héptada. Los aminoácidos hidrófobos se encuentran enterrados en el núcleo central del haz y los aminoácidos de carga opuesta están alineados para construir interacciones electroestáticas favorables entre las hélices; a medida que se forman los haces de cuatro hélices, las membranas de las vesículas y efectora se acercan y quedan en aposición por los dominios transmembrana de la VAMP y la *syntaxina* incrustadas dentro de las membranas.

Los experimentos *in vitro* han mostrado que cuando los liposomas que contienen VAMP purificadas se incuban con otros liposomas que contienen *syntaxina* y SNAP-25, las dos clases de membrana se fusionan, si bien lentamente. Este hallazgo constituye una fuerte evidencia de que la íntima aposición de las membranas que resulta de la formación de los complejos SNARE es suficiente para lograr la fusión de estas. La fusión de una vesícula y la membrana diana ocurre con más rapidez y mayor eficiencia en la célula que en los experimentos hechos con liposomas, en los cuales la fusión está catalizada solo por las proteínas SNARE. La explicación probable de esta diferencia es que, en la célula, están implicadas en

el direccionamiento de las vesículas a la membrana correcta otras proteínas, tales como las Rab y sus efectoras.

Las levaduras, al igual que todas las células eucariontes, expresan más de veinte proteínas v-SNARE y t-SNARE relacionadas diferentes. Los análisis de los mutantes de levaduras defectuosas en algunos de los genes SNARE han identificado eventos específicos de fusión de membrana en los cuales participa cada proteína SNARE. Para todos los eventos de fusión que se han examinado, las SNARE forman complejos que constituyen haces de cuatro hélices similares a los complejos VAMP/*syntaxina*/SNAP-25 que median la fusión de vesículas secretoras con la membrana plasmática; sin embargo, en otros eventos de fusión (p. ej., la fusión de las vesículas COPII con la red *cis*-Golgi), cada proteína SNARE participante contribuye solo con una hélice α al haz (a diferencia de la SNAP-25, que contribuye con dos hélices); en estos casos, los complejos SNARE comprenden una molécula v-SNARE y tres moléculas t-SNARE.

Empleando el ensayo de fusión de liposomas *in vitro*, los investigadores han puesto a prueba la capacidad de varias combinaciones individuales de proteínas v-SNARE y t-SNARE para mediar la fusión de las membranas donante y diana. De la gran cantidad de combinaciones probadas, solo un pequeño número pudo mediar de manera eficiente la fusión. En grado notable, las combinaciones funcionales de v-SNARE y t-SNARE revelaron en estos experimentos *in vitro* correspondientes a las interacciones reales de proteínas SNARE que median los eventos de fusión conocidos en las levaduras; así, junto con la especificidad de la interacción entre las proteínas Rab y Rab efectoras, la especificidad de la interacción entre las proteínas SNARE puede dar cuenta de la mayor parte de la especificidad de la fusión entre un tipo de vesícula en particular y su membrana diana, aunque no de toda.

La disociación de los complejos SNARE después de la fusión de la membrana es impulsada por la hidrólisis del ATP

Después de que una vesícula y su membrana efectora se han fusionado, los complejos SNARE deben disociarse para que las proteínas SNARE individuales estén disponibles para eventos de fusión adicionales. Dada la estabilidad de los complejos SNARE que se mantienen juntos por numerosas interacciones intermoleculares no covalentes, su disociación depende de proteínas adicionales y del ingreso de energía.

La primera pista de que la disociación de los complejos SNARE requería la asistencia de otras proteínas provino de reacciones de transporte *in vitro* en las que faltaban ciertas proteínas citosólicas. La acumulación observada de vesículas en estas reacciones indicó que ellas podían formarse pero eran incapaces de fusionarse con una membrana diana; finalmente se encontró que dos proteínas, designadas NSF y α -SNAP, eran necesarias para que procediera la fusión de las vesículas en la reacción de transporte *in vitro*. La función de la NSF *in vivo* puede ser selectivamente bloqueada por la *N*-etilmaleimida (NEM), una sustancia química que reacciona con un grupo-SH esencial de la NSF (*NEM-sensitive factor*, factor sensible a NEM).

Las mutantes de levaduras también han contribuido a nuestra comprensión de la función de las SNARE. Entre la clase de las levaduras *C*, los mutantes *sec* son cepas que carecen de Sec18 o Sec17 funcionales, las contrapartidas en las levaduras del NSF y la α -SNAP

de los mamíferos, respectivamente. Cuando esta clase de mutantes C se ubica a temperatura no permisiva se acumulan las vesículas de transporte RE hacia Golgi; cuando las células se cambian a una temperatura más baja permisiva, las vesículas acumuladas son capaces de fusionarse con el *cis*-Golgi.

Posteriormente a los estudios bioquímicos y genéticos iniciales que identificaron el NSF y el α -SNAP se desarrollaron estudios de transporte in vitro más sofisticados. Empleando estos ensayos nuevos, los investigadores han mostrado que las proteínas NSF y α -SNAP no son necesarias para la fusión real de las membranas, sino que se requieren para regenerar las proteínas SNARE libres. El NSF, un hexámero de subunidades idénticas, se asocia con un complejo SNARE con ayuda de la α -SNAP (*soluble NSF attachment protein*, proteína de unión soluble al NSF). Luego, el NSF unido hidroliza ATP, liberando energía suficiente para disociar el complejo SNARE (Fig. 14-10, paso 4). Evidentemente, los defectos en la fusión de las vesículas observados en los ensayos de fusión previos in vitro y en las levaduras mutantes después de la pérdida de la Sec17 o la Sec18 eran consecuencia de que las proteínas SNARE libres rápidamente fueran secuestradas en complejos SNARE no disociados y, por lo tanto, no estuvieran disponibles para mediar la fusión de las membranas.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 14.2

Mecanismos moleculares de la formación y fusión de las vesículas

- Las tres vesículas de transporte bien caracterizadas –COPI, COPII y vesículas de clatrina– se distinguen por las proteínas que forman sus cubiertas y las rutas de transporte que median (véase el Cuadro 14-1).
- Todos los tipos de vesículas cubiertas se forman por la polimerización de proteínas de cubierta citosólicas sobre la membrana donante (parental) para formar brotes vesiculares que, finalmente, se desprenden de la membrana para liberar una vesícula completa. Poco después de la liberación de la vesícula, la cubierta se desprende, exponiendo las proteínas necesarias para la fusión con la membrana diana (véase la Fig. 14-6).
- Pequeñas proteínas que unen GTP (ARF o Sar1) que pertenecen a la superfamilia de la GTPasa controlan la polimerización de las proteínas de la cubierta, el paso inicial en la formación de las vesículas (véase la Fig. 14-8). Después de que las vesículas se liberan desde la membrana donante, la hidrólisis del GTP unido a ARF o Sar1 desencadena el desensamblaje de las cubiertas de las vesículas.
- Señales de clasificación específicas en la membrana y en las proteínas lumenales de los orgánulos donantes interactúan con las proteínas de la cubierta durante la formación de las vesículas, reclutando así proteínas carga a estas vesículas (véase el Cuadro 14-2).
- Un segundo conjunto de proteínas que unen GTP, las proteínas Rab, regula la fijación de las vesículas a la membrana diana correcta. Cada Rab parece unirse a un Rab efector específico asociado con la membrana diana.

- Cada v-SNARE en una membrana de una vesícula se une de modo específico a un complejo de proteínas t-SNARE afines en la membrana diana, induciendo la fusión de ambas membranas. Después de que se ha completado la fusión, el complejo SNARE se desensambla en una reacción dependiente del ATP mediada por otras proteínas citosólicas (véase la Fig. 14-10).

14.3 Etapas iniciales de la vía secretora

En esta sección, miraremos con mayor detalle el tránsito vesicular entre el RE y el aparato de Golgi y parte de la evidencia que da sostenimiento al mecanismo general analizado en la sección previa. Recuerde que el *transporte anterógrado* desde el RE hacia el Golgi, el primer paso de tránsito de la vesícula en la vía de secreción, está mediado por las vesículas COPII. Estas contienen proteínas recién sintetizadas, destinadas para el aparato de Golgi, la superficie celular o los lisosomas, como así también componentes vesiculares tales como las v-SNARE necesarias para dirigir las vesículas a la membrana del *cis*-Golgi. La adecuada clasificación de las proteínas entre el RE y el aparato de Golgi también requiere el *transporte retrógrado (inverso)* del *cis*-Golgi al RE, mediado por las vesículas COPI (Fig. 14-11). Este transporte de vesículas retrógrado sirve para recuperar las proteínas v-SNARE y la propia membrana en el RE y para proporcionar el material necesario para ciclos adicionales de gemación de vesículas desde el RE. El transporte retrógrado mediado por COPI también recupera proteínas residentes en el RE mal clasificadas desde el *cis*-Golgi para corregir estos errores en la clasificación.

Analizamos en esta sección, además, el proceso por el cual las proteínas correctamente entregadas al aparato de Golgi avanzan a través de compartimientos sucesivos de este de la red *cis* a la *trans*. Este proceso, conocido como maduración de las cisternas, implica el brote y la fusión de vesículas de transporte retrógrado más que anterógrado.

Las vesículas COPII median el transporte del RE al aparato de Golgi

Las vesículas COPII fueron reconocidas inicialmente cuando se incubaron extractos libres de células de membranas del RE de levaduras con análogos del GTP no hidrolizable y citosol. Las vesículas que se formaron a partir de las membranas del RE tenían una cubierta distinta, semejante a las de las vesículas COPI, pero compuesta por proteínas diferentes, designadas proteínas COPII. Las levaduras con mutaciones en los genes para las proteínas COPII son mutantes *sec* de clase B y acumulan proteínas en el RE rugoso (véase la Fig. 14-4). El análisis de estas mutantes ha revelado un conjunto de proteínas necesarias para la formación de las vesículas COPII, que incluyeron las proteínas que comprenden la cubierta de las vesículas COPII.

Como se describió previamente, la formación de las vesículas COPII se desencadena cuando la Sec12, un factor de intercambio de guanina-nucleótido en la membrana del RE, cataliza el intercambio del GTP por el GDP unido en la SAR1 citosólica. Este intercambio induce la unión de la SAR1 a la membrana del RE, seguida de la unión de un complejo de proteínas Sec23 y Sec24 (véase la Fig. 14-8). El

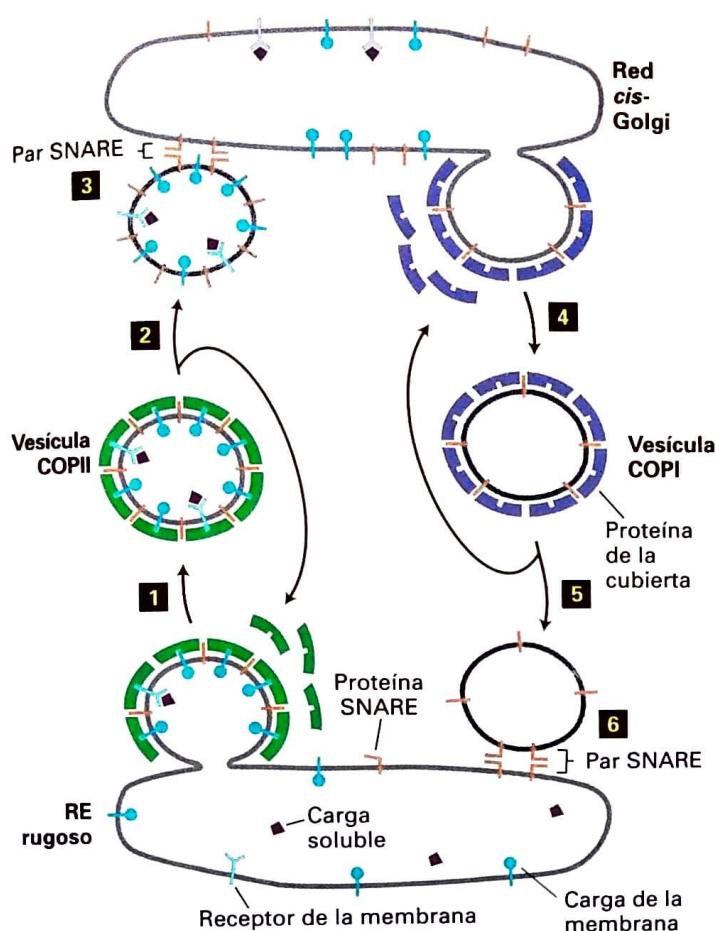


FIGURA 14-11 Tránsito de proteínas mediado por vesículas entre el RE y el *cis*-Golgi. Pasos **1-3**: el transporte hacia adelante (anterógrado) es mediado por las vesículas COPII, que se forman por la polimerización de los complejos proteicos de cubierta COPII solubles (verde) sobre la membrana del RE. Las v-SNARE (anaranjado) y otras proteínas carga (azul) en la membrana del RE se incorporan a la vesícula al interactuar con las proteínas cubiertas. Las proteínas carga solubles (magenta) se reclutan al unirse a los receptores apropiados en la membrana de las vesículas en formación. La disociación de la cubierta recicla complejos de cubierta libres y expone las proteínas v-SNARE sobre la superficie de la vesícula. Después de que la vesícula no cubierta se une a la membrana *cis*-Golgi en el proceso mediado por la Rab, el apareamiento entre las v-SNARE expuestas y las t-SNARE afines en la membrana del aparato de Golgi permite la fusión de las vesículas, liberando el contenido al compartimiento *cis*-Golgi (véase la Fig. 14-10). Pasos **4-6**: el transporte inverso (retrógrado) mediado por las vesículas cubiertas con proteínas COPI (púrpura) recicla la bicapa de la membrana y ciertas proteínas como las v-SNARE y las proteínas residentes del RE mal asignadas (que no se muestran) del *cis*-Golgi al RE. Todas las proteínas SNARE se muestran en anaranjado, aunque las v-SNARE y las t-SNARE son proteínas distintas.

complejo ternario resultante, formado entre SAR1-GTP, Sec23 y Sec24, se muestra en la Figura 14-12. Después de que se forma este complejo sobre la membrana del RE, un segundo complejo, constituido por proteínas Sec13 y Sec31, se une para completar la estructura de la cubierta. Las proteínas Sec13 y Sec31 puras pueden ensamblarse espontáneamente en redes con forma de jaula. Se piensa que la Sec13 y la Sec31 forman el andamiaje estructural para las vesículas COPII. Finalmente, una proteína fibrosa grande, llamada Sec16, que

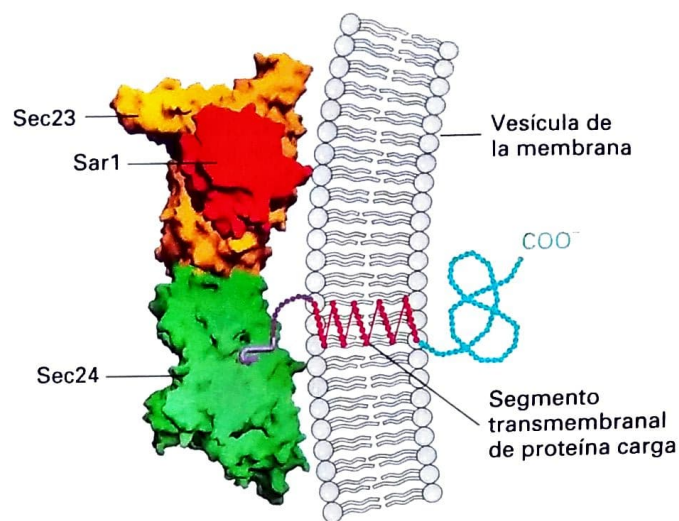


FIGURA 14-12 Estructura tridimensional del complejo ternario que comprende las proteínas de la cubierta COPII, Sec23 y Sec24 y Sar1-GTP. En etapas iniciales durante la formación de la cubierta COPII, los complejos Sec23 (anaranjado)/Sec24 (verde) son reclutados a la membrana del RE por la Sar1 (rojo) en su estado unido a GTP. Para formar un complejo ternario estable en solución para estudios estructurales se emplea el análogo no hidrolizable de GTP GppNHp. Una proteína carga de la membrana del RE puede ser reclutada a las vesículas COPII por la interacción de una señal tripeptídica diácida (púrpura) en el dominio citosólico de la proteína carga con Sec24. La posición probable de la membrana de la vesícula COPII y del segmento transmembrana de la proteína carga están indicadas en la figura. El segmento N-terminal de la Sar1 que se une a la membrana no se muestra. (Véase X. Bi y cols., 2002, *Nature* **419**:271; interacción con péptido, cortesía de J. Goldberg).

se une a la superficie citosólica del RE, interactúa con la SAR1-GTP y los complejos Sec13/31 y Sec23/24 y actúa para organizar las otras proteínas de la cubierta, aumentando la eficiencia de la polimerización de esta. De forma semejante a la Sec13/31, la clatrina también tiene la capacidad de autoensamblarse en una estructura del tipo de una cubierta, como se analizará en la Sección 14-4.

Ciertas proteínas integrales de la membrana del RE son reclutadas específicamente en las vesículas COPII para ser transportadas al aparato de Golgi. Los segmentos citosólicos de muchas de estas proteínas contienen una *señal de clasificación diácida* (los residuos clave de esta secuencia son Asp-X-Glu, o DXE, en el código de una letra; véase el Cuadro 14-2). Esta señal de clasificación se une a la subunidad Sec24 del COPII y resulta esencial para la exportación selectiva de ciertas proteínas de membrana desde el RE (véase la Fig. 14-12). Actualmente se realizan estudios bioquímicos y genéticos para identificar señales adicionales que ayudan a dirigir las proteínas carga de las membranas al interior de las vesículas COPII. Otros estudios en desarrollo buscan determinar de qué manera las proteínas carga solubles son selectivamente cargadas a las vesículas COPII. Si bien las vesículas COPII purificadas de las levaduras mostraron contener una proteína de membrana que une el factor soluble α de apareamiento, los receptores de otras proteínas carga solubles, como la invertasa, aún se desconocen.



La enfermedad hereditaria fibrosis quística se caracteriza por un desequilibrio en el transporte iónico del cloro y el sodio en las células epiteliales del pulmón, lo cual lleva a la acumulación de líquido

y la dificultad para respirar. La fibrosis quística es provocada por mutaciones en una proteína conocida como CFTR, sintetizada como proteína integral de la membrana en el RE y transportada al aparato de Golgi antes de ser enviada a las membranas plasmáticas de las células epiteliales, donde funciona como canal de cloro. Recientemente, los investigadores han mostrado que la proteína CFTR contiene una señal de clasificación diácida que se une a la subunidad Sec24 de la cubierta COPII y es necesaria para el transporte de la proteína CFTR al exterior del RE. La mutación CFTR más común es la eliminación de una fenilalanina en la posición 508 de la secuencia de la proteína (conocida como $\Delta F508$). Esta mutación evita el transporte normal de la CFTR a la membrana plasmática al bloquear su empaquetamiento en las vesículas COPII que brotan del RE. Si bien la mutación $\Delta F508$ no se encuentra en la cercanía de la señal de clasificación diácida, puede cambiar la conformación de la porción citosólica de la CFTR de modo tal que la señal diácida sea incapaz de unirse a la Sec24. Resulta interesante que una CFTR plegada con esta mutación aún sea funcional como canal de cloro normal. Sin embargo, nunca llega a la membrana; este estado de enfermedad, por lo tanto, está provocado por la ausencia del canal y no porque este sea defectuoso. ■

Los experimentos descritos previamente, en los cuales el tránsito de VSVG-PFV en las células cultivadas de mamífero se monitoriza por microscopia de fluorescencia (véase la Fig. 14-2), proveyeron información acerca de los intermediarios en el transporte desde el RE hacia el aparato de Golgi. En algunas células pudieron verse pequeñas vesículas fluorescentes que contenían VSVG-PFV formándose desde el RE, moviéndose menos de 1 μm y, luego, fusionándose directamente con el *cis*-Golgi. En otras células, en las que el RE estaba localizado a varios micrómetros de distancia del complejo de Golgi, se vieron varias vesículas derivadas del RE fusionarse entre sí poco después de formadas, constituyendo lo que se conoce como *compartimiento intermediario desde el RE hacia el aparato de Golgi* o *red cis-Golgi*. Estas estructuras de mayor tamaño luego fueron transportadas a lo largo de los microtúbulos hasta el *cis*-Golgi, en gran medida en el modo en que las vesículas de las células nerviosas se transportan desde el soma celular, donde se forman, a lo largo del axón hasta la terminal axónica (véase el Cap. 18). Los microtúbulos funcionan como las “vías de ferrocarril” que permiten que estos agregados grandes de vesículas de transporte se muevan largas distancias hasta su destino en el *cis*-Golgi. En el momento en que se forma el compartimiento RE hacia el aparato de Golgi intermedio, algunas vesículas COPI brotan desde él, reciclando algunas proteínas nuevamente al RE.

Las vesículas COPI median el transporte retrógrado entre el aparato de Golgi y desde este hacia el RE

Las vesículas COPI fueron descubiertas cuando las fracciones aisladas de Golgi se incubaron en una solución que contenía citosol y un análogo no hidrolizable de GTP (véase la Fig. 14-9). El análisis posterior de estas vesículas mostró que la cubierta está formada por complejos citosólicos grandes, llamados *coatómeros*, compuestos de siete subunidades polipeptídicas. Las levaduras que contienen mutaciones sensibles a la temperatura en las proteínas COPI acumulan proteínas en el RE rugoso en la temperatura no permisiva y, por lo tanto, se categorizan como mutantes *sec* de clase B (véase la Fig. 14-4). Si bien el descubrimiento de estos mutantes sugirió inicialmente que las vesículas COPI median el

transporte del RE hacia el aparato de Golgi, experimentos posteriores mostraron que su función principal es el transporte retrógrado entre las cisternas del aparato de Golgi y desde el *cis*-Golgi hacia el RE rugoso (véase la Fig. 14-11, *derecha*). Dado que las mutantes COPI no pueden reciclar las proteínas clave de la membrana nuevamente hacia el RE rugoso, el RE se vacía gradualmente de las proteínas que le pertenecen, tales como las v-SNARE necesarias para la función de las vesículas COPII; finalmente, tiende a detenerse la formación de vesículas desde el RE rugoso; las proteínas de secreción continúan siendo sintetizadas pero se acumulan en el interior del RE, la característica que define las mutantes *sec* de clase C. La capacidad general de las mutantes *sec* implicadas en el funcionamiento de las vesículas COPI o COPII de bloquear finalmente los transportes anterógrado y retrógrado ilustra la interdependencia fundamental de estos dos procesos de transporte.

Como se analizó en el Capítulo 13, el RE contiene varias proteínas solubles dedicadas al plegamiento y a la modificación de proteínas secretoras recién sintetizadas; entre ellas se incluyen la chaperona BiP y la enzima proteína disulfuro isomerasa, necesarias para que el RE desempeñe sus funciones. Si bien las proteínas lumenales residentes en el RE de este tipo no son específicamente seleccionadas por las vesículas COPII, su abundancia hace que sean continuamente cargadas de forma pasiva a vesículas destinadas hacia el *cis*-Golgi. El transporte de estas proteínas solubles nuevamente hacia el RE, mediado por vesículas COPI, evita su desaparición final.

La mayoría de las proteínas residentes solubles del RE llevan una secuencia Lys-Asp-Glu-Leu (KDEL, en el código de una letra) en su extremo C-terminal (véase el Cuadro 14-2). Varios experimentos demostraron que esta *señal de clasificación KDEL* es condición necesaria y suficiente para que una proteína que la detenta se localice en el RE; por ejemplo, cuando una proteína mutante isomerasa disulfuro que carece de estos cuatro residuos es sintetizada en fibroblastos en cultivo, la proteína se secreta. Aún más, si una proteína que normalmente se secreta se ve alterada de modo tal que contiene la señal KDEL en su extremo C-terminal, la proteína se localizará en el RE. La señal KDEL de clasificación es reconocida y se une al *receptor KDEL*, una proteína integral de la membrana que se encuentra primariamente en pequeñas vesículas de transporte que viajan entre el RE y el *cis*-Golgi y que están presentes en el retículo *cis*-Golgi. Además, las proteínas residentes solubles del RE que llevan la señal KDEL tienen cadenas de oligosacáridos con modificaciones catalizadas por enzimas presentes solo en la red *cis*-Golgi o en el *cis*-Golgi; así, en cierto momento, estas proteínas deben abandonar el RE y ser transportadas al menos hasta la red *cis*-Golgi. Estos hallazgos indican que el receptor KDEL actúa principalmente para recuperar proteínas solubles que contienen la señal de clasificación KDEL que ha escapado a la red *cis*-Golgi y para regresarlas al RE (Fig. 14-13). El receptor KDEL se une más estrechamente a su ligando a pH bajo, y se piensa que el receptor es capaz de unir péptidos KDEL en el *cis*-Golgi pero no de liberarlos en el RE porque el pH del aparato de Golgi es ligeramente inferior al del RE.

El receptor KDEL y otras proteínas de membrana transportadas nuevamente al RE desde el aparato de Golgi contienen una secuencia Lys-Lys-X-X en el extremo del segmento C-terminal que enfrenta el citosol (véase el Cuadro 14-2). Esta *señal de clasificación KKXX* que se une a un complejo de las subunidades α y β del COPI (dos de las siete subunidades polipeptídicas del coatómero COPI) es condición necesaria y suficiente para incorporar las proteínas de membrana a las vesículas COPI para el transporte retrógrado al RE. Los mutantes

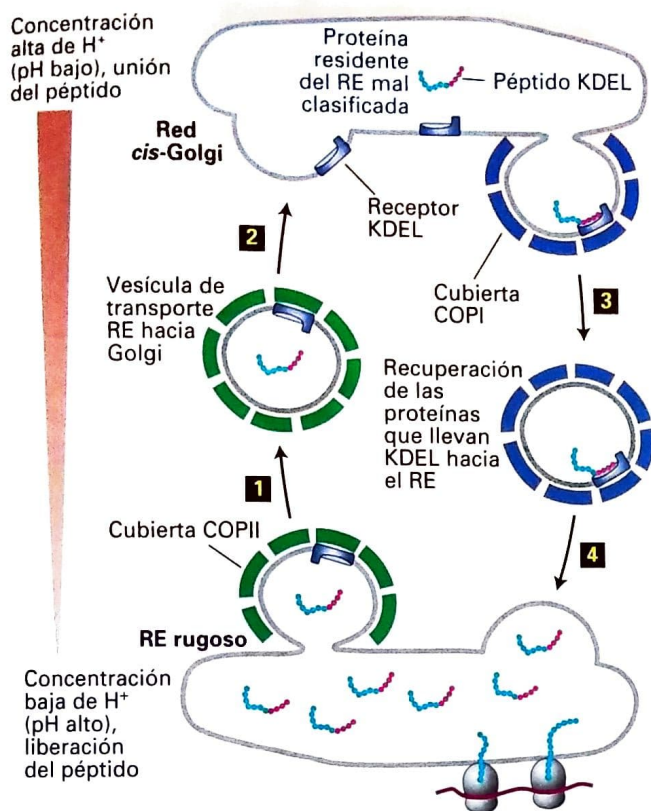


FIGURA 14-13 Papel del receptor KDEL en la recuperación de las proteínas luminales residentes del RE desde el aparato de Golgi. Las proteínas luminales del RE, especialmente aquellas presentes en grandes cantidades, pueden incorporarse pasivamente a las vesículas COPII y ser transportadas al aparato de Golgi (pasos 1 y 2). Muchas proteínas de este tipo llevan una secuencia KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) C-terminal (rojo) que les permite ser recuperadas. El receptor KDEL, localizado principalmente en la red cis-Golgi y tanto en las vesículas COPII como en las COPI, une proteínas que llevan la señal de clasificación KDEL y las regresa al RE (pasos 3 y 4). Este sistema de recuperación evita el vaciamiento de las proteínas luminales del RE como las necesarias para el plegamiento adecuado de proteínas de secreción recién sintetizadas. La afinidad de unión del receptor KDEL es muy sensible al pH. La pequeña diferencia entre el pH del RE y el del aparato de Golgi favorece la unión de las proteínas que tienen KDEL al receptor en las vesículas derivadas del aparato de Golgi y su liberación en el RE. (Adaptado de J. Semenza y cols., 1990, *Cell* 61:1349).

COPII. Después de que se forman, las proteínas de la cubierta de COPII permanecen ensambladas el tiempo suficiente para que el complejo Sec23/Sec24 interactúe con un factor de unión específico adherido a la membrana del cis-Golgi. Las vesículas que se descubren para exponer las v-SNARE se completan solo después de que la vesícula COPII ya está íntimamente asociada con la membrana del cis-Golgi y las v-SNARE de COPII se encuentran en la posición correcta para formar complejos con sus t-SNARE afines. Si bien las vesículas COPII también llevan proteínas v-SNARE específicas de COPI que son recicladas nuevamente al cis-Golgi, estas proteínas v-SNARE de COPI incluidas en las vesículas COPII nunca tienen la oportunidad de formar complejos SNARE con proteínas t-SNARE afines localizadas en el RE.

de levaduras sensibles a la temperatura que carecen de COPI α o de COPI β no solo son incapaces de unir la señal KKXX, sino que son, también, incapaces de recuperar las proteínas que tienen esta señal retrotransportándolas al RE, lo que indica que las vesículas COPI median el transporte retrógrado del aparato de Golgi al RE.

Una segunda señal de clasificación que dirigirá las proteínas a las vesículas COPI y, por lo tanto, permitirá el reciclado desde el aparato de Golgi hacia el RE es la secuencia diarginina. A diferencia de la señal de clasificación KKXX, que debe estar localizada en el C-terminal de una proteína orientado hacia el citoplasma, la señal de clasificación diarginina puede residir en cualquier segmento de una proteína de membrana que esté en la cara citoplasmática de esta.

La partición de las proteínas entre el RE y el complejo de Golgi es un proceso muy dinámico, que depende de las vesículas COPII (anterógradas) tanto como de las COPI (retrógradas), en el que cada tipo de vesícula es responsable del reciclado de los componentes necesarios para el funcionamiento del otro tipo. La organización de este proceso de partición hace surgir un interrogante interesante: ¿cómo las vesículas usan preferentemente las v-SNARE —que especificarán la fusión con la membrana diana correcta— en lugar de las v-SNARE —que están siendo recicladas y tendrán especificidad por fusionarse con la membrana donante—?

Esta pregunta básica concerniente a la partición correcta de la membrana ha sido respondida recientemente por las vesículas

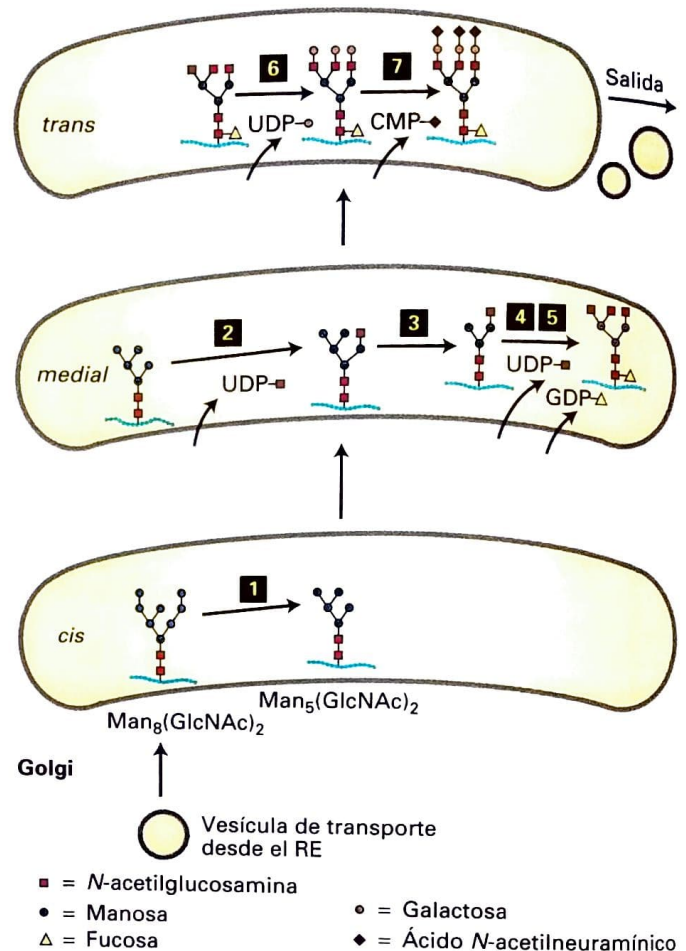
El transporte anterógrado a través del aparato de Golgi ocurre por maduración de las cisternas

El complejo de Golgi está organizado en tres o cuatro subcompartimientos, dispuestos con frecuencia como un conjunto apilado de sacos aplanados llamados cisternas. Los subcompartimientos del aparato de Golgi difieren entre sí de acuerdo con las enzimas que contienen. La mayoría de las enzimas son glucosidasas y glucosilo-transferasas implicadas en la modificación de los hidratos de carbono unidos por el N o el O a las proteínas secretadas durante su tránsito en el aparato de Golgi. En su totalidad, el complejo de Golgi opera como una línea de ensamblaje en la que las proteínas se mueven en secuencia a través del complejo, sirviendo las cadenas de hidratos de carbono modificadas en un compartimento como sustratos para las enzimas modificadoras del compartimento siguiente (véase la Fig. 14-14 para una secuencia representativa de los pasos de modificación).

Durante mucho tiempo se pensó que el complejo de Golgi era un conjunto esencialmente estático de compartimientos con pequeñas vesículas de transporte que llevaban las proteínas secretadas hacia adelante, desde el Golgi *cis* hasta el Golgi *medial* y desde el Golgi *medial* hasta el Golgi *trans*. De hecho, la microscopia electrónica muestra que muchas pequeñas vesículas asociadas con el complejo de Golgi parecen

FIGURA 14-14 Procesamiento de las cadenas de oligosacáridos ligadas al N-terminal en las glucoproteínas dentro de las cisternas del *cis*-Golgi, el Golgi *medial* y el *trans*-Golgi en las células de los vertebrados.

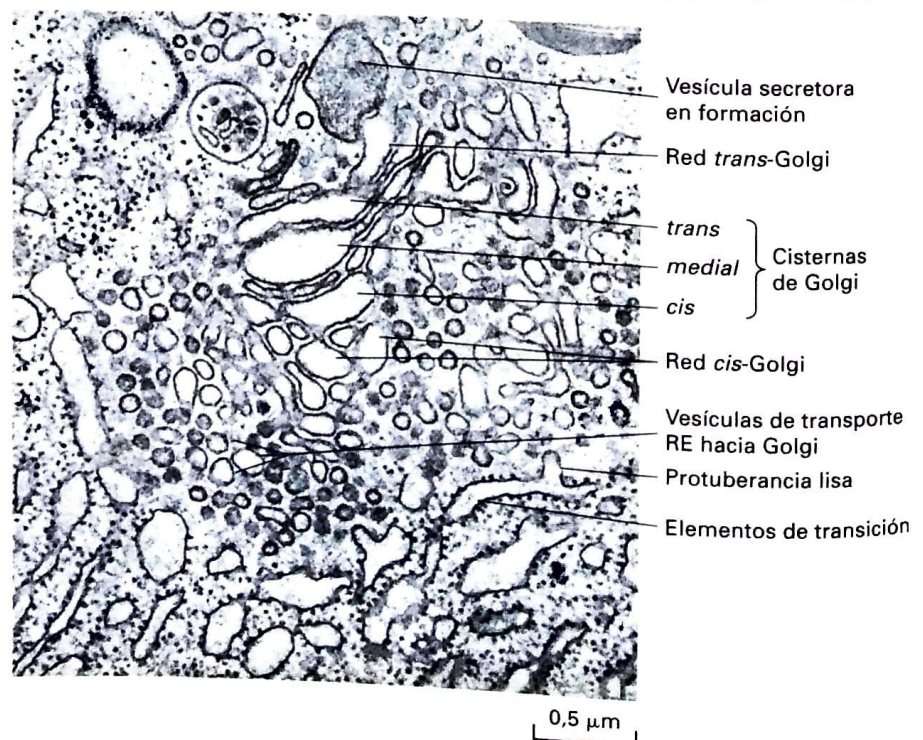
Las enzimas que catalizan cada paso se localizan en los compartimientos indicados. Después de la eliminación de tres residuos de manosa en el *cis*-Golgi (paso 1), la proteína se mueve por maduración de las cisternas al Golgi *medial*. Aquí, tres residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) se añaden (pasos 2 y 3), se eliminan dos residuos más de manosa (paso 4) y se añade una única fucosa (paso 5). El procesamiento se completa en el *trans*-Golgi por la adición de tres residuos de galactosa (paso 6) y, finalmente, por la unión de un residuo de ácido N-acetilneuramínico a cada uno de los residuos de galactosa (paso 7). Transferasas específicas añaden azúcares al oligosacárido, uno a la vez, a partir de precursores de nucleótidos del azúcar importados desde el citosol. Esta vía representa los eventos de procesamiento del aparato de Golgi para una glucoproteína de mamífero típico. Las variaciones en la estructura de los oligosacáridos unidos al N pueden resultar a partir de diferencias en los pasos de procesamiento en el aparato de Golgi. (Véase R. Kornfeld y S. Kornfeld, 1985, *Ann. Rev. Biochem.* 45:631).



mover proteínas de un compartimiento de Golgi al otro (Fig. 14-15); sin embargo, actualmente se sabe que estas vesículas median el transporte retrógrado recuperando enzimas del RE o del aparato de Golgi de un compartimiento posterior y transportándolas a un compartimiento previo en la vía secretora; así, el aparato de Golgi parece tener una organización muy dinámica, formando continuamente vesículas de transporte aunque solamente en dirección retrógrada. Para ver los efectos que este transporte retrógrado tiene en la organización del aparato de Golgi consideremos el efecto neto del compartimiento de Golgi *medial* a medida que las enzimas del Golgi *trans* se mueven desde el Golgi *medial* mientras que las enzimas del Golgi *medial* son transportadas al *cis*-Golgi. En este proceso, el Golgi *medial* adquiere enzimas del *trans*-

VIDEO: Modelo tridimensional de un complejo de Golgi

FIGURA EXPERIMENTAL 14-15 Microfotografía electrónica del complejo de Golgi en una célula exocrina pancreática que revela las vesículas de transporte secretoras y retrógradas. Puede verse una vesícula secretora grande formándose desde la red *trans*-Golgi. Los elementos del RE rugoso se encuentran en la parte inferior izquierda de esta microfotografía. Adyacentes al RE rugoso se encuentran los elementos de transición desde los cuales parecen estar brotando protuberancias de elementos de transición lisos. Estos brotes forman las pequeñas vesículas que transportan las proteínas de secreción del RE rugoso al complejo de Golgi. Interdispersas entre las cisternas del complejo de Golgi se encuentran otras vesículas pequeñas, que ahora se sabe que funcionan en el transporte retrógrado y no en el anterógrado. (Cortesía de G. Palade)



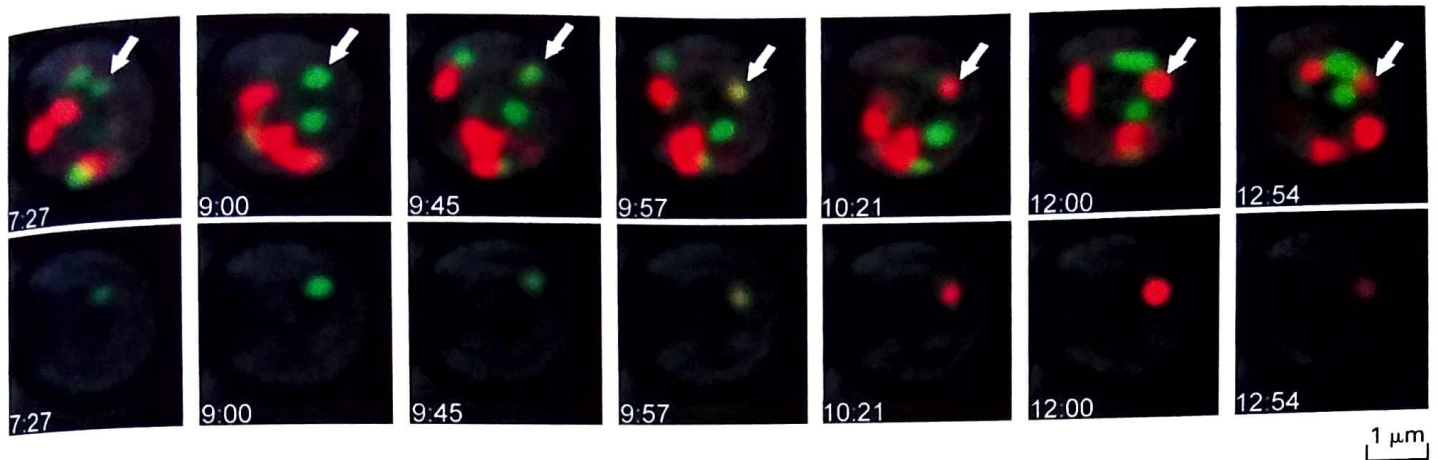


FIGURA EXPERIMENTAL 14-16 Proteínas de fusión marcadas con fluorescencia demuestran la maduración de las cisternas de Golgi en una levadura viva. Las levaduras que expresan la proteína temprana de Golgi Vrg4 se fusionaron a la PFV (fluorescencia verde) y aquellas que expresan la proteína tardía de Golgi Sec7 se fusionaron a la DsRed (fluorescencia roja) y se muestran por microscopía invertida de epifluorescencia. La serie de imágenes de la parte superior, tomadas aproximadamente con intervalos de un minuto, muestra un conjunto de cisternas de Golgi que en un momento se encuentran marcadas con la Vrg4 o la Sec7. La serie de imágenes inferiores muestra una

cisterna de Golgi aislada solo mediante procesamiento digital de la imagen. En primer término, solo la Vrg4-PFV se localiza en las cisternas aisladas; luego, solo la Sec7-DsRed se localiza en la cisterna aislada, después de un breve lapso en el cual ambas se colocaron en este compartimiento. Este experimento es una demostración directa de la hipótesis de maduración de las cisternas, que muestra que la composición de las cisternas individuales sigue un proceso de maduración caracterizado por la pérdida de proteínas tempranas del aparato de Golgi y la ganancia de proteínas tardías de este. (De Losev y cols., 2006, *Nature* 441:1002)

Golgi mientras pierde enzimas del Golgi *medial* en el *cis*-Golgi, y así, progresivamente, se transforma en un nuevo compartimiento *trans*-Golgi. De este modo, las proteínas carga de secreción modifican los hidratos de carbono en el orden secuencial adecuado sin moverse de una cisterna a otra por transporte vesicular anterógrado.

La primera evidencia de que el transporte hacia adelante de las proteínas carga del *cis*-Golgi al *trans*-Golgi ocurre por un mecanismo progresivo de este tipo, llamado *maduración de las cisternas*, provino de un cuidadoso análisis microscópico sobre la síntesis de las escamas de las algas. Estas glucoproteínas de la pared celular se ensamblan, en el *cis*-Golgi, en grandes complejos visibles al microscopio electrónico. Al igual que otras proteínas secretoras, las escamas recién sintetizadas se mueven desde el *cis* hacia el *trans*-Golgi, pero pueden ser de un tamaño veinte veces mayor que el de las vesículas de transporte habituales que brotan desde las cisternas del aparato de Golgi. De forma semejante, en la síntesis de colágeno por los fibroblastos, con frecuencia se forman en la luz del *cis*-Golgi grandes agregados del precursor procolágeno (véase la Fig. 20-24). Los agregados de procolágeno son demasiado grandes para ser incorporados a pequeñas vesículas de transporte, y los investigadores nunca encontrarán agregados de este tipo en ellas. Estas observaciones muestran que el movimiento hacia adelante de estas y, quizás, de todas las proteínas secretadas desde un compartimiento de Golgi hacia el otro *no* ocurre vía vesículas pequeñas.

Una demostración particularmente elegante de la maduración de las cisternas en las levaduras saca partido de marcas fluorescentes de las cisternas en las levaduras saca partido de marcas fluorescentes de las cisternas en las levaduras saca partido de marcas fluorescentes de las cisternas en las levaduras. La Figura 14-16 muestra cómo se comportan en la misma levadura una proteína residente del *cis*-Golgi, marcada con una proteína fluorescente verde, y una proteína *trans*-Golgi, marcada con una proteína fluorescente roja. En cualquier momento, cada cisterna del aparato de Golgi parece tener una diferente identidad de compartimiento, en el sentido de que contienen la proteína *cis*-Golgi o la proteína *trans*-Golgi, pero solo en raras ocasiones contienen ambas;

sin embargo, a lo largo del tiempo, una cisterna individual marcada con la proteína *cis*-Golgi puede mostrar la pérdida progresiva de esta y la adquisición de la proteína *trans*-Golgi. Esta conducta es exactamente la predicha por el modelo de maduración de las cisternas, en el cual la composición de una cisterna individual cambia a medida que las proteínas residentes en el aparato de Golgi se mueven de los compartimientos posteriores a los compartimientos iniciales.

Si bien la mayor parte del tránsito de las proteínas parece moverse a través del complejo de Golgi por un mecanismo de maduración de la cisterna, hay evidencia de que al menos una parte de las vesículas de transporte COPI que se desprenden de las membranas de Golgi contienen proteínas carga –más que enzimas de Golgi– y se mueven en dirección anterógrada –más que retrógrada–.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 14.3

Etapas tempranas de la vía secretora

- Las vesículas COPII transportan proteínas del RE rugoso al *cis*-Golgi; las vesículas COPI transportan proteínas en la dirección inversa (véase la Fig. 14-11).
- Las cubiertas COPII comprenden tres componentes: la proteína pequeña que une GTP Sar1, un complejo Sec23/Sec24 y un complejo Sec13/Sec31.
- Los componentes de la cubierta COPII se unen a proteínas carga de la membrana que contienen una señal diacídica o de clasificación de otro tipo en sus regiones citosólicas (véase la Fig. 14-12). Las proteínas carga solubles probablemente sean dirigidas a las vesículas COPII por la unión a un receptor proteico de la membrana.

- Muchas proteínas residentes en el RE solubles contienen la señal de clasificación KDEL. La unión de esta secuencia de recuperación a una proteína específica receptora en la membrana *cis*-Golgi recluta proteínas del RE mal clasificadas en las vesículas COPI retrógradas (véase la Fig. 14-13).

- Las proteínas de membrana necesarias para formar las vesículas COPII pueden ser recuperadas del *cis*-Golgi por las vesículas COPI. Una de las señales de clasificación que dirige las proteínas de membrana a las vesículas COPI es una secuencia KKXX, que se une a las subunidades de la cubierta COPI. Una señal de clasificación diarginina distintiva opera por un mecanismo similar.

- Las vesículas COPI también llevan proteínas Golgi residentes de compartimientos tardíos a compartimientos tempranos en el apilamiento de Golgi.

- Las proteínas solubles y de membrana avanzan a través del complejo de Golgi por maduración de las cisternas, un proceso de transporte anterógrado que depende de enzimas residentes en el aparato de Golgi que se mueven por transporte vesicular COPI en dirección retrógrada.

tardíos a los compartimientos iniciales de Golgi mantiene niveles suficientes de estas enzimas modificadoras de los hidratos de carbono en sus compartimientos funcionales. Finalmente, las proteínas carga adecuadamente procesadas llegan a la red *trans*-Golgi, el compartimiento más distal del aparato de Golgi; allí son clasificadas en uno entre varios tipos diferentes de vesículas para ser enviadas a su destino final. En esta sección analizamos los diferentes tipos de vesículas que brotan de la red *trans*-Golgi, los mecanismos que segregan las proteínas carga entre ellos y los eventos clave en el procesamiento que ocurren en etapas tardías de la vía secretora. Los distintos tipos de vesículas que brotan del *trans*-Golgi se resumen en la Figura 14-17.

Las vesículas cubiertas con clatrina o proteínas adaptadoras median el transporte desde el *trans*-Golgi

Las vesículas mejor caracterizadas que brotan de la red *trans*-Golgi (RTG) tienen una cubierta de dos capas: una capa externa, compuesta de la proteína fibrosa clatrina, y una capa interna, compuesta de *complejos de proteína adaptadora* (PA). Las moléculas de clatrina purificadas que tienen una forma de tres extremidades se llaman *trisqueliones* (del griego, por 'tres patas'; Fig. 14-18a). Cada extremidad contiene una cadena pesada de clatrina (180 000 PM) y una cadena liviana (~35 000-40 000 PM). Los trisqueliones se polimerizan para formar una red poligonal con una curvatura intrínseca (Fig. 14-18b). Cuando la clatrina se polimeriza sobre una membrana donante, lo hace asociándose con complejos PA, que llenan el espacio entre la red de clatrina y la membrana. Cada complejo PA (340 000 PM) contiene una copia de cada

14.4 Etapas finales de la vía secretora

A medida que las proteínas carga se mueven del *cis*-Golgi al *trans*-Golgi por maduración de las cisternas, sufren modificaciones en sus cadenas de oligosacáridos por acción de las enzimas residentes en el aparato de Golgi. El tránsito retrógrado de vesículas COPI de los compartimientos

FIGURA 14-17 Tránsito de vesículas desde la red *trans*-Golgi mediada por vesículas. Las vesículas COPI (púrpura) median el transporte retrógrado dentro del aparato de Golgi (1). Las proteínas que funcionan en la luz o en la membrana del lisosoma son transportadas desde la red *trans*-Golgi vía vesículas cubiertas con clatrina (rojo) (3); después de perder la cubierta, estas vesículas se fusionan con los endosomas tardíos que entregan su contenido al lisosoma. La cubierta de la mayoría de las vesículas de clatrina contiene proteínas adicionales (complejos AP que no están indicados aquí). Algunas vesículas de *trans*-Golgi que llevan carga destinada al lisosoma se fusionan con el lisosoma directamente (2), evitando pasar por el endosoma. Estas vesículas están cubiertas con un tipo de complejo PA (azul); se desconoce si las vesículas contienen, además, clatrina. Las proteínas de la cubierta que rodean las vesículas de secreción constitutivas (4) y reguladas (5) aún no se han caracterizado; estas vesículas llevan las proteínas secretadas y las proteínas de membrana de la red *trans*-Golgi a la superficie de la célula.

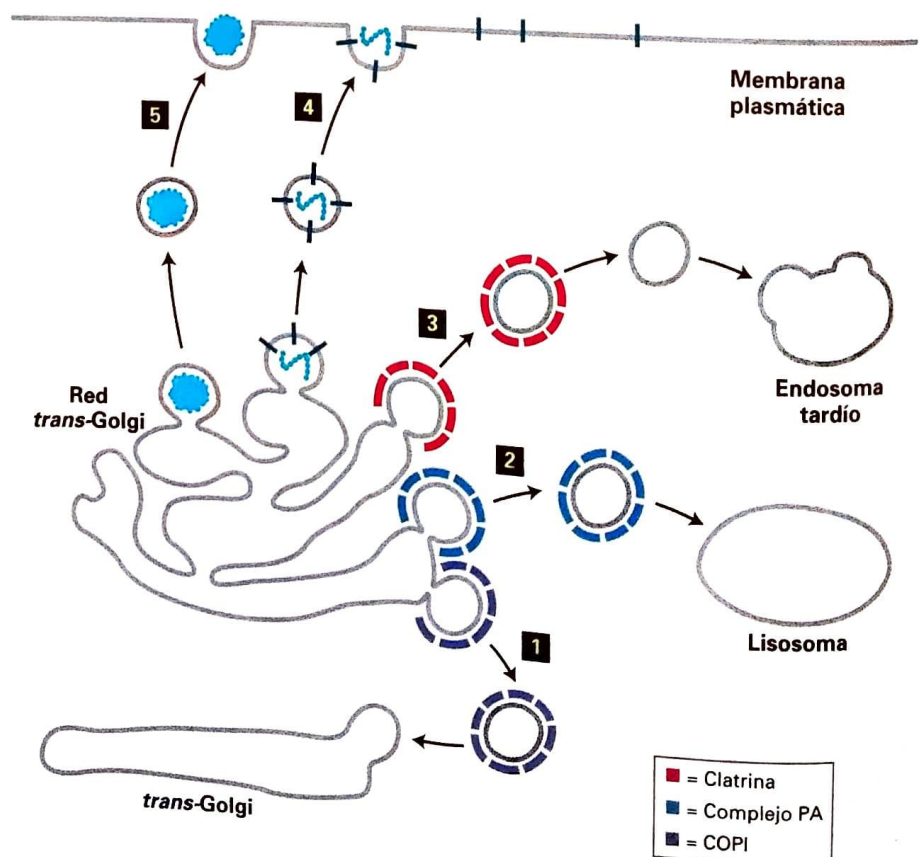
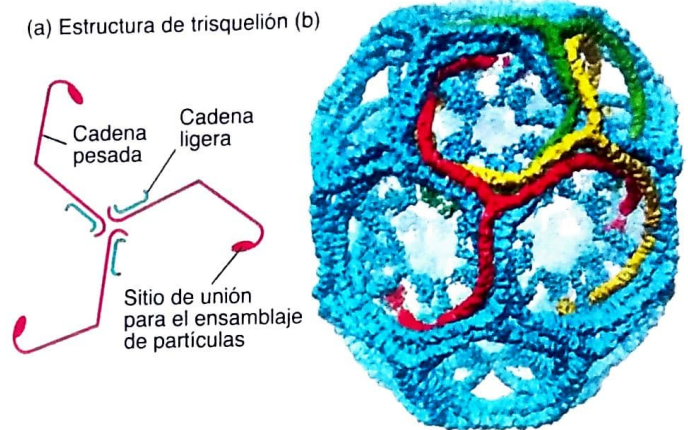


FIGURA 14-18 Estructura de las cubiertas de clatrina. (a) Una molécula de clatrina, llamada trisquelión, está compuesta de tres cadenas pesadas y tres cadenas ligeras. Tiene una curvatura intrínseca debido a la curva de las cadenas pesadas. (b) Las cubiertas de clatrina se formaron *in vitro* al mezclar las cadenas pesadas y ligeras purificadas de la clatrina con los complejos PA2 en ausencia de membranas. Las microfotografías crio electrónicas de más de 1 000 partículas en barril de clatrina hexagonales ensambladas se analizaron por procesamiento digital de imágenes para generar una representación estructural promedio. La imagen procesada muestra solamente las cadenas pesadas de la clatrina en una estructura compuesta por 36 trisqueliones. Tres trisqueliones representativos están resaltados en rojo, amarillo y verde. Parte de los complejos PA2 empaquetados en el interior de la jaula de clatrina también son visibles en esta representación. (Véase B. Pishvaee y G. Payne, 1998, *Cell* 95:443. La parte [b], tomada de Fotin y cols., 2004, *Nature* 432:573).



una de las 4 subunidades proteicas adaptadoras distintas. Una asociación específica entre el dominio globular en el extremo de cada cadena pesada de clatrina en un trisquelión y una subunidad del complejo PA promueven el coensamblaje de los trisqueliones de clatrina con los complejos PA como suma a la estabilidad de la cubierta completa de la vesícula.

Al unirse a la cara citosólica de las proteínas de la membrana, las proteínas adaptadoras determinan qué proteínas carga serán específicamente incluidas (o se excluirán) de una vesícula de transporte en gemación. Se conocen tres complejos PA distintos (PA1, PA2, PA3), cada uno con cuatro subunidades de proteínas diferentes, si bien relacionadas. Recientemente, un segundo tipo general de proteína adaptadora, conocida como GGA, mostró contener en un polipéptido de 70 000 PM tanto elementos de clatrina como de unión a la carga, semejantes a los que están presentes en los complejos heterotetraméricos PA de mucho mayor tamaño. Se ha encontrado que vesículas que contienen cada tipo de complejo adaptador PA o GGA median pasos de transporte específicos (véase el Cuadro 14-1). Todas las vesículas cuyas cubiertas contienen uno de estos complejos utilizan ARF para iniciar el ensamblaje de la cubierta sobre la membrana donante. Como se analizó previamente, la ARF inicia también el ensamblaje de las cubiertas COPI. Las características adicionales de los factores de membrana o proteicos que determinan qué tipo de cubierta se ensamblará después de la unión de ARF no se comprenden completamente en la actualidad.

Las vesículas que brotan desde la red *trans*-Golgi en su camino al lisosoma por medio del endosoma tardío (véase la Fig. 14-17, paso 3) tienen cubiertas de clatrina asociadas con PA1 o con GGA. Tanto PA1 como GGA se unen al dominio citosólico de las proteínas carga en la membrana donante. Las proteínas de membrana que contienen una secuencia Tyr-X-X-Φ, en la que X es un aminoácido y Φ es un aminoácido hidrófobo, se reclutan en vesículas clatrina/PA1 que brotan de la red *trans*-Golgi. Esta señal de clasificación YXXΦ interactúa con una de las subunidades PA1 de la cubierta de la vesícula. Como analizaremos en la siguiente sección, las vesículas con cubierta clatrina/PA2 que brotan de la membrana plasmática durante la endocitosis también pueden reconocer la señal de clasificación YXXΦ. Las vesículas cubiertas con proteínas GGA y clatrina se unen a las moléculas carga con un

tipo diferente de secuencia de clasificación. Las señales de clasificación citosólicas que se unen específicamente a la proteína adaptadora GGA incluyen Asp-X-Leu-Leu y Asp-Phe-Gly-X-Φ (en las que X y Φ se definen como previamente).

Algunas vesículas que brotan desde la red *trans*-Golgi tienen cubiertas compuestas por el complejo PA3. Aunque el complejo PA3 contiene un sitio de unión para clatrina similar a los complejos PA1 y PA2, no queda claro si la clatrina es necesaria para el funcionamiento de las vesículas que contienen PA3, dado que las versiones mutantes de PA3 que carecen del sitio de unión a clatrina parecen ser funcionales. Las vesículas cubiertas por PA3 median el tráfico al lisosoma, pero parecen evitar el endosoma tardío y se fusionan directamente con la membrana del lisosoma (véase la Fig. 14-17, paso 2). En cierto tipo de células, estas vesículas PA3 median el transporte proteico a compartimientos de almacenamiento especializados y relacionados con el lisosoma; por ejemplo, la PA3 es necesaria para la entrega de proteínas a los melanosomas que contienen el pigmento negro melanina de las células de la piel y a las vesículas de almacenamiento de las plaquetas en los megacariocitos, células grandes que se fragmentan en docenas de plaquetas. Los ratones con mutaciones en cualquiera de las dos diferentes subunidades de la PA3 no solo tienen una pigmentación anormal en la piel, sino que también presentan trastornos de sangrado. Esto último ocurre porque las roturas en los vasos sanguíneos no pueden ser reparadas sin las plaquetas que contienen vesículas de almacenamiento normales.

Se requiere dinamina para que las vesículas de clatrina se desprendan

Un paso fundamental en la formación de una vesícula de transporte que aún no hemos considerado es el modo en que el brote de la vesícula se desprende de la membrana donante. En el caso de las vesículas de clatrina/PA cubiertas, una proteína citosólica llamada *dinamina* es esencial para la liberación de vesículas completas. En las etapas finales de la formación del brote, la dinamina se polimeriza alrededor de la porción del cuello y, luego, hidroliza GTP. Se cree que la energía derivada de esta hidrólisis impulsa un cambio de conformación en la dinamina que estira el cuello de la vesícula hasta que esta se desprende

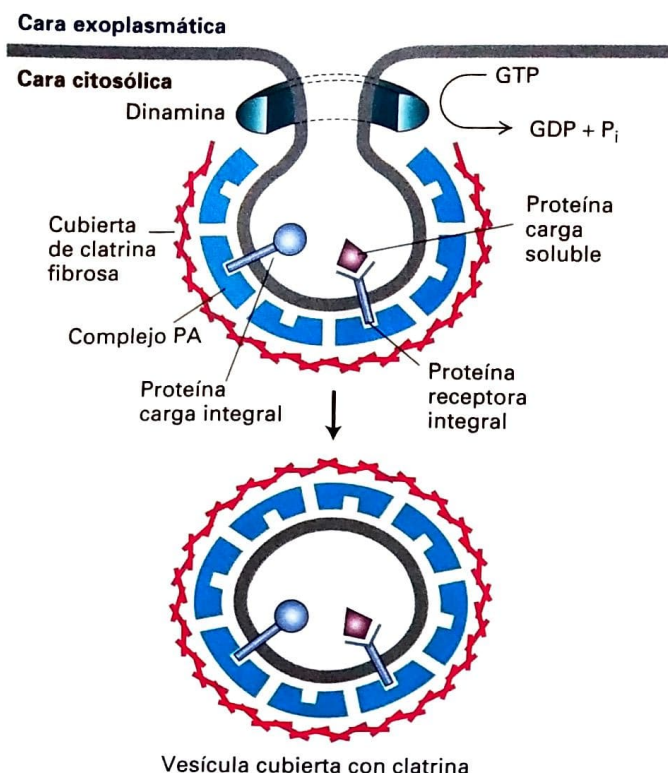


FIGURA 14-19 Modelo de la liberación de las vesículas cubiertas con clatrina/AP para su liberación mediada por dinamina. Después de que se forma un brote de una vesícula, la dinamina se polimeriza al rededor de su cuello. Por un mecanismo que aún no se comprende bien, la hidrólisis de GTP catalizada por dinamina conduce a la liberación de la vesícula desde la membrana donante. Note que las proteínas de la membrana en la membrana donante se incorporan a las vesículas interactuando con los complejos PA de la cubierta. (Adaptado de K. Takel y cols., 1995, *Nature* 374:186).

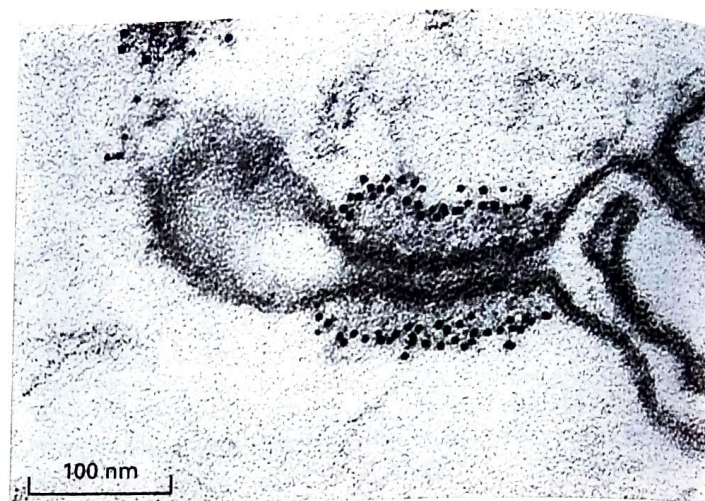


FIGURA EXPERIMENTAL 14-20 La hidrólisis del GTP por la dinamina es necesaria para el desprendimiento de las vesículas cubiertas de clatrina en extractos libres de célula. Un preparado de terminales nerviosas sometido a endocitosis extensa fue lisado por tratamiento con agua destilada e incubado con GTP- γ -S, un derivado no hidrolizable del GTP. Después de cortarla, la preparación fue tratada con un anticuerpo antidinamina marcado con oro y visualizada en el microscopio electrónico. Esta imagen, que muestra un brote de clatrina AP de cuello alargado con dinamina polimerizada rodeándolo, prueba que pueden formarse brotes en ausencia de hidrólisis de GTP pero que las vesículas no pueden desprenderse. La polimerización extensa de la dinamina que ocurre en presencia del GTP- γ -S probablemente no ocurra durante el proceso de formación normal. (De K. Takel y cols., 1995, *Nature* 374:186; cortesía de Pietro De Camilli).

(Fig. 14-19). Resulta notable que las vesículas COPI y COPII parecen desprenderse de las membranas donantes sin el auxilio de una GTPasa como la dinamina. Los experimentos de gemación in vitro sugieren que la dimerización de proteínas ARF impulsa el desprendimiento de las vesículas COPI, pero el mecanismo no se comprende.

La incubación de los extractos celulares con un derivado no hidrolizable de GTP proporciona una evidencia notable de la importancia de la dinamina en el desprendimiento de las vesículas de clatrina/PA2 durante la endocitosis. Este tratamiento conduce a la acumulación de brotes de vesículas cubiertas con clatrina, con cuellos excesivamente largos, rodeados por una dinamina polimérica, que no se desprenden (Fig. 14-20). De modo similar, las células que expresan formas mutantes de dinamina que no pueden unir GTP no forman vesículas cubiertas de clatrina y, en lugar de ello, se acumulan brotes de vesículas de cuellos alargados rodeadas con una dinamina polimerizada.

Como ocurre con las vesículas COPI y COPII, las vesículas de clatrina/PA pierden normalmente su cubierta poco después de su formación. Se cree que la Hsc70 citosólica, una proteína chaperona constitutiva presente en todas las células eucariontes, emplea energía derivada de la hidrólisis del ATP para impulsar la despolimerización de la cubierta de clatrina en los trisqueliones. La pérdida de la cubierta no solo libera los trisqueliones para volver a emplearse en la formación de vesículas adicionales, sino que también expone las v-SNARE para em-

plearlas en la fusión con membranas diana. Se piensa que los cambios de conformación que ocurren cuando las ARF pasan del estado unido a GTP a aquel unido a GDP son los que regulan el tiempo de despolimerización de la cubierta de clatrina. Aún no se comprende el modo en que la acción de la Hsc70 podría estar acoplada a la acción de la ARF.

Los residuos de manosa-6-fosfato dirigen proteínas solubles a los lisosomas

Como hemos visto, muchas de las señales de clasificación que dirigen el tránsito de las proteínas carga en la vía de secreción son secuencias cortas de aminoácido en la proteína diana. Por el contrario, la señal de clasificación que dirige las enzimas lisosómicas solubles de la red *trans*-Golgi al endosoma tardío es un residuo de hidrato de carbono, la *manosa-6-fosfato* (M6P), que se forma en el *cis*-Golgi. La adición y el procesamiento inicial de uno o más precursores de oligosacárido preformados, unidos a N en el RE rugoso, son los mismos para las enzimas lisosómicas que para las proteínas de membrana y secretadas, lo que resulta en cadenas con un núcleo $\text{Man}_8(\text{GlcNAc})_2$ (véase la Fig. 13-18). En el *cis*-Golgi, los oligosacáridos unidos al N presentes en la mayoría de las enzimas lisosómicas sufren una secuencia de reacción de dos pasos que genera residuos M6P (Fig. 14-21). La adición de residuos M6P a las cadenas de oligosacáridos de las enzimas lisosómicas solubles evita que estas proteínas sufran reacciones de procesamiento adicional características de las proteínas secretadas y de membrana (véase la Fig. 14-14).

Como se muestra en la Figura 14-22, la segregación de las enzimas lisosómicas que llevan al M6P con respecto a las proteínas se-

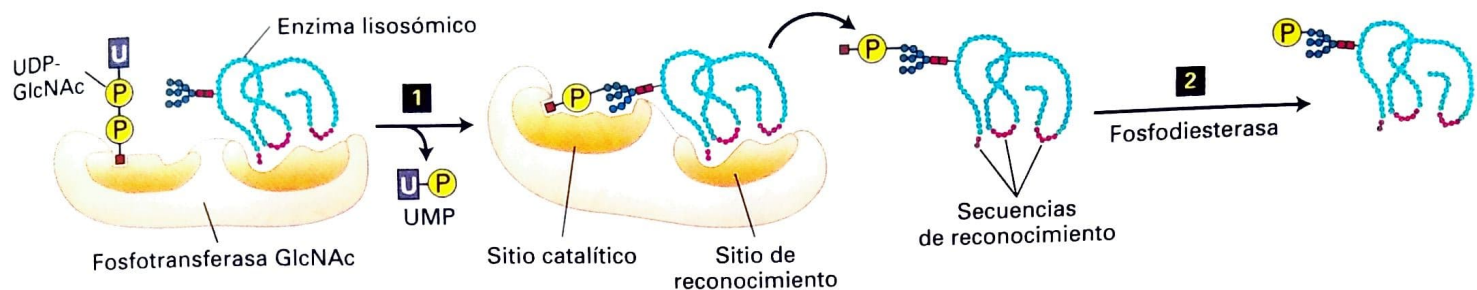


FIGURA 14-21 Formación de los residuos de manosa 6-fosfato (M6P) que dirigen las enzimas solubles hacia los lisosomas. Los residuos M6P que dirigen las proteínas a los lisosomas se generan en el *cis*-Golgi por acción de dos enzimas residentes en él. Paso **1**: una *N*-acetilglucosamina (GlcNAc) fosfotransferasa transfiere un grupo GlcNAc fosforilado al átomo de carbono 6 de uno o más residuos de manosa. Dado que solo las enzimas lisosómicas

contienen secuencias (en rojo) reconocidas y unidas por esta enzima, los grupos GlcNAc fosforilados se añaden específicamente a las enzimas lisosómicas. Paso **2**: después de la liberación de una proteína modificada desde la fosfotransferasa, una fosfodiesterasa elimina el grupo GlcNAc, dejando un grupo de manosa fosforilada en la enzima lisosómica. (Véanse A. B. Cantor y cols., 1992, *J. Biol. Chem.* **267**:23349, y S. Kornfeld, 1987, *FASEB J.* **1**:462).

cretadas y de membranas se produce en la red *trans*-Golgi. Allí, los receptores transmembranales para *manosa-6-fosfato* se unen a los residuos M6P de las proteínas destinadas a los lisosomas de modo muy estrecho y específico. Las vesículas de clatrina/PA1 que contienen el receptor M6P y unen enzimas lisosómicas se desprenden luego de la red *trans*-Golgi, pierden sus cubiertas y, posteriormente, se fusionan con el endosoma tardío mediante mecanismos que se describieron previamente. Dado que los receptores M6P pueden unir M6P al pH ligeramente ácido (~ 6,5) de la red *trans*-Golgi pero no a un pH inferior a 6, las enzimas lisosómicas unidas se liberan dentro de los endosomas tardíos que tienen un pH interno de 5,0-5,5. Adicionalmente, una fosfatasa que se encuentra dentro de los endosomas tardíos habitualmente elimina el fosfato de los residuos M6P de las enzimas lisosómicas, evitando cualquier nueva unión del receptor M6P que podría ocurrir a pesar del bajo pH presente en los endosomas. La gemación de vesículas desde los endosomas tardíos recicla el receptor M6P nuevamente a la red *trans*-Golgi o, en ocasiones, a la superficie celular. Finalmente, los endosomas tardíos maduros se fusionan con los lisosomas entregando las enzimas lisosómicas a su destino final.

La clasificación de las enzimas lisosómicas solubles en la red *trans*-Golgi (Fig. 14-22, pasos **1-4**) comparte muchas de las características del tránsito entre el RE y el *cis*-Golgi mediado por las vesículas COPII y COPI. Primero, la manosa-6-fosfato actúa como una señal de clasificación al interactuar con el dominio luminal de una proteína receptora en la membrana donante. Segundo, los receptores sumergidos en la membrana con los ligandos unidos se incorporan a las vesículas apropiadas —en este caso, GGA o vesículas de clatrina que contienen PA1— al interactuar con la cubierta de la vesícula. Tercero, estas vesículas de transporte se fusionan solamente con un orgánulo específico —en este caso, el endosoma tardío— como resultado de las interacciones entre los v-SNARE específicos y los t-SNARE. Y, finalmente, los receptores de transporte intracelular se reciclan después de disociarse de sus ligandos unidos.

El estudio de las enfermedades de almacenamiento lisosómico reveló componentes centrales de la vía de clasificación lisosómica



Un grupo de enfermedades genéticas llamadas *enfermedades de almacenamiento lisosómico* son causadas por la ausencia de una

o más enzimas lisosómicas. Como resultado, glucolípidos y componentes extracelulares no digeridos, que normalmente se degradarían por acción de las enzimas lisosómicas, se acumulan dentro de estos orgánulos como grandes inclusiones. Los pacientes con enfermedades de almacenamiento lisosómico pueden tener una diversidad de anomalías de desarrollo fisiológicas y neurológicas, dependiendo del tipo y la gravedad del defecto de almacenamiento. La *enfermedad de células I* es un tipo particularmente grave de enfermedad de almacenamiento lisosómico en el cual faltan múltiples enzimas en los lisosomas. Las células de los individuos afectados carecen de la *N*-acetilglucosamina fosfotransferasa necesaria para la formación de los residuos M6P de las enzimas lisosómicas en el *cis*-Golgi (véase la Fig. 14-21). La comparación bioquímica de las enzimas lisosómicas de individuos normales con las de estos pacientes con enfermedad de la célula I llevó al descubrimiento inicial de la manosa-6-fosfato como la señal de clasificación lisosómica. La ausencia de esta señal de clasificación M6P hace que las enzimas lisosómicas en los pacientes con célula I se secreten en lugar de ser seleccionadas y secuestradas para el interior de los lisosomas.

Cuando se hacen crecer fibroblastos de los pacientes con enfermedad de célula I en un medio que contiene enzimas lisosómicas con residuos de M6P, las células enfermas adquieren un contenido casi normal de enzimas lisosómicas intracelulares. Este hallazgo indica que la membrana plasmática de estas células contiene receptores para M6P que pueden internalizar las enzimas lisosómicas fosforiladas extracelulares mediante endocitosis mediada por receptor. Este proceso, empleado por muchos receptores de la superficie celular para internalizar proteínas o partículas en la célula, es analizado con detalle en la siguiente sección. Se sabe ahora que, aun en las células normales, algunos receptores M6P son transportados a la membrana plasmática y algunas enzimas lisosómicas fosforiladas se secretan (véase la Fig. 14-22). Las enzimas secretadas pueden ser recuperadas por endocitosis mediada por receptor y dirigidas a los lisosomas. Así, esta vía recupera cualquier enzima lisosómica que escape de la clasificación habitual por la M6P.

Los hepatocitos de los pacientes con enfermedad de células I contienen un complemento normal de enzimas lisosómicas y no contienen inclusiones, aun cuando estas células son defectuosas en la fosforilación de la manosa. Este hallazgo implica que los hepatocitos (el tipo celular más abundante en el hígado) emplean una

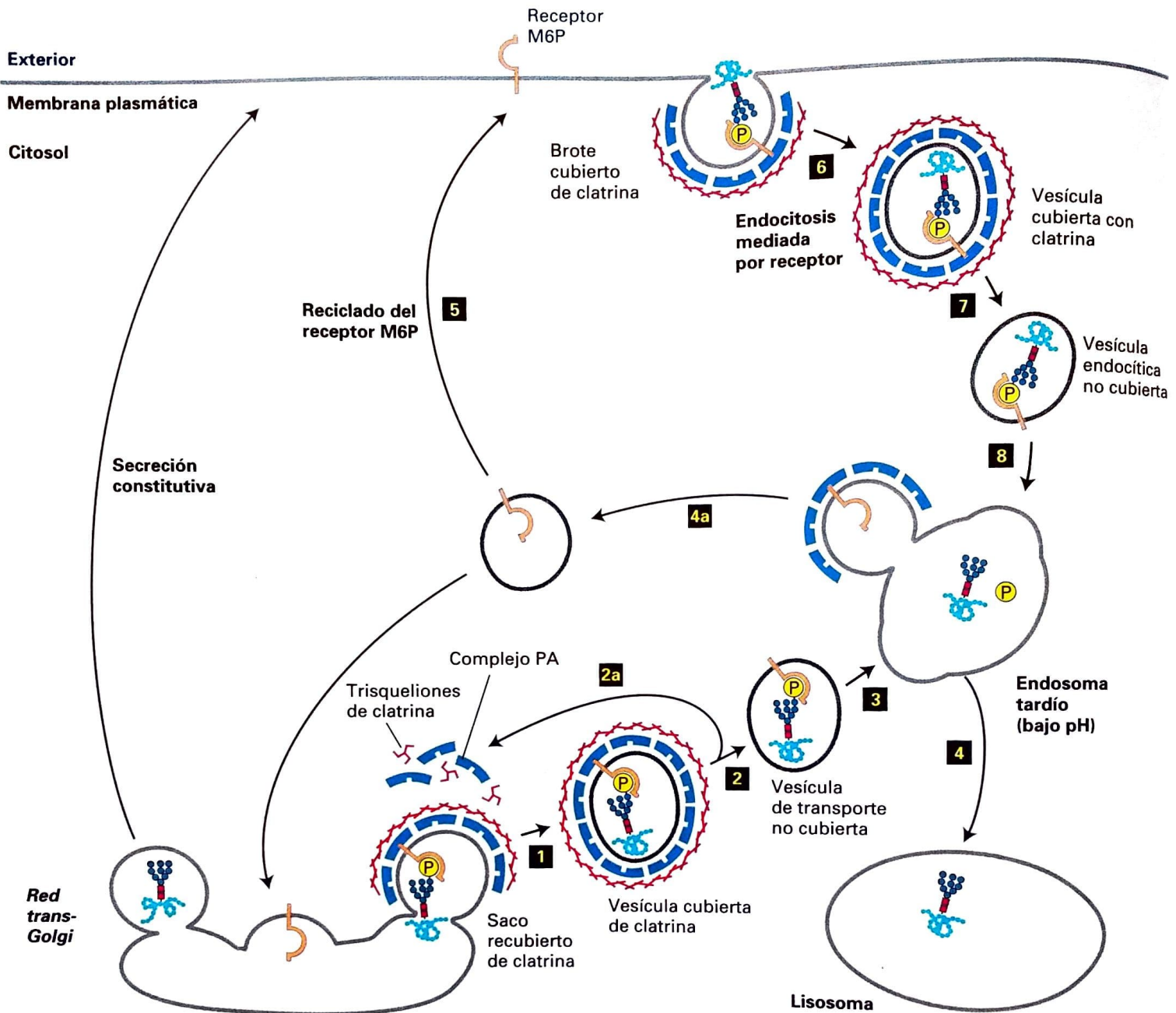


FIGURA 14-22 Tránsito de enzimas lisosómicas solubles desde la red trans-Golgi y la superficie celular hacia los lisosomas. Las enzimas lisosómicas recién sintetizadas producidas en el RE adquieren residuos de manosa 6-fosfato (M6P) en el *cis*-Golgi (véase la Fig. 14-21). Por simplicidad se muestra solo una cadena de oligosacárido fosforilada, aunque las enzimas lisosómicas típicamente tienen muchas cadenas de este tipo. En la red trans-Golgi, las proteínas que llevan la señal de clasificación M6P, por lo tanto, se dirigen a las vesículas con clatrina/PA1 (paso 1). Las vesículas liberadas, rodeadas de cubierta, se despolimerizan rápidamente (paso 2) y las vesículas de transporte descubiertas se fusionan con los endosomas tardíos (paso 3). Después de que las enzimas fosforiladas se disocian de los receptores M6P y se desfosforilan,

los endosomas tardíos se fusionan con un lisosoma (paso 4). Note que las proteínas de la cubierta y los receptores M6P se reciclan (pasos 2a y 4a) y algunos receptores son entregados a la superficie celular (paso 5). Las enzimas lisosómicas fosforiladas ocasionalmente son clasificadas desde el trans-Golgi hacia la superficie de la célula y secretadas. Estas enzimas secretadas pueden ser recuperadas mediante endocitosis mediada por receptor (pasos 6-8), un Golgi hacia los lisosomas. (Véanse G. Griffiths y cols., 1988, *Cell* 52:329; S. Kornfeld, 1992, *Ann. Rev. Biochem.* 61:307, y G. Griffiths y J. Gruenberg, 1991, *Trends Cell. Biol.* 1:5).

via independiente de la M6P para clasificar las enzimas lisosómicas. La naturaleza de esta vía, que también puede operar en otros tipos celulares, se desconoce. ■

La agregación de proteínas en el *trans*-Golgi puede funcionar para la clasificación de las proteínas en vesículas de secreción reguladas

Como se ha señalado en la introducción del capítulo, todas las células eucariotas secretan continuamente ciertas proteínas, en un proceso llamado, por lo común, *secreción constitutiva*. Las células secretoras especializadas también almacenan otras proteínas en vesículas, y las secretan solamente cuando son disparadas por un estímulo específico; un ejemplo de tal *secreción regulada* ocurre en las células β del páncreas, que almacenan insulina recién sintetizada en vesículas de secreción especializada y secretan la insulina en respuesta a un incremento en la glucosa sanguínea (véase la Fig. 16-38). Estas y otras células secretoras utilizan simultáneamente dos tipos diferentes de vesículas para mover las proteínas desde la red *trans*-Golgi hacia la superficie celular: las vesículas de transporte regulado, con frecuencia llamadas, simplemente, vesículas secretoras, y las vesículas de transporte no regulado, llamadas también vesículas secretoras constitutivas.

Un mecanismo común parece clasificar las proteínas reguladas, tan diversas como la ACTH (hormona adrenocorticotrófica), la insulina y el tripsinógeno, en vesículas de secreción reguladas. La evidencia de un mecanismo común proviene de experimentos en los cuales se usan técnicas de DNA recombinante para inducir la síntesis de insulina y tripsinógeno en células de tumores hipofisarios que ya sintetizaban ACTH. En ellas, que normalmente no expresan insulina o tripsinógeno, las tres proteínas se segregan a las mismas vesículas de secreción reguladas y se secretan juntas cuando una hormona se une a un receptor en las células hipofisarias y provoca un incremento en el Ca^{2+} citosólico. Si bien estas tres proteínas no comparten secuencias idénticas de aminoácidos, que podrían servir como una secuencia de clasificación, deben tener cierta característica en común que señala su incorporación en las vesículas de secreción regulada.

La evidencia morfológica sugiere que la clasificación a la vía regulada está controlada por la segregación selectiva de las proteínas; por ejemplo, las vesículas inmaduras de esta vía —las que recién han brotado de la red *trans*-Golgi— contienen agregados difusos de proteínas secretadas visibles al microscopio electrónico. Estos agregados también están presentes en las vesículas en proceso de gemación, lo cual indica que las proteínas destinadas a las vesículas secretoras reguladas se agregan de forma selectiva antes de su incorporación a las vesículas.

Otros estudios han mostrado que las vesículas secretoras de las células de secreción de los mamíferos contienen tres proteínas, la *cromogranina A*, la *cromogranina B* y la *secretogranina II*, que, en conjunto, forman agregados cuando se las incuba en las condiciones iónicas (pH 6,5 y Ca^{2+} 1 mM) que, se cree, están presentes en la red *trans*-Golgi; tales agregados no se forman a pH neutro, presente en el RE. La agregación selectiva de las proteínas secretadas reguladas junto con la *cromogranina A*, la *cromogranina B* o la *secretogranina II* sería la base de la clasificación de estas proteínas en las vesículas de secreción regulada. Las proteínas secretadas que no se asocian con estas proteínas y, así, no forman agregados serían clasificadas en vesículas de transporte no reguladas, por descarte.

Algunas proteínas son sometidas a procesamiento proteolítico después de abandonar el *trans*-Golgi

Para algunas proteínas por ser secretadas (p. ej., la hormona de crecimiento) y ciertas proteínas de membrana de los virus (p. ej., la glucoproteína del VSV), la eliminación de la secuencia N-terminal del RE desde la cadena naciente es la única escisión proteolítica conocida necesaria para convertir el polipéptido en una especie activa madura (véase la Fig. 13-6); sin embargo, algunas proteínas de membrana y muchas proteínas solubles secretadas se sintetizan en principio como precursores inactivos, de vida relativamente larga, llamados *proproteínas*, que requieren procesamiento proteolítico adicional para generar las proteínas activas maduras. Ejemplo de proteínas que sufren tal procesamiento son las enzimas lisosómicas solubles, muchas proteínas de membrana —como la hemaglutinina de la gripe (HA)— y proteínas secretadas como la albumina sérica, la insulina, el glucagón y el factor de apareamiento α de las levaduras. En general, la conversión proteolítica de una *proproteína* a la *proteína* madura correspondiente ocurre después de que la *proproteína* ha sido clasificada en la red *trans*-Golgi a las vesículas apropiadas.

En el caso de las enzimas lisosómicas solubles, las *proproteínas* son llamadas *proenzimas* y son seleccionadas por el receptor M6P como enzimas inactivas catalíticamente. En el endosoma tardío o lisosoma, una *proenzima* sufre una escisión proteolítica que genera un polipéptido más pequeño pero con actividad enzimática. El retardo en la activación de las *proenzimas* lisosómicas hasta que llegan al lisosoma evita que estas digieran macromoléculas en compartimientos previos de la vía secretora.

Las vesículas maduras que llevan proteínas secretadas a la superficie celular se forman normalmente por la fusión de varias vesículas inmaduras que contienen *proproteínas*. La escisión proteolítica de las *proproteínas* como la *proinsulina* se produce en las vesículas después de que estas se han alejado de la red *trans*-Golgi (Fig. 14-23). Las *proproteínas* de la mayoría de las proteínas secretadas constitutivamente (p. ej., albúmina) se escinden solamente una vez en un sitio C-terminal a una secuencia de reconocimiento dibásica tal como Arg-Arg o Lys-Arg (Fig. 14-24a). El procesamiento proteolítico de las proteínas cuya secreción está regulada generalmente conlleva escisiones adicionales. En el caso de la *proinsulina*, múltiples cortes de la cadena polipeptídica dan como resultado la cadena BN-terminal y la cadena AC-terminal de la insulina madura, que están unidas por puentes disulfuro, y el péptido C central, que se pierde y, posteriormente, se degrada (Fig. 14-24b).

El logro de identificar las proteasas responsables de este procesamiento en las proteínas secretadas provino del análisis de las levaduras con una mutación en el gen *KEX2*. Estas células mutantes sintetizaron el precursor del factor de apareamiento α , pero no podían procesarlo proteolíticamente a la forma funcional y, así, eran incapaces de aparearse con las células del tipo opuesto (véase la Fig. 16-23). El gen silvestre *KEX2* codifica una endoproteasa que corta el precursor del factor α en el sitio C-terminal a los residuos Arg-Arg y Lys-Arg. Los mamíferos contienen una familia de endoproteasas homólogas a la *KEX2* de las levaduras, todas las cuales cortan una cadena proteica en el lado C-terminal de una secuencia Arg-Arg o Lys-Arg. Una, llamada *furina*, se encuentra en todas las células de mamífero y procesa las proteínas, como albúmina, secretadas por la vía continua; por el contrario, las *endoproteasas* *PC2* y *PC3* están presentes solo en las células que exhiben secreción regulada; estas enzimas se localizan en las

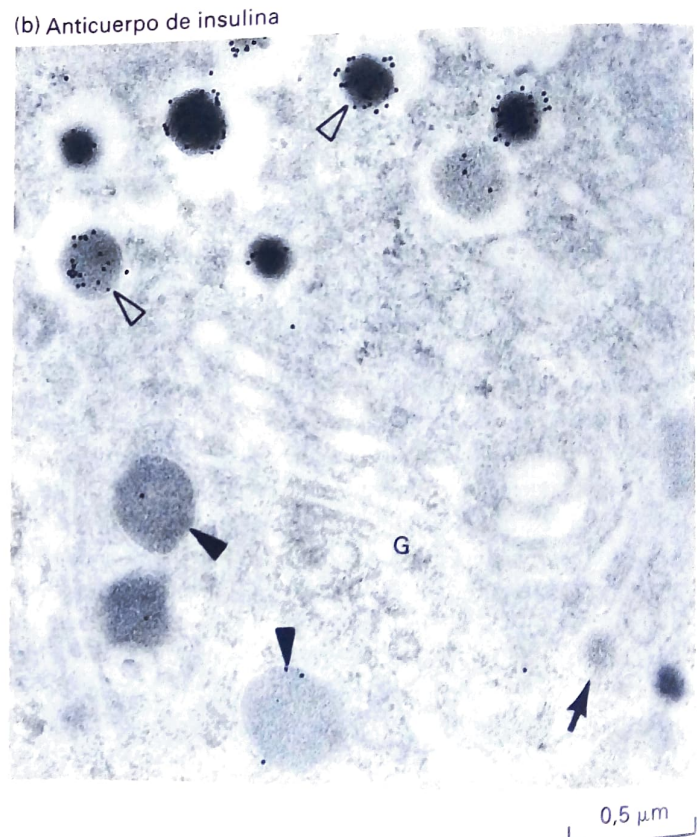
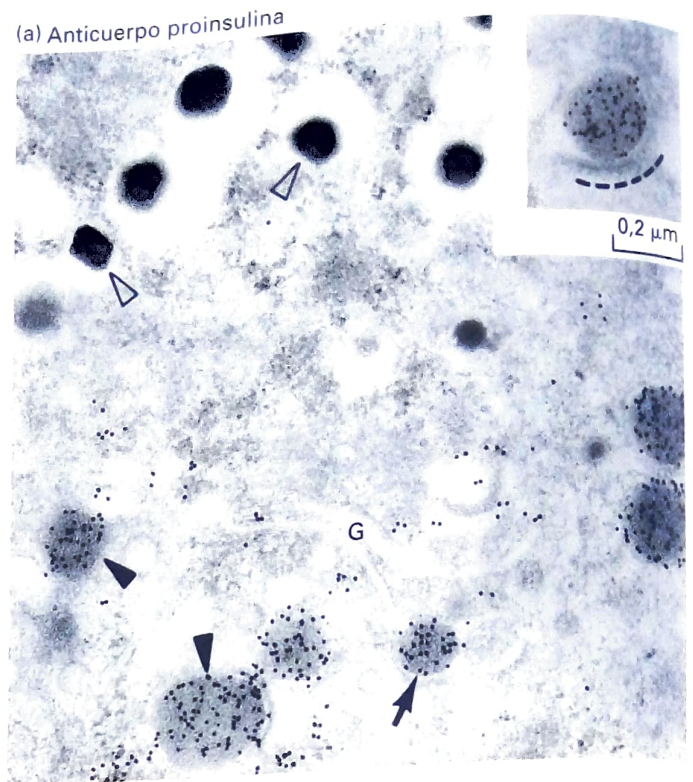
FIGURA EXPERIMENTAL 14-23 Fragmentación proteolítica de la proinsulina en vesículas secretoras después de su gemación desde la red *trans*-Golgi. Los cortes seriados de la región del aparato de Golgi de una célula secretora de insulina se tiñeron con (a) un anticuerpo monoclonal que reconoce la proinsulina pero no la insulina, o (b) un anticuerpo diferente que reconoce la insulina pero no la proinsulina. Los anticuerpos que se unieron a partículas de oro electroopacas aparecen como manchas oscuras en estas microfotografías electrónicas (véase la Fig. 9-29). Las vesículas de secreción inmaduras (puntas de flechas negras) y las vesículas que brotan desde el *trans*-Golgi (flechas) se tiñen con el anticuerpo contra proinsulina pero no con el anticuerpo contra insulina. Estas vesículas contienen agregados difusos de proteína que incluyen proinsulina y otras proteínas secretadas reguladas. Las vesículas maduras (puntas de flechas blancas) se tiñen con el anticuerpo antiinsulina pero no con el anticuerpo contra la proinsulina, y tienen una zona central densa de insulina casi cristalina. Dado que las vesículas que han brotado y las vesículas de secreción inmaduras contienen proinsulina (no insulina), la conversión proteolítica de la proinsulina a la insulina deberá ocurrir dentro de estas vesículas después de que han brotado desde la red *trans*-Golgi. El inserto (a) muestra una vesícula secretora rica en proinsulina rodeada por una cubierta proteica (línea punteada). (De L. Orci y cols., 1987, *Cell*, 49:865; cortesía de L. Orci).

vesículas secretoras reguladas y cortan proteolíticamente los precursores de muchas hormonas en sitios específicos.

Varias vías clasifican las proteínas de membrana a la región apical o basolateral de las células polarizadas

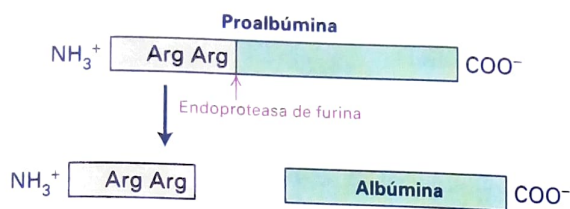
La membrana plasmática de las células epiteliales polarizadas está dividida en dos dominios, el **apical** y el **basolateral**; las uniones estrechas localizadas entre ambos evitan el movimiento de proteínas de la membrana plasmática entre ellos (véase la Fig. 20-10). Hay varios mecanismos de clasificación que dirigen las proteínas de membrana recién sintetizadas al dominio apical o basolateral de las células epiteliales, y cualquier proteína puede ser seleccionada por más de un mecanismo. Como resultado de esta clasificación, y de la restricción al movimiento de proteínas dentro de la membrana plasmática debido a las uniones estrechas, se encuentran diferentes conjuntos de proteínas en los dominios apical o basolateral. Esta localización preferencial de ciertas proteínas de transporte es crítica para una diversidad de funciones fisiológicas importantes como la absorción de nutrientes desde la luz del intestino y la acidificación de la luz del estómago (véanse las Figs. 11-30 y 11-31).

Los estudios microscópicos y de fraccionamiento celular indican que las proteínas destinadas a las membranas apical o basolateral se transportan inicialmente juntas a las membranas de la red del *trans*-Golgi. En ciertos casos, las proteínas destinadas a la membrana apical se seleccionan en sus propias vesículas de transporte, que brotan de la red *trans*-Golgi y luego, se mueven hacia la región apical, mientras que las proteínas destinadas a la membrana basolateral se seleccionan a sus vesículas que se mueven a la región basolateral. Los diferentes tipos de vesículas pueden distinguirse por sus constituyentes proteicos, que incluyen diferentes proteínas Rab y v-SNARE, que, aparentemente, las dirigen al dominio de membrana plasmática adecuado. En este mecanismo, la agregación de las proteínas destinadas a la membrana apical o basolateral ocurre a medida que las proteínas carga se incorporan a tipos particulares de vesículas que brotan desde la red *trans*-Golgi.



Esta clasificación basolateral-apical ha sido investigada en las células caninas de riñón Madin-Darby (MDCK, por sus siglas en inglés), una línea de células epiteliales polarizadas en cultivo (véase la Fig. 9-4). En las células MDCK infectadas con el virus de la gripe, los virus de la progenie geman solo desde la membrana apical, mientras

(a) Proteínas secretadas constitutivas



(b) Proteínas secretadas reguladas

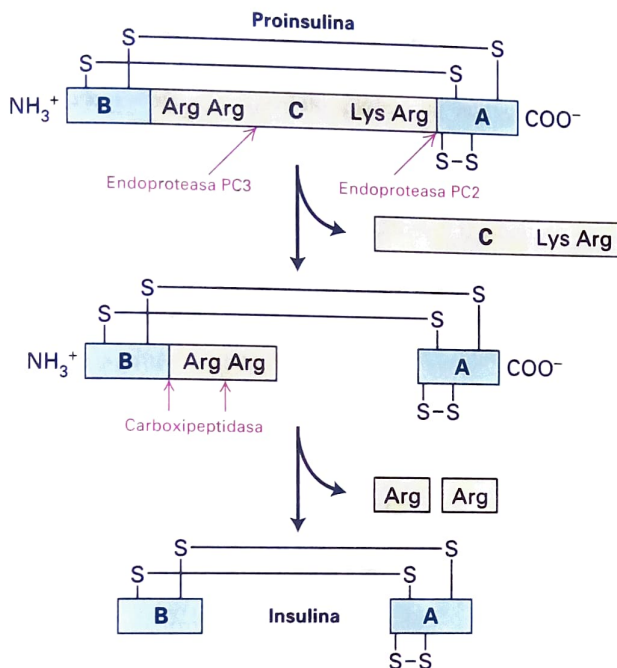


FIGURA 14-24 Procesamiento proteolítico de las proproteínas en las vías de secreción constitutiva y regulada. El procesamiento de la proalbúmina y la proinsulina es típico de las vías constitutiva y regulada, respectivamente. Las endoproteasas que funcionan en este procesamiento cortan en el lado C-terminal de dos aminoácidos consecutivos. (a) La endoproteasa furina actúa sobre los precursores de las proteínas secretadas constitutivas. (b) Dos endoproteasas, PC2 y PC3, actúan sobre los precursores de las proteínas secretadas reguladas. El procesamiento final de muchas proteínas de este tipo está catalizado por una carboxipeptidasa que quita secuencialmente dos residuos de aminoácidos básicos en el extremo C-terminal de un polipéptido. (Véase D. Steiner y cols., 1992, *J. Biol. Chem.* **267** 23435).

que en las células infectadas con el virus de la estomatitis vesicular (VSV, por sus siglas en inglés), los virus de la progenie brotan solo desde la membrana basolateral. Esta diferencia ocurre porque la glucoproteína HA del virus de la gripe se transporta desde el complejo de Golgi exclusivamente a la membrana apical y la proteína G del VSV se transporta solamente a la membrana basolateral (Fig. 14-25). Aún más, cuando el gen que codifica la proteína HA se introduce a células no infectadas por técnicas de DNA recombinante, toda la HA expresada se acumula en la membrana apical, lo que indica que la señal de clasificación reside en la glucoproteína HA en sí y no en otras proteínas del virus producidas durante la infección viral.

Entre las proteínas celulares que sufren una clasificación similar apical-basolateral en el aparato de Golgi están aquellas con un *ancla de membrana glucosilfosfatidilinositol (GPI)*. En las células MDCK, y en la mayoría de otros tipos de células epiteliales, las proteínas ancladas GPI se dirigen a la membrana apical. En las membranas, las proteínas ancladas GPI se agrupan en balsas de lípidos que son ricas en esfingolípidos (véase el Cap. 10). Este hallazgo sugiere que las balsas de lípidos se localizan en la membrana apical junto con proteínas que, preferencialmente, los dividen en muchas células; sin embargo, el ancla GPI no es una señal de clasificación apical en todas

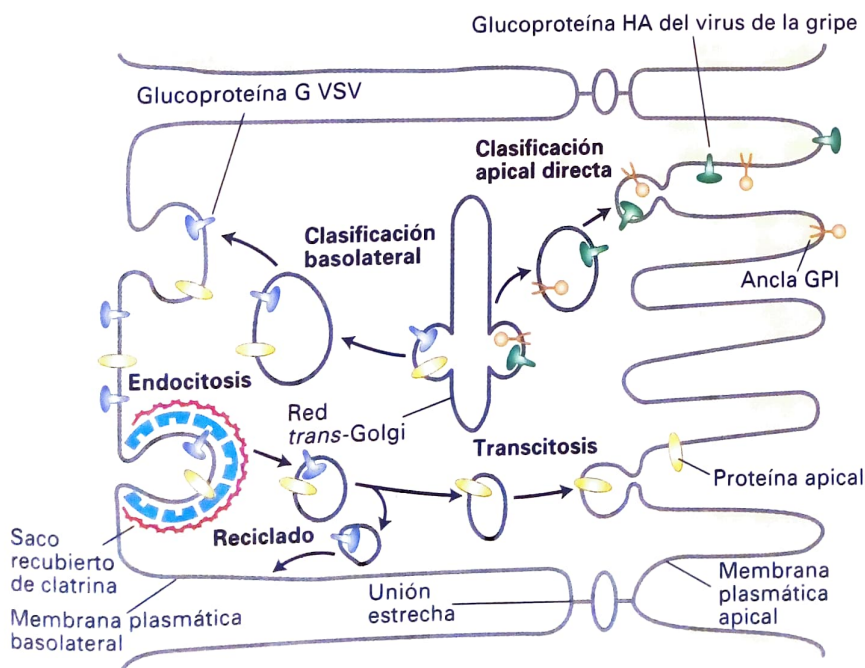


FIGURA 14-25 Clasificación de las proteínas destinadas para las membranas apical y basolateral de las células polarizadas. Cuando las células MDCK cultivadas se infectan simultáneamente con el VSV y el virus de la gripe,

la glucoproteína G del VSV (en púrpura) aparece solo en la membrana basolateral, mientras que las glucoproteína HA de la gripe (verde) aparece solo en la membrana apical. Algunas proteínas celulares (círculo anaranjado), especialmente aquellas con un ancla GPI, se clasifican de manera similar directamente a la membrana apical, y otras, a la membrana basolateral (no se muestra) por medio de vesículas de transporte específicas que brotan de la red *trans*-Golgi. En ciertas células polarizadas, algunas proteínas apicales y basolaterales son transportadas juntas a la superficie basolateral; las proteínas apicales (óvalo amarillo) se mueven luego de manera selectiva, por endocitosis y transcitosis, a la membrana apical. (De K. Simons y A. Wandinger-Ness, 1990, *Cell* **62** 207, y K. Mostov y cols., 1992, *J. Cell. Biol.* **116** 577)

las células polarizadas; en las células de la tiroides, por ejemplo, las proteínas ancladas GPI se dirigen a la membrana basolateral. Otras, distintas de las ancladas GPI, secuencias no únicas, han sido identificadas como necesarias y suficientes para dirigir las proteínas al dominio apical o al basolateral. En lugar de ellas, cada proteína de membrana puede contener múltiples señales de clasificación, cualquiera de las cuales puede dirigirla al dominio de membrana plasmática adecuado. La identificación de estas señales complejas y de las proteínas de la cubierta de la vesícula que las reconocen es investigada actualmente para una diversidad de proteínas distintas que se seleccionan a dominios de membranas específicos en las células epiteliales polarizadas.

Otro mecanismo para seleccionar proteínas apicales y basolaterales, también ilustrado en la **Figura 14-25**, opera en los hepatocitos. Las membranas basolaterales de los hepatocitos enfrentan la sangre (como ocurre en las células epiteliales del intestino), y las membranas apicales tapizan los canales intercelulares pequeños a los cuales se secreta la bilis. En los hepatocitos, las proteínas apicales y basolaterales recién sintetizadas primero se transportan en vesículas desde la red *trans*-Golgi a la región basolateral y se incorporan a las membranas plasmáticas por exocitosis (p. ej., la fusión de la membrana de la vesícula a la membrana plasmática). Desde allí, las proteínas basolaterales y apicales son endocitadas en las mismas vesículas, pero sus caminos divergen. Las proteínas basolaterales endocitadas se dirigen a vesículas de transporte que las reciclan a la membrana basolateral. Por el contrario, las proteínas endocitadas destinadas a la membrana apical son clasificadas a vesículas de transporte que se mueven a través de la célula y se fusionan con la membrana apical en un proceso llamado **transcitosis**. Este proceso también se emplea para mover materiales extracelulares de un lado de un epitelio a otro. Incluso en las células epiteliales como las MDCK, en las cuales ocurre una selección de proteínas apical-basolateral en el aparato de Golgi, la transcitosis puede proporcionar una función de edición por la cual una proteína apical seleccionada de modo incorrecto a la membrana basolateral podría someterse a endocitosis y, luego, ser entregada correctamente a la membrana apical.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 14.4

Etapas finales de la vía secretora

- La red *trans*-Golgi (RTG) es un punto de ramificación central en la vía secretora en el que las proteínas solubles por secretarse, las proteínas lisosómicas y algunas proteínas de la membrana celular destinadas a las membranas basolateral o apical se segregan en diferentes vesículas de transporte.
- Muchas vesículas que brotan de la red *trans*-Golgi, así como las vesículas endocíticas, llevan una cubierta compuesta de complejos de PA (proteína adaptadora) y clatrina (véase la **Fig. 14-18**).
- El desprendimiento de las vesículas cubiertas con clatrina requiere dinamina, que forma un collar alrededor del cuello del brote de la vesícula e hidroliza el GTP (véase la **Fig. 14-19**).

- Las enzimas solubles destinadas a los lisosomas se modifican en el *cis*-Golgi dando múltiples residuos de manosa 6-fosfato (M6P) en sus cadenas de oligosacáridos.

- Los receptores de M6P de la membrana de la red *trans*-Golgi unen proteínas que llevan los residuos M6P y dirigen su transferencia a los endosomas tardíos, donde los receptores y sus proteínas ligando se disocian; luego, los receptores se reciclan al Golgi o a la membrana plasmática y las enzimas lisosómicas son entregadas a los lisosomas (véase la **Fig. 14-22**).

- Las proteínas de secreción reguladas se concentran y almacenan en vesículas secretoras para esperar una señal neural u hormonal para la exocitosis. La agregación de las proteínas dentro de la red *trans*-Golgi puede desempeñar un papel en la clasificación de las proteínas secretadas a la vía regulada.

- Muchas proteínas transportadas a través de la vía secretora sufren cortes proteolíticos posteriores al Golgi que dan como resultado proteínas maduras activas. Generalmente, puede ocurrir la maduración proteolítica en vesículas que llevan proteínas de la red *trans*-Golgi a la superficie celular en el endosoma tardío o en el lisosoma.

- En las células epiteliales polarizadas, las proteínas de la membrana destinadas a los dominios apical o basolateral de la membrana plasmática son clasificadas en la red *trans*-Golgi a diferentes vesículas de transporte (véase la **Fig. 14-25**). El ancla GPI es la única señal de clasificación apical-basolateral identificada hasta el momento.

- En los hepatocitos y algunas otras células polarizadas, todas las proteínas de la membrana plasmática se dirigen primero a la membrana basolateral. Las proteínas destinadas a la región apical luego son endocitadas y se mueven a través de la célula a la membrana apical (transcitosis).

14.5 Endocitosis mediada por receptor

En las secciones previas hemos explorado las principales vías por las cuales las proteínas solubles y las secretadas de membrana sintetizadas en el RE rugoso son entregadas a la superficie celular o a otros destinos. Las células también pueden internalizar materiales de su entorno y clasificarlos a destinos particulares. Unos pocos tipos celulares (p. ej., los macrófagos) pueden tomar una bacteria completa y otras partículas grandes por **fagocitosis**, un proceso no selectivo mediado por actina en el cual extensiones de la membrana plasmática envuelven el material ingerido formando vesículas grandes llamadas fagosomas (véase la **Fig. 17-19**). Por el contrario, todas las células eucariotas continuamente están comprometidas en la endocitosis, un proceso en el cual una pequeña región de la membrana plasmática se invagina para formar una vesícula rodeada por membrana con un diámetro aproximado de 0,05-0,1 μm de diámetro. En una forma de endocitosis, llamada *pinocitosis*, se captan pequeñas gotas de líquido extracelular y cualquier material disuelto en él de forma no específica. En esta sección, nuestro objetivo, sin embargo, es la **endocitosis mediada por receptor**, en la cual un re-

ceptor específico de la superficie celular se une estrechamente a un ligando macromolecular extracelular que reconoce; la región de la membrana plasmática que contiene el complejo receptor-ligando se invagina luego y se desprende, transformándose en una vesícula de transporte.

Entre las macromoléculas comunes que internalizan las células de los vertebrados por endocitosis mediada por receptor se encuentran las partículas que contienen colesterol, llamadas lipoproteínas de baja densidad (LDL, por sus siglas en inglés); la proteína transportadora de hierro transferrina; muchas hormonas proteicas (p. ej., insulina), y ciertas glucoproteínas. La endocitosis mediada por receptor de tales ligandos en general ocurre vía vesículas recubiertas de clatrina/PA2 y vesículas en un proceso similar al empaquetamiento de las enzimas lisosómicas por la unión de manosa 6-fosfato (M6P) en la red *trans*-Golgi (véase la Fig. 14-22). Como se dijo previamente, algunos receptores M6P se encuentran sobre la superficie celular y participan en la endocitosis mediada por receptor de las enzimas lisosómicas que se secretan de forma errónea. En general, las proteínas receptoras integrales de la membrana que operan en la

captación de ligandos extracelulares se internalizan desde la superficie de la célula durante la endocitosis y, luego, son seleccionadas y recicladas nuevamente a la superficie de la célula de forma similar al reciclado de los receptores M6P a la membrana plasmática y el *trans*-Golgi. La velocidad a la cual se internaliza un ligando está limitada por la cantidad de su receptor correspondiente en la superficie celular.

Los sacos de clatrina/PA2 constituyen hasta el 2 por ciento de la superficie de las células, tales como hepatocitos y fibroblastos. Se han observado muchos ligandos internalizados en estos sacos y vesículas que se piensa que funcionan como intermediarios en la endocitosis de la mayoría (aunque no de todos) los ligandos unidos a los receptores de la superficie celular (Fig. 14-26). Algunos receptores están agrupados sobre invaginaciones recubiertas con clatrina aun en ausencia de un ligando; otros receptores difunden libremente en el plano de la membrana plasmática pero sufren un cambio de conformación cuando se unen al ligando, de modo tal que cuando el complejo receptor-ligando difunde al interior de un saco recubierto con clatrina, queda retenido allí. Se pueden ver dos o más tipos de

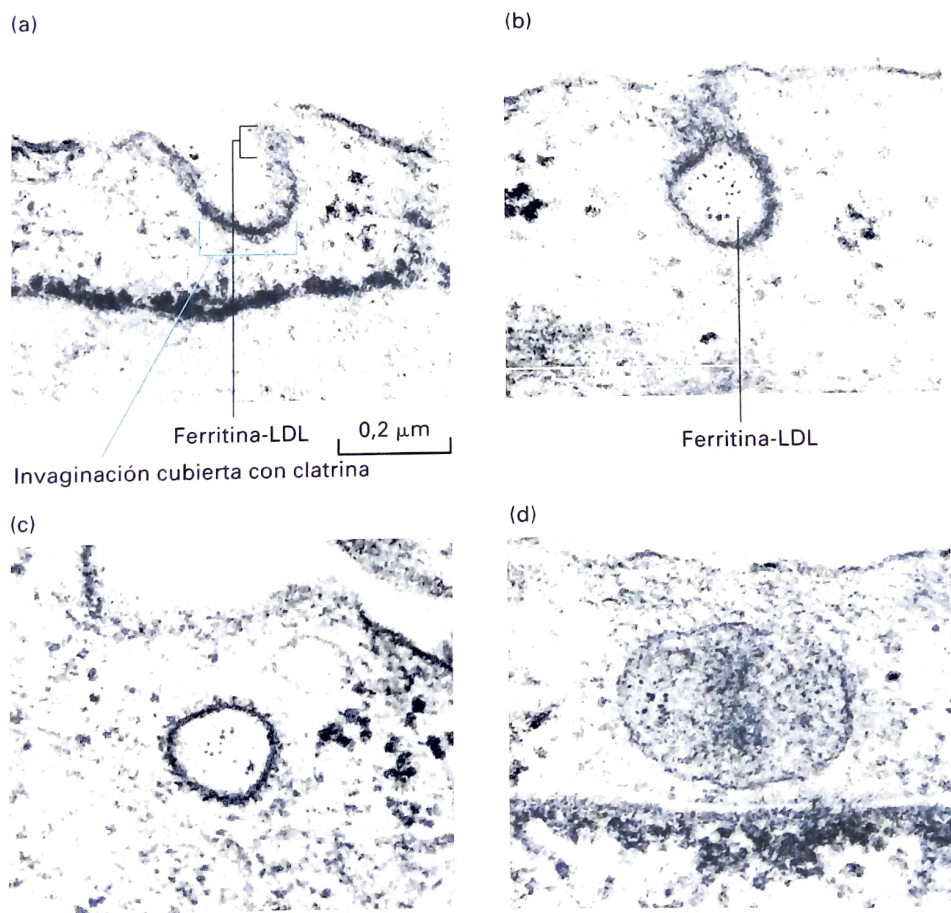


FIGURA EXPERIMENTAL 14-26 Las etapas iniciales de la endocitosis mediada por receptor de las partículas de lipoproteínas de baja densidad (LDL) se revelan mediante microscopía electrónica. Los

fibroblastos humanos cultivados se incubaron en un medio que contenía partículas de LDL unidas de forma covalente a la proteína electrodensa con hierro ferritina; cada pequeña partícula de hierro de la ferritina se ve como un punto pequeño en el microscopio electrónico. Las células se incubaron inicialmente a 4 °C; a esa temperatura, la LDL puede unirse a su receptor pero no se produce la internalización. Después de lavar el exceso de LDL no unida a las células, estas se calentaron a 37 °C y, luego, se prepararon para

la microscopía a intervalos periódicos. (a) Un hoyo recubierto que muestra la cubierta de clatrina en su superficie interior (citósolica) poco después de haber elevado la temperatura. (b) Un hoyo que contiene LDL, aparentemente cerrándose sobre sí mismo para formar una vesícula cubierta. (c) Una vesícula cubierta que contiene partículas de LDL marcadas con ferritina. (d) Partículas de LDL marcadas con ferritina en la superficie lisa de un endosoma temprano 6 minutos después de haber comenzado la internalización. (Las fotografías son cortesía de R. Anderson. Reimpreso con autorización de J. Goldstein y cols., *Nature* **279** 679 Copyright 1979, Macmillan Journals limited. Véase también M. S. Brown y J. Goldstein, 1986, *Science* **232** 34)

ligandos unidos al receptor, como LDL y transferrina en el mismo hoyo recubierto o vesícula.

Las células captan lípidos de la sangre en forma de complejos lipoproteicos grandes bien definidos

Los lípidos absorbidos de la dieta en los intestinos o almacenados en el tejido adiposo pueden distribuirse a las células a través del organismo. Para facilitar la transferencia masiva de los lípidos entre las células, los animales desarrollaron una forma eficiente de empaquetar los cientos a miles de moléculas de lípidos en acarreadores hidrosolubles macromoleculares, llamados **lipoproteínas**, que las células pueden captar de la circulación como un conjunto. Una partícula de lipoproteína tiene una cubierta compuesta por proteínas (*apolipoproteínas*) y una monocapa fosfolipídica que contiene colesterol. La cubierta es anfipática porque su superficie externa es hidrófila, lo cual hace que estas partículas sean hidrosolubles, y su superficie interna es hidrófoba. Adyacente a la superficie interna hidrófoba de la cubierta hay un núcleo de lípidos neutros que contienen principalmente ésteres de colesterol, triglicéridos o ambos. Las lipoproteínas de los mamíferos caen en diferentes clases definidas por sus diferentes densidades de flotación. La clase que consideraremos aquí es la de las **lipoproteínas de baja densidad** (LDL, por sus siglas en inglés). Una partícula de LDL típica, dibujada en la **Figura 14-27**, es una esfera de 20-25 nm de diámetro. La cubierta externa anfipática está compuesta por una monocapa de fosfolípido y una molécula única de una proteína grande conocida

como *apoB-100*; el núcleo de la partícula está empaquetado con el colesterol en forma de ésteres de colesterol.

Se han empleado dos enfoques experimentales generales para estudiar cómo las partículas de LDL entran a las células. El primer método emplea LDL marcado mediante la unión covalente de ^{125}I a las cadenas laterales de los residuos de tirosina de la *apoB-100* de las superficies de las partículas de LDL. Después de que las células cultivadas se incuban durante varias horas con la LDL marcada es posible determinar cuánta LDL está unida a las superficies de las células, cuánta se ha internalizado y cuánto del componente *apoB-100* de la LDL ha sido degradado por la hidrólisis enzimática a aminoácidos individuales. La degradación de la *apoB-100* puede ser detectada por la liberación de la ^{125}I -tirosina al medio de cultivo. La **Figura 14-28** muestra el curso temporal de los eventos en el procesamiento celular de LDL mediada por receptor, determinado por experimentos de pulso y caza con una concentración fija de LDL marcada con ^{125}I . Estos experimentos demostraron con claridad el orden de los eventos: unión de LDL a la superficie $\rightarrow$ internalización $\rightarrow$ degradación. El segundo enfoque implica el etiquetado de partículas de LDL con una marca electrodensa que puede ser detectada mediante microscopía electrónica. Estos estudios pueden revelar los detalles del modo en que las partículas de LDL se unen primero a la superficie de las células en invaginaciones endocíticas con clatrina y, luego, permanecen asociadas con los hoyos recubiertos a medida que se invaginan y brotan para formar vesículas cubiertas para, finalmente, ser transportadas a los endosomas (véase la **Fig. 14-26**).

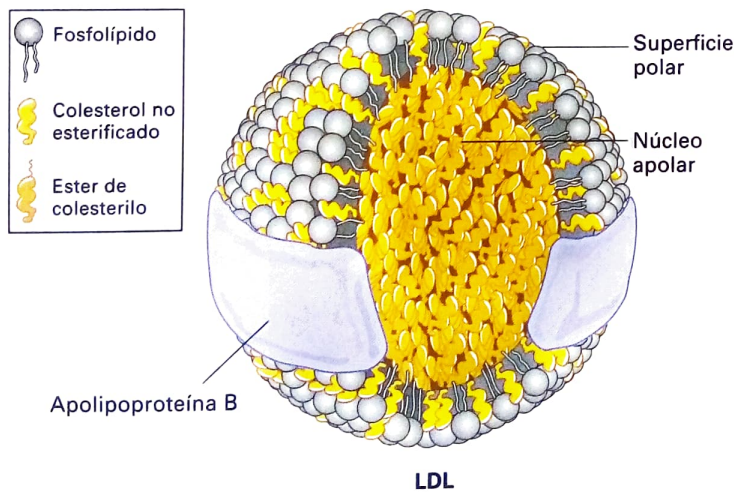


FIGURA 14-27 Modelo de lipoproteína de baja densidad (LDL). Esta y las otras clases de lipoproteínas tienen la misma estructura general: una cubierta anfipática compuesta por una monocapa fosfolipídica (no una bicapa), colesterol y proteína y un núcleo hidrófobo compuesto principalmente por ésteres de colesterol o triglicéridos, o ambos, con cantidades menores de otros lípidos neutros (p. ej., algunas vitaminas). Este modelo de LDL se basa en métodos de microscopía electrónica y otros de tipo biofísico de baja resolución. La LDL resulta única en el sentido de que contiene solo una única molécula de un tipo de apolipoproteína (*apoB*) que parece envolverse alrededor del exterior de la partícula como una banda de proteína. Las otras lipoproteínas contienen múltiples moléculas de apolipoproteína, con frecuencia de diferentes tipos. (Adaptado de M. Krieger, 1995, en E. Haber, ed., *Molecular Cardiovascular Medicine*, Scientific American Medicine, pp. 31-47).

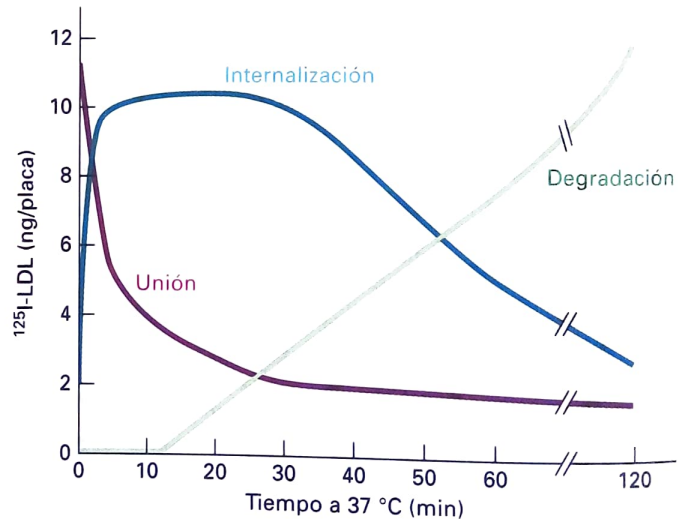


FIGURA EXPERIMENTAL 14-28 El experimento de pulso y caza demuestra relaciones precursor-producto en la captación celular de LDL. Los fibroblastos normales cultivados de la piel se incubaron en un medio que contenía ^{125}I -LDL durante dos horas a 4 °C (el pulso). Después de que el exceso de ^{125}I -LDL no unido a las células se lavó, las células se incubaron a 37 °C durante las cantidades de tiempo indicado en ausencia de LDL externa (la caza). Las cantidades de ^{125}I -LDL unida a la superficie internalizada y degradada (hidrolizada) fueron medidas. La unión (pero no la internalización ni la hidrólisis) de la LDL *apoB-100* ocurre durante el pulso a 4 °C. Los datos muestran la desaparición muy rápida de la ^{125}I -LDL de la superficie a medida que se internaliza después de que las células se han calentado para permitir los movimientos de la membrana. Después de un período de pausa de 15-20 minutos comienza la degradación lisosómica de la ^{125}I -LDL internalizada. (Véase M. S. Brown y J. L. Goldstein, 1976, *Cell*, 9:663).

Los receptores de las lipoproteínas de baja densidad y otros ligandos contienen señales de clasificación que los marcan para la endocitosis

La clave para comprender el modo en que las partículas de LDL se unen a la superficie celular y, luego, son captadas al interior de vesículas endocíticas provino del descubrimiento del *receptor de LDL* (LDLR, por sus siglas en inglés). El receptor de LDL es una glucoproteína de 839 residuos con un segmento integral de membrana único; tiene un segmento citosólico C-terminal corto y un segmento exoplasmático N-terminal largo que contiene el dominio que une LDL.

Siete repeticiones ricas en cisteína forman el dominio de unión al ligando que interactúa con la molécula apoB-100 en una partícula de LDL. La Figura 14-29 muestra el modo en que las proteínas del receptor de LDL facilitan la internalización de las partículas de LDL por la endocitosis mediada por receptor. Después de que las partículas de LDL internalizadas llegan a los lisosomas, las proteasas lisosómicas hidrolizan sus apolipoproteínas de superficie y las esterasas de colesterol lisosómicas hidrolizan sus ésteres de colesterol centrales. El colesterol no esterificado, entonces, es libre de abandonar el lisosoma, y puede ser usado según se necesite por la célula en la síntesis de las membranas de varios derivados del colesterol.

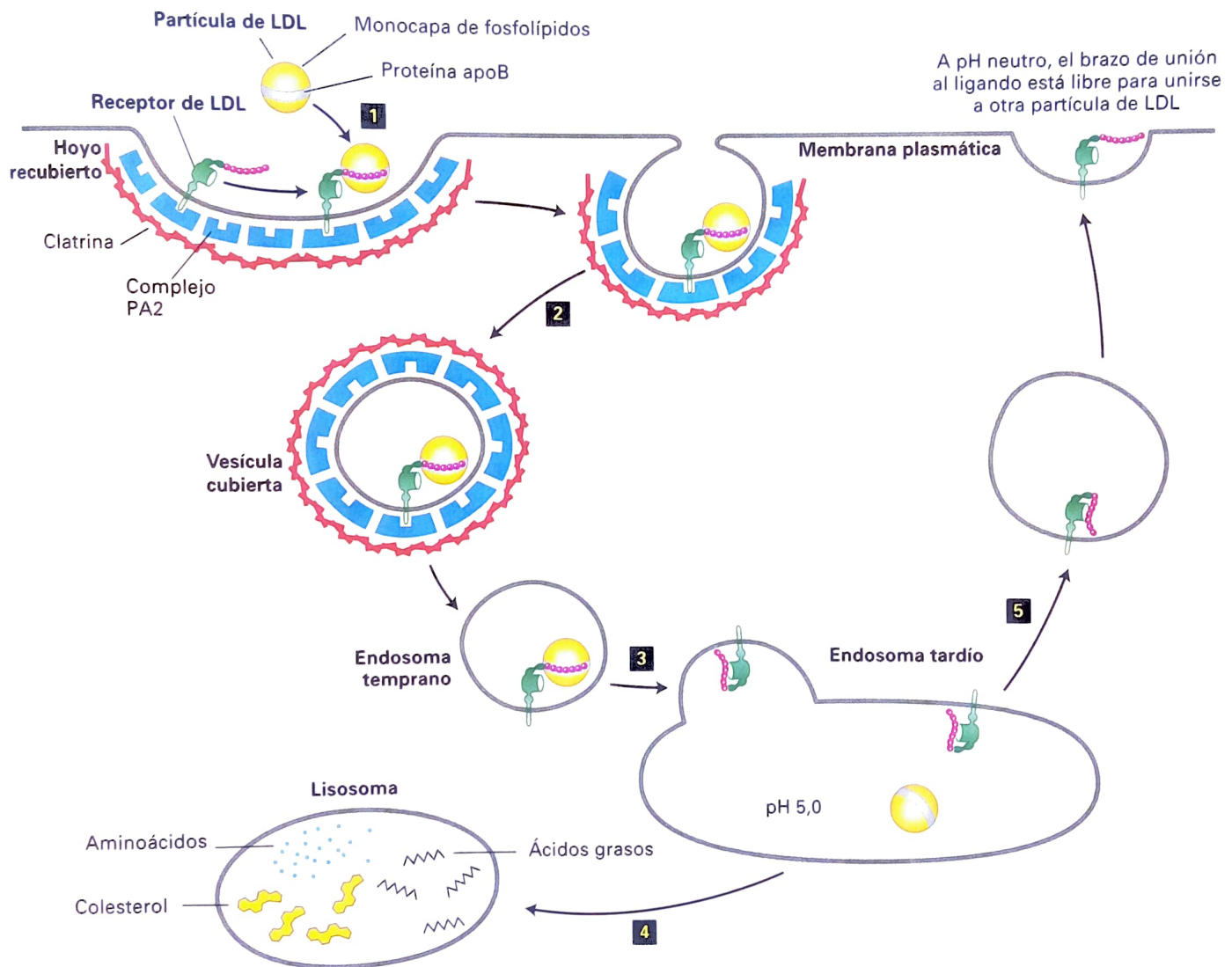


FIGURA 14-29 Vía endocítica para la internalización de la lipoproteína de baja densidad (LDL). Paso 1: los receptores de LDL de la superficie celular se unen a una proteína apoB embebida en la capa externa de fosfolípidos de las partículas de LDL. La interacción entre la señal de clasificación NPXY en la cola citosólica del receptor de LDL y el complejo PA2 incorpora el complejo receptor-ligando a las vesículas endocíticas en formación. Paso 2: los hoyos (o brotes) cubiertos de clatrina contienen complejos receptor-LDL y se desprenden mediante los mismos mecanismos mediados por dinamina que se emplean para formar las vesículas de clatrina/PA1 en la red *trans*-Golgi (véase la Fig. 14-19). Paso 3: después de que se desprende la cubierta de la vesícula,

la vesícula endocítica no cubierta (el endosoma temprano) se fusiona con el endosoma tardío. El pH ácido de este compartimiento provoca un cambio de conformación en el receptor de LDL que lleva a la liberación de la partícula de LDL unida. Paso 4: el endosoma tardío se fusiona con el lisosoma y las proteínas y los lípidos de la partícula de LDL libre se degradan a sus partes constituyentes por enzimas del lisosoma. Paso 5: el receptor de LDL recicla la superficie celular, donde, al pH neutro del medio externo, el receptor sufre un cambio de conformación de tal modo que puede unir otra partícula de LDL.

(Véanse M. S. Brown y J. L. Goldstein, 1986, *Science* 232:34, y G. Rudenko y cols., 2002, *Science* 298:2353).



El descubrimiento del receptor de LDL y la comprensión del modo en que funciona provinieron del estudio de células de pacientes con *hipercolesterolemia familiar (HF)*, una enfermedad hereditaria marcada por el colesterol LDL plasmático elevado y que actualmente se sabe está causada por mutaciones en el gen *LDLR*. En pacientes que tienen una copia normal y una defectuosa del gen *LDLR* (heterocigotos), el colesterol LDL de la sangre está aumentado aproximadamente al doble. En aquellos que tienen los dos genes *LDLR* defectuosos (homocigotos), los niveles de colesterol están incrementados entre cuatro y seis veces con respecto a lo normal. Los heterocigotos HF desarrollan, por lo común, enfermedad cardiovascular aproximadamente diez años antes que las personas normales, y los homocigotos mueren de forma habitual por ataques cardíacos antes de completar la tercera década de vida.

Una diversidad de mutaciones en el gen que codifica el receptor de LDL puede provocar hipercolesterolemia familiar. Algunas mutaciones impiden la síntesis de la proteína *LDLR*; otras impiden el plegamiento adecuado de la proteína receptora en el RE, llevando a su degradación prematura (Cap. 13); otras mutaciones disminuyen la capacidad del receptor de LDL para unirse a esta estrechamente. Un grupo particularmente informativo de receptores mutantes se expresa en la superficie celular y une la LDL normalmente, pero no puede mediar la internalización de la lipoproteína unida. En individuos con este tipo de defecto, los receptores de la membrana plasmática para otros ligandos se internalizan con normalidad, pero el receptor de LDL mutante no se recluta en el interior de los hoyos cubiertos. El análisis de este receptor mutante y de otros receptores de LDL mutantes generados experimentalmente y expresados en fibroblastos identificó un motivo de cuatro residuos en el segmento citosólico del receptor que resulta crucial para su internalización: Asn-Pro-X-Tyr, donde X puede ser cualquier aminoácido. La *señal de clasificación NPXY* se acopla al complejo PA2, uniendo la cubierta de clatrina/PA2 al segmento citosólico del receptor LDL en los hoyos recubiertos. Una mutación en cualquiera de los residuos conservados de la señal NPXY abolirá la capacidad del receptor de LDL de ser incorporado a los hoyos recubiertos.

Un pequeño número de individuos que exhiben los síntomas habituales asociados con la hipercolesterolemia familiar producen receptores de LDL normales. En estos individuos, el gen que codifica la subunidad proteica PA2 que une la señal de clasificación NPXY es defectuoso; en consecuencia, los receptores de LDL no se incorporan a las vesículas clatrina/PA2 y la endocitosis de las partículas de LDL se encuentra comprometida. El análisis de los pacientes con este trastorno genético destaca la importancia de las proteínas adaptadoras en el tránsito de proteínas mediado por las vesículas de clatrina. ■

Los estudios de mutaciones han mostrado que otros receptores de la superficie celular pueden ser dirigidos a formar hoyos de clatrina/PA2 por una señal de clasificación YXXF. Recuerde, de nuestro análisis previo, que esta misma señal de clasificación recluta proteínas de la membrana a vesículas de clatrina/PA1 que brotan de la red *trans*-Golgi, uniéndose a una subunidad de PA1 (véase el Cuadro 14-2). Todas estas observaciones indican que YXXF es una señal extensamente usada para clasificar proteínas de la membrana y dirigirlas a las vesículas cubiertas con clatrina.

En algunas proteínas de la superficie celular, sin embargo, hay otras secuencias (p. ej., Leu-Leu) o moléculas de ubiquitina ligadas

covalentemente que señalan la endocitosis. Entre las proteínas asociadas con vesículas clatrina/PA2, varias contienen dominios que específicamente se unen a la ubiquitina, y se ha hipotetizado que estas proteínas asociadas a vesículas median la incorporación selectiva de proteínas de membrana ubiquitinadas en vesículas endocíticas. Como se describirá más adelante, la etiqueta de ubiquitina en proteínas de membrana endocitadas también es reconocida en una etapa posterior en la vía endocítica y desempeña una función en entregar estas proteínas al interior del lisosoma donde se degradan.

El pH ácido de los endosomas tardíos provoca la disociación de la mayoría de los complejos receptor-ligando

La velocidad global de la internalización endocítica de la membrana plasmática es bastante elevada: los fibroblastos cultivados regularmente internalizan el 50% de sus proteínas de superficie y fosfolípidos por hora. La mayoría de los receptores de la superficie celular que sufren endocitosis depositarán repetidamente sus ligandos dentro de la célula y, luego, los reciclarán a la membrana plasmática nuevamente para mediar la internalización de las moléculas de ligando. Por ejemplo, el receptor de LDL completa un ciclo hacia adentro y hacia afuera de la célula cada 10-20 minutos, con un total de varios cientos de viajes en su espectro de vida de 20 horas.

Los complejos internalizados receptor-ligando comúnmente siguen la vía que se muestra para el receptor M6P en la Figura 14-22 y para el receptor de LDL en la Figura 14-29. Los receptores de la superficie celular endocitados típicamente se disocian de sus ligandos dentro de los endosomas tardíos que se ven como vesículas esféricas con membranas ramificadas tubulares localizados a unos pocos micrómetros de la superficie celular. Los experimentos originales que definieron las vesículas de clasificación del endosoma tardío utilizaron el receptor de la asialoglucoproteína. Esta proteína específica del hígado media la unión y la internalización de las glucoproteínas anormales, cuyos oligosacáridos terminan en galactosa en lugar de terminar en ácido siálico normal; de allí, el nombre *asialoglucoproteína*. La microscopía electrónica de las células hepáticas perfundidas con asialoglucoproteína revelan que 5-10 minutos después de la internalización las moléculas del ligando se encuentran en la luz de los endosomas tardíos, mientras que las extensiones de la membrana tubular son ricas en receptores y en raras ocasiones contienen ligando. Estos hallazgos indican que el endosoma tardío es el orgánulo en el cual los receptores y los ligandos se desacoplan.

La disociación de los complejos receptor-ligando en los endosomas tardíos ocurre no solo en la vía endocítica sino también en la entrega de las enzimas lisosómicas solubles por medio de la vía secretora (véase la Fig. 14-22). Como se analizó en el Capítulo 11, las membranas de los endosomas tardíos y de los lisosomas contienen bombas protónicas de clase V que actúan concertadamente con los canales de Cl^- para acidificar la luz de las vesículas (véase la Fig. 11-14). La mayoría de los receptores, incluyendo el receptor M6P y los receptores de la superficie celular para las partículas de LDL y la asialoglucoproteína, unen sus ligandos estrechamente a pH neutro pero los liberan si el pH desciende a 6,0 o por debajo de este valor. El endosoma tardío es la primera vesícula encontrada por los complejos ligando-receptor cuyo pH luminal es suficientemente ácido

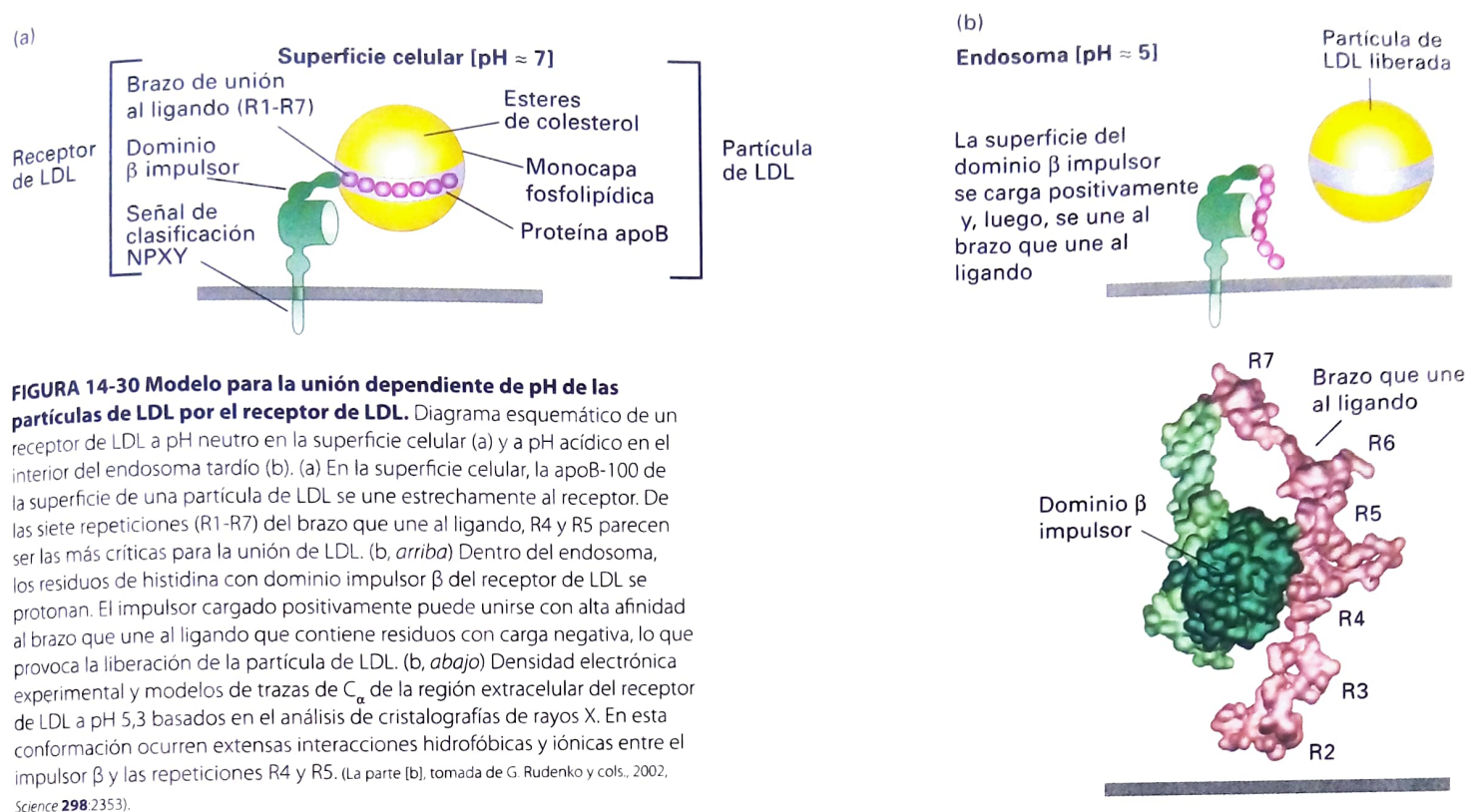


FIGURA 14-30 Modelo para la unión dependiente de pH de las partículas de LDL por el receptor de LDL. Diagrama esquemático de un receptor de LDL a pH neutro en la superficie celular (a) y a pH ácido en el interior del endosoma tardío (b). (a) En la superficie celular, la apoB-100 de la superficie de una partícula de LDL se une estrechamente al receptor. De las siete repeticiones (R1-R7) del brazo que une al ligando, R4 y R5 parecen ser las más críticas para la unión de LDL. (b, arriba) Dentro del endosoma, los residuos de histidina con dominio impulsor β del receptor de LDL se protonan. El impulsor cargado positivamente puede unirse con alta afinidad al brazo que une al ligando que contiene residuos con carga negativa, lo que provoca la liberación de la partícula de LDL. (b, abajo) Densidad electrónica experimental y modelos de trazas de C_{α} de la región extracelular del receptor de LDL a pH 5,3 basados en el análisis de cristalografías de rayos X. En esta conformación ocurren extensas interacciones hidrofóbicas e iónicas entre el impulsor β y las repeticiones R4 y R5. (La parte [b], tomada de G. Rudenko y cols., 2002, *Science* 298:2353).

para promover la disociación de la mayoría de los receptores endocitados de sus ligandos estrechamente unidos.

El mecanismo por el cual el receptor de LDL libera las partículas de LDL unidas ahora se comprende en detalle (Fig. 14-30). A un pH endosómico de 5,0-5,5, los residuos de histidina en una región conocida como el dominio β -propulsor del receptor se protonan, formando un sitio que puede unirse con alta afinidad a las repeticiones negativamente cargadas del dominio que une LDL. Esta interacción intramolecular secuestra las repeticiones en una conformación que no puede unirse simultáneamente a la apoB-100, provocando así la liberación de la partícula de LDL unida.

La vía endocítica entrega hierro a las células sin disociar el complejo receptor-transferrina en los endosomas

La vía endocítica que implica el receptor de transferrina y su ligando difiere de la vía de la LDL en que el complejo receptor-ligando no se disocia en los endosomas tardíos; sin embargo, los cambios en el pH también median la clasificación de los receptores y los ligandos en la vía de la transferrina que funciona para entregar hierro a las células.

Una glucoproteína principal de la sangre, la transferrina, transporta el hierro a todas las células del tejido desde el hígado (el principal sitio de almacenamiento de hierro en el organismo) y desde el intestino (el sitio de absorción de hierro). La forma sin hierro, *apotransferrina*, une dos iones Fe^{3+} muy estrechamente para formar

ferrotransferrina. Todas las células de mamífero contienen receptores de transferrina en la superficie celular que unen con avidez ferrotransferrina a pH neutro, después de lo cual la ferrotransferrina unida al receptor sufre endocitosis. Al igual que los componentes de una partícula de LDL, los dos átomos de Fe^{3+} unidos permanecen en la célula, pero la parte de apotransferrina del ligando no se disocia del receptor en el endosoma tardío y, a los pocos minutos de haber sido endocitada, la apotransferrina vuelve a la superficie celular y se secreta desde la célula.

Como se muestra en la Figura 14-31, la explicación para la conducta del complejo transferrina-receptor-ligando radica en la capacidad única de la apotransferrina para permanecer unida al receptor de transferrina a bajo pH (5,0-5,5) de los endosomas tardíos. A pH menor de 6,0, los dos átomos de Fe^{3+} unidos se disocian de la ferrotransferrina y se reducen a Fe^{2+} mediante un mecanismo desconocido y, luego, se exportan al citosol por un transportador endosómico específico para los iones metálicos divalentes. El complejo receptor-apotransferrina que permanece después de la disociación de los átomos de hierro se recicla nuevamente a la superficie celular. Aunque la apotransferrina se une estrechamente a su receptor a un pH de 5,0 o 6,0, no se une a pH neutro. Así, la apotransferrina unida se disocia del receptor de transferrina cuando las vesículas que reciclan se fusionan con la membrana plasmática y el complejo receptor-ligando encuentra el pH neutro del líquido intersticial extracelular o medio de cultivo. El receptor reciclado está libre entonces para unirse a otra molécula de ferrotransferrina, y la apotransferrina liberada es llevada por el torrente sanguíneo hacia el hígado o el intestino para ser recargada con hierro.

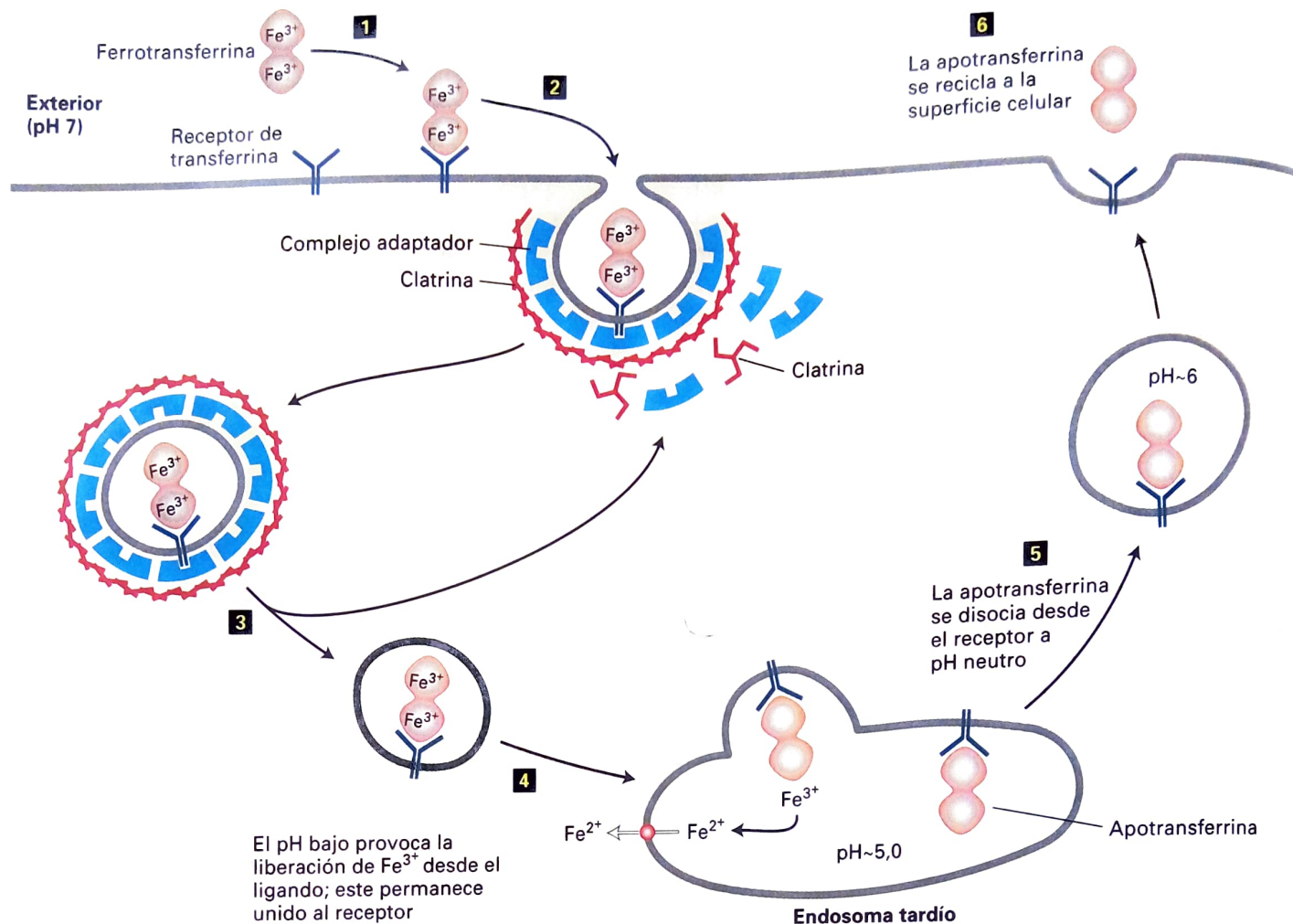


FIGURA 14-31 Ciclo de la transferrina, operativo en todas las células de mamífero en crecimiento. Paso 1: el dímero de transferrina que lleva dos átomos de Fe^{3+} unidos, llamado ferrotransferrina, se une al receptor de transferrina de la superficie celular. Paso 2: interacción entre la cola del receptor de transferrina y el complejo adaptador PA2 que incorpora el complejo receptor-ligando a las vesículas endocíticas cubiertas de clatrina. Pasos 3 y 4: la cubierta de la vesícula se desprende y las vesículas

endocíticas se fusionan con la membrana del endosoma. El Fe^{3+} se libera desde el complejo receptor-ferrotransferrina en el compartimiento ácido del endosoma tardío. Paso 5: la proteína apotransferrina permanece unida a su receptor a este pH y recicla la superficie celular juntos. Paso 6: el pH neutro del medio externo provoca la liberación de la apotransferrina sin hierro. (Véase A. Ciechanover y cols., 1983, *J. Biol. Chem.* **258**:9681).

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 14.5

Endocitosis mediada por receptor

- Algunos ligandos extracelulares que se unen a receptores específicos de la superficie celular son internalizados, junto con sus receptores, en vesículas cubiertas de clatrina, cuyas cubiertas contienen, además, complejos PA2 (véase la Fig. 14-26).
- Las señales de clasificación del dominio citosólico de los receptores de la superficie celular los dirigen a hoyos recubiertos con clatrina/PA2 para su internalización. Las señales conocidas incluyen las secuencias Asn-Pro-X-Tyr, Tyr-X-X- Φ y Leu-Leu (véase el Cuadro 14-2).

- La vía endocítica entrega algunos ligandos (p. ej., partículas de LDL) a los lisosomas, donde son degradados. Las vesículas de transporte desde la superficie celular se fusionan primero con los endosomas tardíos, que posteriormente se fusionan con el lisosoma.
- La mayoría de los complejos receptor-ligando se disocian en el medio ácido del endosoma tardío; los receptores se reciclan a la membrana plasmática, mientras que los ligandos son destinados a los lisosomas (véase la Fig. 14-29).
- El hierro es importado al interior de las células mediante una vía endocítica en la cual los iones Fe^{3+} son liberados desde la ferrotransferrina del endosoma tardío. El complejo receptor-apotransferrina recicla a la

superficie celular, donde se disocia liberando tanto el receptor como la apotransferrina para volver a ser utilizada.

14.6 Direccionamiento de las proteínas de membrana y materiales citosólicos al lisosoma

La principal función de los lisosomas es degradar el material extracelular captado por la célula y los componentes intracelulares en ciertas condiciones. Los materiales que tienen que degradarse deberán ser entregados a la luz del lisosoma, donde residen las distintas enzimas que participan en la degradación. Como ya se analizó, los ligandos endocitados (p. ej., las partículas de LDL), que se disocian de sus receptores en el endosoma tardío, posteriormente entran a la luz del lisosoma cuando la membrana del endosoma tardío se fusiona con la membrana del lisosoma (véase la Fig. 14-29). De modo similar, los fagosomas que llevan bacterias u otro material sólido pueden fusionarse con los lisosomas, liberando su contenido en la luz para la degradación.

Es evidente de qué modo el mecanismo de tránsito general de las vesículas analizado en este capítulo puede ser empleado para entregar el contenido luminal de un orgánulo endosómico a la luz del lisosoma para su degradación; sin embargo, las proteínas de la membrana entregadas al lisosoma por el proceso de tránsito vesicular típico que hemos analizado en este capítulo deberían ser entregadas finalmente a la membrana del lisosoma. Entonces, ¿cómo se degradan las proteínas en el lisosoma? Como veremos en esta sección, la célula tiene dos vías especializadas distintas para entregar materiales a la luz del lisosoma a fin de que sean degradados: una para las proteínas de la membrana, y otra, para los materiales citosólicos. La primera vía, empleada para degradar las proteínas de membrana endocitadas, emplea un tipo inusual de vesícula que brota a la luz del endosoma, a fin de producir un endosoma multivesiculado. La segunda vía, conocida como **autofagia**, implica la formación de novo de un orgánulo con doble membrana, conocido como autofagosoma, que envuelve material citosólico como proteínas solubles, citosólicas o, en ocasiones, orgánulos como los peroxisomas o las mitocondrias. Ambas vías llevan a la fusión del endosoma multivesiculado o del autofagosoma con el lisosoma, depositando el contenido de estos orgánulos en la luz lisosómica para su degradación.

Los endosomas multivesiculados segregan proteínas de membrana destinadas a la membrana lisosómica desde las proteínas destinadas a la degradación lisosómica

Las proteínas lisosómicas, tales como las bombas protónicas de la clase V y los transportadores de aminoácidos, pueden llevar a cabo sus funciones y permanecer en la membrana del lisosoma, donde están protegidas de la degradación por las hidrolasas de la luz. Estas proteínas son entregadas a la membrana del lisosoma por vesículas de transporte que brotan de la red *trans*-Golgi por los mismos mecanismos básicos de membrana que se describieron en secciones previas. Por el contrario,

las proteínas de membrana endocitadas, tales como los receptores proteicos que deben ser degradados, son transferidas en su totalidad al interior del lisosoma por un sistema de entrega especializado. La degradación en los lisosomas de los receptores de la superficie celular para las moléculas de señalización extracelular es un mecanismo común para controlar la sensibilidad de las células a tales señales (Cap. 15). Los receptores que se dañan también están etiquetados para la degradación en los lisosomas.

La evidencia temprana de que las membranas pueden ser entregadas a la luz de los compartimientos provino de microfotografías electrónicas que mostraban vesículas de membrana y fragmentos de ellas dentro de los endosomas y los lisosomas. Experimentos paralelos hechos en levaduras revelaron que las proteínas receptoras endocitadas dirigidas a la vacuola (el organismo de la levadura equivalente al lisosoma) estaban asociadas primariamente con los fragmentos de membrana y pequeñas vesículas del interior de la vacuola más que con la membrana de la superficie vacuolar.

Estas observaciones sugieren que las proteínas de membrana endocitadas pueden ser incorporadas a vesículas especializadas que se forman en la membrana del endosoma (Fig. 14-32). Aunque estas vesículas son de tamaño y de aspecto similares a los de las de transporte, difieren topológicamente. Las vesículas de transporte brotan *hacia afuera* desde la superficie de un orgánulo donante hacia el citosol, mientras que las vesículas del interior del endosoma brotan *hacia adentro* desde la superficie hacia la luz (alejándose del citosol). Los endosomas maduros que contienen numerosas vesículas en su interior habitualmente se llaman *endosomas* (o cuerpos) *multivesiculados*. La membrana de superficie de un endosoma multivesiculado se fusiona con la membrana de un lisosoma, entregando, por lo tanto, sus vesículas internas y las proteínas de membrana que contienen al interior del lisosoma para la degradación. Así, la clasificación de las proteínas en la membrana del endosoma determina cuáles permanecerán en la superficie del lisosoma (p. ej., bombas y transportadores) y cuáles se incorporarán a las vesículas internas y, finalmente, se degradarán en los lisosomas.

Muchas de las proteínas requeridas para la gemación hacia adentro de la membrana del endosoma fueron identificadas inicialmente por mutaciones de las levaduras que bloqueaban la entrega de las proteínas de la membrana al interior de la vacuola. Más de diez proteínas de “gemación” de este tipo fueron identificadas en las levaduras, la mayoría de ellas con similitudes significativas con relación a las proteínas de mamífero, que evidentemente desempeñaban la misma función en ellos. El modelo actual de gemación endosómica para formar endosomas multivesiculados en las células de mamífero se basa primariamente en estudios hechos en levaduras (Fig. 14-33). La mayoría de las proteínas carga que entran al endosoma multivesiculado están etiquetadas con ubiquitina. Las proteínas carga destinadas a ingresar al endosoma multivesiculado, por lo general, reciben su etiqueta de ubiquitina en la membrana plasmática, la RTG o la membrana del endosoma. Ya hemos visto el modo en que el etiquetado con ubiquitina puede servir como una señal para la degradación de proteínas mal plegadas del RE o del aparato de Golgi por acción del proteasoma (véanse los Caps. 3 y 13). Cuando se emplea como una señal para la degradación proteasómica, la etiqueta de ubiquitina habitualmente consiste en una cadena de moléculas de ubiquitina unidas covalentemente (poliubiquitina), mientras que la ubiquitina empleada para etiquetar proteínas para su entrada al endosoma multivesiculado, por lo general, toma la forma de una

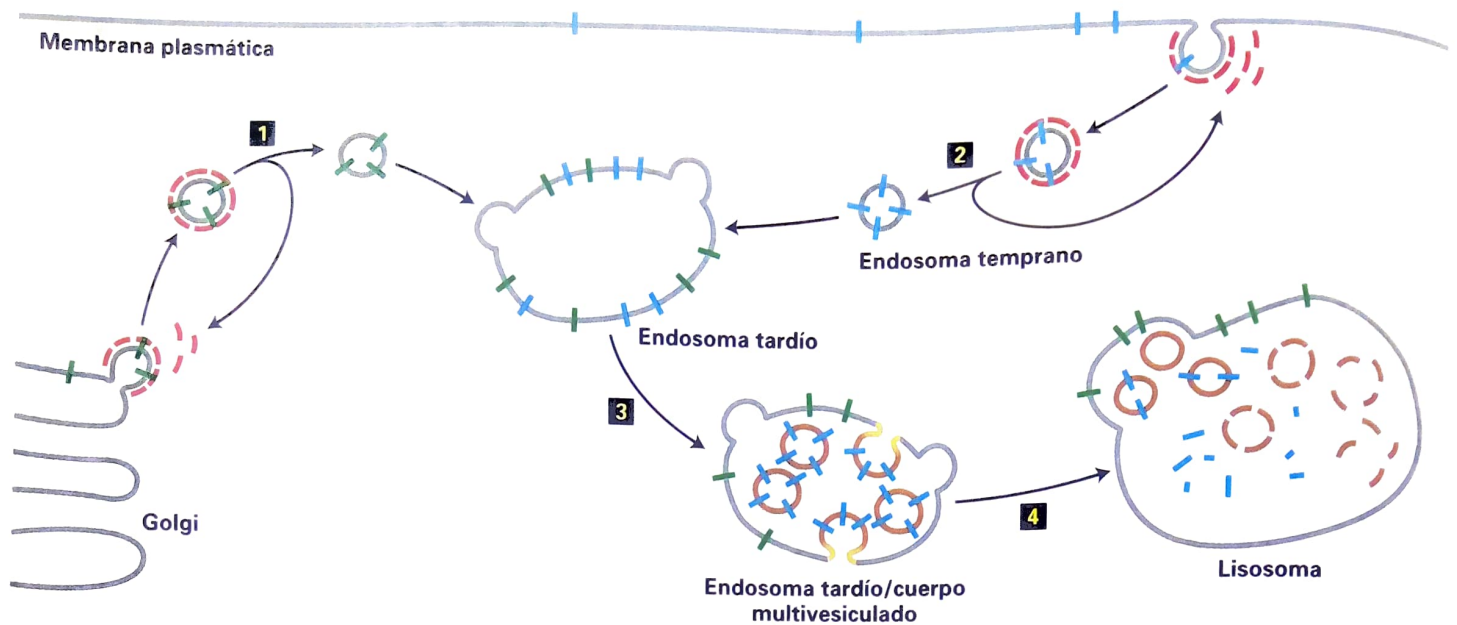


FIGURA 14-32 Entrega de las proteínas de la membrana plasmática al interior del lisosoma para su degradación.

Los endosomas tempranos que llevan las proteínas endocitadas de la membrana plasmática (azul) y las vesículas que llevan las proteínas lisosómicas de membrana (verde) de la red *trans*-Golgi se fusionan con el endosoma tardío transfiriendo sus proteínas de membrana a la membrana endosómica (pasos **1** y **2**). Las proteínas que deben degradarse, como las que provienen del endosoma temprano, se incorporan a las vesículas que brotan en el interior del endosoma tardío,

formando, finalmente, un endosoma multivesiculado que contiene muchas vesículas internas de este tipo (paso **3**). La fusión directa de un endosoma multivesiculado con un lisosoma libera las vesículas internas a la luz del lisosoma, donde pueden degradarse (paso **4**). Dado que las bombas protónicas y otras proteínas de la membrana del lisosoma normalmente no se incorporan a las vesículas endosómicas internas, son entregadas a la membrana del lisosoma y protegidas de la degradación. (Véanse F. Reggiori y D. J. Klionsky, 2002, *Eukaryot. Cell* **1**:11, y D. J. Katzmann y cols., 2002, *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* **3**:893).

molécula simple (monoubicuitina). En la membrana del endosoma, una proteína periférica de la membrana etiquetada con ubiquitina, conocida como Hrs, facilita el reclutamiento de un conjunto de tres complejos proteicos distintos a la membrana. Los **ESCRT** (*endosomal sorting complexes required for transport*, complejos de clasificación endosómica requeridos para el transporte) incluyen la proteína que une ubiquitina Tsg101. Las proteínas ESCRT asociadas a la membra-

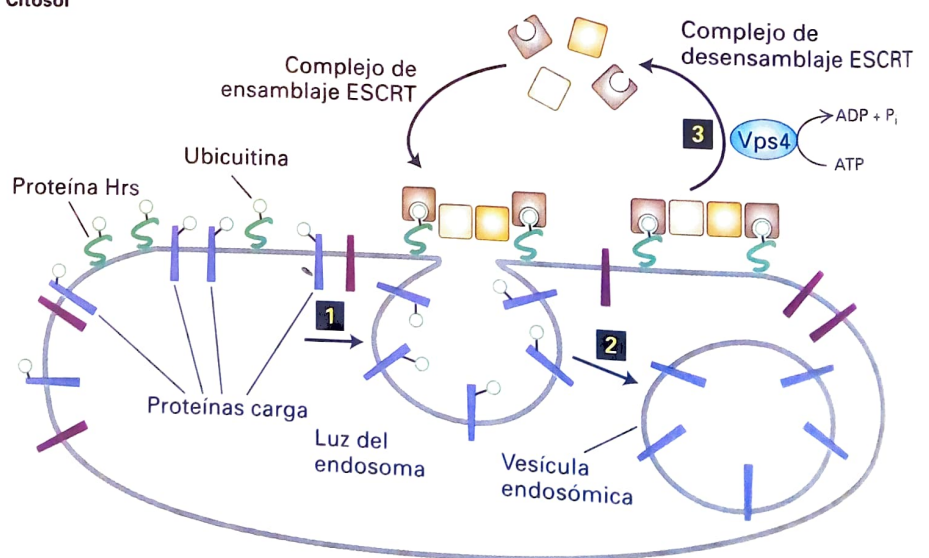
na actúan para impulsar la gemación de las vesículas dirigidas hacia el interior del endosoma, así como para ubicar las proteínas carga monoubicuitinadas específicas dentro de las vesículas en gemación. Finalmente, las proteínas ESCRT se desprenden de la vesícula, liberándola, junto con las proteínas carga específicas que contiene, en el endosoma. Una ATPasa conocida como Vps4 emplea la energía de la hidrólisis del ATP para desensamblar las proteínas del ESCRT,

Citosol

FIGURA 14-33 Modelo del mecanismo para la formación de endosomas multivesiculados.

En la formación de los endosomas, la Hrs ubiquitinada sobre la membrana del endosoma dirige la carga de proteínas carga específicas de la membrana (azul) al interior de los brotes de vesículas y, luego, recluta proteínas ESCRT a la membrana (paso **1**). Nótese que tanto la Hrs como las proteínas carga reclutadas están etiquetadas con ubiquitina. Después de que el conjunto de complejos ESCRT unidos media la compleción y el desprendimiento de las vesículas que brotan hacia el interior (paso **2**), estas se desensamblan por acción de la ATPasa Vps4 y vuelven al citosol (paso **3**). Véase el texto para un análisis.

(Adaptado de O. Pornillos y cols., 2002, *Trends Cell. Biol.* **12**:569).



liberándolas del citosol para otro ciclo de gemación. En el evento de fusión que desprende una vesícula endosómica completa, las proteínas del ESCRT y la Vps4 pueden funcionar como las SNARE y las NSF, respectivamente, en el proceso de fusión de la membrana típico analizado previamente (véase la Fig. 14-10).

Los retrovirus brotan de la membrana plasmática por un proceso similar a la formación de endosomas multivesiculados

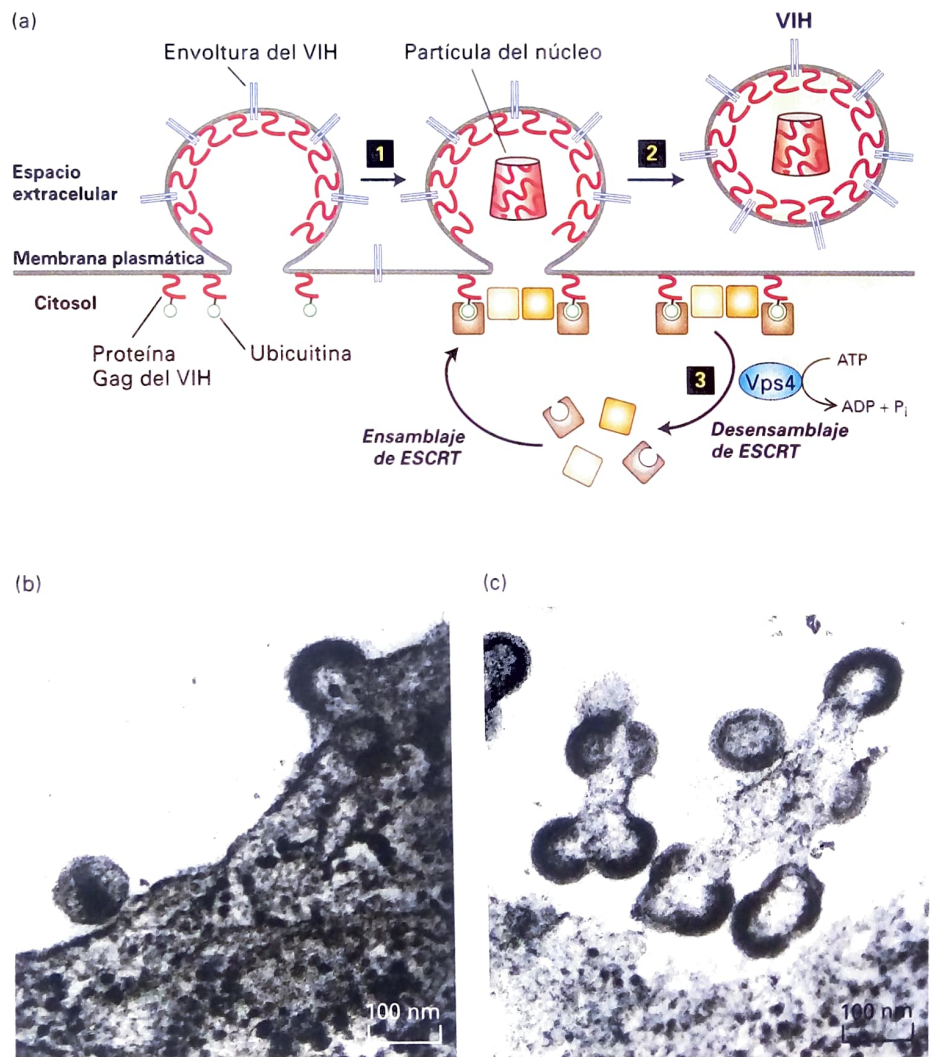
Las vesículas que brotan al interior de los endosomas tienen una topología similar a la de las partículas de virus con cubierta que brotan desde la membrana plasmática de las células infectadas por virus. Más aún, experimentos recientes demuestran que es necesario un conjunto común de proteínas para ambos tipos de eventos de gemación de membrana. De hecho, los dos procesos son tan similares entre sí en sus detalles mecánicos como para sugerir que los virus con envoltura han desarrollado mecanismos para reclutar proteínas celulares empleadas en el brote endosómico interno para sus propios propósitos.

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es un retrovirus con cubierta que brota desde la membrana plasmática de las células infectadas en un proceso impulsado por la proteína Gag, el componente estructural principal de las partículas virales completas. La proteína Gag se une a la membrana plasmática de una célula infectada y aproximadamente 4 000 moléculas de Gag se polimerizan en una cubierta esférica, produciendo una estructura que se asemeja a un brote de una vesícula que sobresale hacia el exterior desde la membrana plasmática. Estudios de mutación hechos con el VIH han revelado que el segmento N-terminal de la proteína Gag es necesario para la asociación con la membrana plasmática, mientras que el segmento C-terminal se necesita para el desprendimiento de las partículas de VIH completas; por ejemplo, si se remueve la porción del genoma viral que codifica para el extremo C-terminal de la Gag, los brotes de VIH se formarán en las células infectadas pero no se desprenderán y, por lo tanto, no se liberarán partículas nuevas del virus.

La primera indicación de que la gemación del VIH emplea la misma maquinaria molecular que la gemación de las vesículas en

ARCHIVO DE AUDIO (INGLÉS): Gemación del VIH desde la membrana plasmática

FIGURA 14-34 Mecanismo de la gemación del VIH desde la membrana plasmática. Las proteínas necesarias para la formación de los endosomas multivesiculados son explotadas por el VIH para la formación del virus desde la membrana plasmática. (a) La formación de las partículas del VIH desde las células infectadas por este virus ocurre mediante un mecanismo semejante al que se muestra en la Figura 14-33, empleando la proteína codificada por el virus Gag y las ESCRT y Vps4 celulares (pasos 1-3). La Gag ubiquitinada cercana a una partícula en gemación funciona como la Hrs. Véase el texto para un análisis. (b) En las células silvestres infectadas con el VIH, las partículas del virus brotan desde la membrana plasmática y se liberan rápidamente al espacio extracelular. (c) En las células que carecen de la proteína ESCRT funcional Tsg101, la proteína Gag viral forma estructuras densas viroides, pero no se puede completar la gemación de estas estructuras de la membrana plasmática y se acumulan cadenas de brotes virales incompletos unidos a la membrana plasmática. (Wes Sundquist, Universidad de Utah).



los endosomas provino de la observación de que la Tsg101, una proteína ESCRT, se une al extremo C-terminal de la proteína Gag. Hallazgos ulteriores han establecido claramente el paralelismo en el mecanismo entre ambos procesos; por ejemplo, la Gag se ubiquitina como parte del proceso de gemación del virus, y en las células con mutaciones en la Tsg101 o la Vps4 se acumulan brotes del virus VIH, pero no pueden desprenderse de la membrana (Fig. 14-34). Más aún, cuando un segmento de la proteína Hrs celular se añade a la proteína Gag truncada por la construcción del gen híbrido apropiado se restablecen las adecuadas gemación y liberación de las partículas virales. Tomados en conjunto, estos resultados indican que la proteína Gag mimetiza la función de la Hrs, redirigiendo las proteínas ESCRT a la membrana plasmática, donde pueden funcionar en la gemación de las partículas virales.

Otros retrovirus con envoltura, como el virus de la leucemia murina y el del sarcoma de Rous, también demostraron necesitar complejos ESCRT para su gemación, si bien cada virus parece haber desarrollado un mecanismo algo distinto para reclutar los complejos ESCRT en el sitio de gemación viral.

La vía autofágica entrega proteínas del citosol u orgánulos enteros a los lisosomas

Cuando las células se encuentran en condiciones de tensión, tales como la falta de alimento, tienen la capacidad de reciclar macromoléculas para emplearlas como nutrientes en un proceso de degradación lisosómica conocido como **autofagia** ("comerse a sí mismo"). La vía autofágica implica la formación de una estructura de copa con doble membrana aplastada que envuelve una región del

citosol o un orgánulo entero (p. ej., una mitocondria), formando un **autofagosoma** o una **vesícula autofágica** (Fig. 14-35). La membrana externa de una vesícula autofágica puede fusionarse con el lisosoma entregando una vesícula grande limitada por una bicapa de membrana simple al interior del lisosoma. De forma similar a lo que ocurre cuando el contenido de los endosomas multivesiculados se entregan al lisosoma, las lipasas y las proteasas dentro del lisosoma degradarán la vesícula autofágica y su contenido a sus componentes moleculares. Las permeasas de aminoácidos en la membrana del lisosoma permitirán luego el transporte de los aminoácidos libres nuevamente al citosol para ser usados en la síntesis de nuevas proteínas.

Al estudiar mutantes defectuosos en la vía autofágica, los científicos han identificado otros procesos distintos del reciclado de los componentes celulares durante la inanición que también dependen de la autofagia. Los experimentos desarrollados, principalmente, en moscas del género *Drosophila* y en ratones mostraron que la autofagia participa en un tipo de control de calidad que elimina orgánulos que han dejado de funcionar adecuadamente. En particular, la vía autofágica puede marcar para la destrucción mitocondrias disfuncionales que han perdido su integridad y ya no tienen un gradiente electroquímico a través de su membrana interna. En ciertos tipos celulares, las bacterias patógenas y los virus que se multiplican en el citosol de las células huésped pueden ser dirigidos a la vía autofágica a fin de ser destruidos en el lisosoma como parte de un mecanismo de defensa del huésped contra la infección.

Para cada uno de estos procesos, y en todos los organismos eucariotes, la vía autofágica ocurre en tres pasos básicos. Aunque los mecanismos subyacentes para cada uno de estos pasos se comprenden

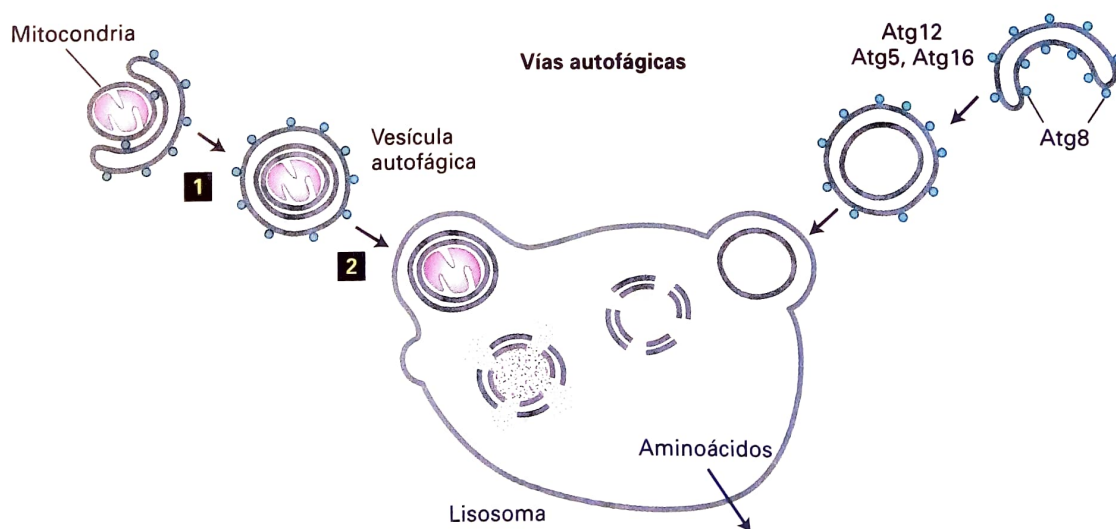


FIGURA 14-35 La vía autofágica. La vía autofágica permite que las proteínas citosólicas y los orgánulos sean entregados al interior del lisosoma para su degradación. En la vía autofágica se forma una estructura con forma de copa alrededor de porciones del citosol (a la derecha) o un orgánulo como una mitocondria, según se muestra aquí (a la izquierda). La adición continua de membrana finalmente conduce a la formación de una vesícula de autofagosoma que envuelve su contenido con dos membranas completas

(paso 1). La fusión de la membrana externa con la membrana de un lisosoma libera una vesícula con una sola capa y su contenido al interior del lisosoma (paso 2). Después de la degradación de los componentes proteicos y lipídicos por hidrolasas al interior del lisosoma, los aminoácidos liberados son transportados a través de la membrana del lisosoma al citosol. Entre las proteínas que se sabe que participan en la vía autofágica se incluye la Atg8, que forma una estructura de cubierta alrededor del autofagosoma.

escasamente, se piensa que están relacionados con los mecanismos básicos para el transporte de vesículas analizados en este capítulo.

Nucleación de vesículas autofágicas Se cree que una vesícula autofágica se origina a partir de un fragmento de un orgánulo rodeado de membrana. El origen de esta membrana ha sido difícil de rastrear porque no se conocen proteínas integrales de la membrana –las cuales podrían servir para identificar el origen de esta membrana– que resulten necesarias para la formación de la vesícula autofágica. Estudios hechos en levaduras han mostrado que algunos mutantes defectuosos en el tránsito en el aparato de Golgi también tienen defectos en la autofagia, lo cual sugiere que la vesícula autofágica deriva inicialmente de un fragmento del aparato de Golgi. La autofagia inducida por inanición parece ser un proceso no específico en el cual una porción cualquiera del citoplasma, incluyendo los orgánulos, es envuelta por un autofagosoma. En estas situaciones, el sitio de la nucleación probablemente sea azaroso. En casos en los cuales los orgánulos defectuosos son envueltos por el autofagosoma deberá haber algún tipo de señal o sitio de unión sobre la superficie del orgánulo para dirigir la nucleación de la vesícula autofágica.

Crecimiento y compleción de la vesícula autofágica La nueva membrana debe ser entregada a la membrana del autofagosoma para que este orgánulo en forma de copa crezca. Este crecimiento probablemente ocurra por la fusión de las vesículas de transporte con la membrana del autofagosoma. En rastreos genéticos en mutantes de levaduras defectuosas en la autofagia se han identificado alrededor de treinta proteínas que participan en la formación de los autofagosomas; una de estas proteínas es la Atg8, que se muestra en la **Figura 14-35** y está ligada al lípido fosfatidiletanolamina y, así, se une a la lamela citoplasmática de la vesícula autofágica. La asociación de la Atg8 con una vesícula de membrana parece ser el paso clave en capacitar la vesícula para fusionarse con el autofagosoma en crecimiento.

La fusión de las vesículas que contienen Atg8 con el autofagosoma implica la formación de un ensamble citosólico de Atg12, Atg5 y Atg16. La Atg12 es de estructura similar a la ubiquitina, y un conjunto de proteínas relacionadas a las enzimas que conjugan ubiquitina es responsable de la unión covalente de la Atg12 a la Atg5 mediante un proceso similar al empleado para unir covalentemente la ubiquitina a una proteína diana (véase la **Fig. 3-29**). El dímero covalentemente unido Atg12-Atg5 se coensambla luego con la Atg16 para formar un complejo polimérico localizado con el sitio de los autofagosomas en crecimiento. Se cree que, mediante un mecanismo desconocido, este complejo citosólico lleva a cabo la fusión con las vesículas que contienen Atg8 en un autofagosoma con forma de copa.

El direccionamiento de la vesícula autofágica y su fusión Se cree que la membrana externa del autofagosoma completo contiene un conjunto de proteínas que dirigen la fusión con la membrana del lisosoma. Dos proteínas de unión a la vesícula han demostrado ser necesarias para la fusión del autofagosoma con el lisosoma, pero no se han identificado las proteínas SNARE correspondientes. La fusión del autofagosoma con el lisosoma ocurre después de que la Atg8 se ha liberado de la membrana por escisión proteolítica, y este paso de proteólisis ocurre solo cuando la vesícula autofágica ha formado completamente un sistema de doble membrana sellado. Así, la proteína Atg8 parece enmascarar proteínas de fusión y evitar la fusión prematura del autofagosoma con el lisosoma.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 14.6

Direccionamiento de las proteínas de membrana y materiales citosólicos al lisosoma

- Las proteínas de la membrana endocitadas destinadas a la degradación en el lisosoma son incorporadas a vesículas que brotan al interior del endosoma. Los endosomas multivesiculados que contienen muchas de estas vesículas internas pueden fusionarse con el lisosoma para entregar las vesículas al interior de este (véase la **Fig. 14-32**).
- Algunos de estos componentes celulares (p. ej., ESCRT) que median el brote hacia dentro de las membranas endosómicas se emplean en la genación y el desprendimiento de los virus con cubierta, tales como el VIH, desde la membrana plasmática de las células infectadas por los virus (véanse las **Figs. 14-33 y 14-34**).
- Una porción del citoplasma de un orgánulo completo (p. ej., una mitocondria) puede estar envuelta en una membrana aplanada y ser, finalmente, incorporada a una vesícula autofágica de doble membrana. La fusión de la membrana externa con el lisosoma entrega el contenido envuelto al interior del lisosoma para su degradación (véase la **Fig. 14-35**).

Perspectivas para el futuro

La información bioquímica, genética y estructural presentada en este capítulo muestra que ahora tenemos una comprensión básica del modo en que el tránsito de proteínas fluye de un compartimento celular limitado por membrana a otro. Nuestra comprensión de estos procesos provino en gran medida de experimentos sobre la función de varios tipos de vesículas de transporte. Estos estudios han conducido a la identificación de muchos componentes vesiculados y al descubrimiento del modo en que ellos operan en conjunto para conducir la gemación de vesículas para incorporar el conjunto correcto de moléculas carga desde el orgánulo donante y, luego, para mediar la fusión de una vesícula completa con la membrana de un orgánulo diana.

A pesar de estos avances, todavía queda mucho por aprender acerca de etapas importantes de las vías secretora y endocítica. Por ejemplo, aún ignoramos qué tipo de proteínas forman las cubiertas de las vesículas reguladas o constitutivas de la secreción que brotan desde la red *trans*-Golgi. En el mismo sentido, ignoramos qué característica de la membrana del aparato de Golgi determina si brotará de ella una vesícula cubierta COPI o una vesícula cubierta de clatrina/PA. En ambos casos, la unión de una proteína ARF a la membrana del aparato de Golgi parece iniciar la gemación de la vesícula. Aún más, los tipos de señales de las proteínas carga que pueden etiquetarlas para ser empaquetadas en vesículas de secreción aún no se han definido. Otro proceso desconcertante es la formación de vesículas que brotan desde el citosol, tales como las que entran a los endosomas multivesiculados. Si bien algunas de las proteínas que participan en la formación de estas vesículas endosómicas “internas” se conocen, no sabemos qué es lo que determina su forma o qué tipo de proceso hace que se desprendan de la membrana donante. De forma similar, el origen y el crecimiento de la membrana

de la vesícula autofágica se comprenden también escasamente. En el futuro, estos y otros pasos escasamente comprendidos del tránsito de vesículas deberían poder analizarse a través del uso de la misma combinación poderosa de métodos bioquímicos y genéticos que han delineado las partes operativas de las vesículas de COPI, COPII y clatrina/PA.

Además de comprender los mecanismos básicos que dirigen el tránsito de las proteínas carga en las vías secretora y endocítica, un objetivo central de la investigación en esta área es definir todas las señales que dirigen las proteínas a locaciones intracelulares específicas. Aunque un número de secuencias de este tipo se conoce (véase el Cuadro 14-2), apenas hemos comenzado a compilar un catálogo de estas señales de direccionamiento y del contexto en el cual se leen. El objetivo último será deducir, comenzando por la secuencia de codificación primaria de un gen dado cualquiera, el patrón de tránsito y la localización intracelular del producto génico proteico. Nuestra capacidad de extraer completamente la información biológica de la secuencias genómicas será comprendida solamente cuando tengamos la capacidad de leer la información del tránsito desde las secuencias primarias de las proteínas.

Palabras clave

complejos PA	manosa 6-fosfato (M6P) 648
(proteína adaptadora) 646	endosomas
transportador anterógrado 640	multivesiculados 661
proteína ARF 635	proteínas Rab 638
autofagia 661	endocitosis mediada
maduración de la cisterna 629	por receptor 655
clatrina 634	secreción regulada 651
secreción constitutiva 651	transporte retrógrado 640
COPI 634	mutantes <i>sec</i> 632
COPII 634	vía secretora 627
dinamina 647	señales de clasificación 637
vía endocítica 627	transcitosis 654
proteínas ESCRT 000	red <i>trans</i> -Golgi (RTG) 629
endosoma tardío 629	vesículas de transporte 627
lipoproteína	t-SNARE 634
de baja densidad (LDL) 656	v-SNARE 634

Revisión de los conceptos

1. Los estudios de Palade y sus colegas usaron el marcado de pulso y caza de aminoácidos radiactivamente marcados y de autorradiografía para visualizar la localización de las proteínas recién sintetizadas en las células acinosas pancreáticas. Estos experimentos iniciales proporcionaron información muy valiosa acerca de la síntesis proteica y el transporte intercompartimental. Los nuevos métodos han reemplazado estos enfoques iniciales, pero aún son necesarios dos requisitos básicos, para cualquier ensayo, a fin de estudiar este tipo de transporte proteico. ¿Cuáles son y cómo los enfoques experimentales recientes satisfacen sus criterios?

2. El brote de las vesículas está asociado con las proteínas de cubierta. ¿Cuál es el papel de las proteínas de cubierta en el brote de las vesículas? ¿De qué modo se reclutan las proteínas de la cubierta en las membranas? ¿Qué tipos de moléculas es probable que sean incluidos o excluidos de las vesículas recién formadas? ¿Cuál es el ejemplo mejor conocido de una proteína que probablemente esté implicada en la liberación de las vesículas?

3. El tratamiento de las células con la droga brefeldina A (BFA) tiene el efecto de quitar la cubierta a las membranas del aparato de Golgi, dando como resultado una célula en la cual la gran mayoría de las proteínas del aparato de Golgi se encuentra en el RE. ¿Qué inferencias puede hacer a partir de esta observación con relación a los papeles de las proteínas de la cubierta, además de la promoción de la formación de vesículas? Prediga qué tipo de mutación en la Arf1 podría tener el mismo efecto que tratar las células con la BFA.

4. La microinyección de un anticuerpo conocido como EAGE que reacciona con la región de la "bisagra" de la subunidad β de la COPI provoca acumulación de las enzimas del aparato de Golgi en las vesículas de transporte e inhibe el transporte anterógrado de vesículas recién sintetizadas desde el RE hacia la membrana plasmática. ¿Qué efecto tiene el anticuerpo sobre la actividad COPI? Explique los resultados.

5. La especificidad en la fusión entre las vesículas implica dos procesos discretos y secuenciales. Describa el primero de los dos procesos y su regulación por las proteínas interruptoras GTPasa. ¿Qué efecto sobre el tamaño de los endosomas tempranos podría resultar de la sobreexpresión de una forma mutante de la Rab5 que está fijada en el estado unido a GTP?

6. *Sec18* es un gen de las levaduras que codifica NSF. Es una clase de mutante C en la vía secretora de las levaduras. ¿Cuál es el papel mecánico de la NSF en el tránsito de la membrana? Según lo indica su genotipo de la clase C, ¿por qué una mutación NSF produce acumulación de vesículas en la que parece haber solo una etapa de la vía secretora?

7. ¿Qué característica de la síntesis del procolágeno evidenció precozmente el modelo de maduración de las cisternas de Golgi?

8. Las señales de clasificación que causan el transporte retrógrado de una proteína en la vía secretora se conocen en ocasiones como secuencias de recuperación. Haga una lista de los dos ejemplos conocidos de secuencias de recuperación para proteínas solubles y de membrana del RE. ¿De qué manera la presencia de una secuencia de recuperación en una proteína soluble del RE resulta en su recuperación desde el complejo *cis*-Golgi? Describa el modo en que el concepto de una secuencia de recuperación es esencial para el modelo de maduración de la cisterna.

9. Los complejos de proteína adaptadora de la clatrina (PA) se unen directamente a la cara citosólica de las proteínas de la membrana y también interactúan con la clatrina. ¿Cuáles son los cuatro complejos proteicos adaptadores conocidos? ¿Qué observación con respecto a la PA3 sugiere que la clatrina es una proteína accesoria a una cubierta central compuesta de proteínas adaptadoras?

10. La enfermedad de las células I es un ejemplo clásico de un defecto humano heredado en el direccionamiento de las proteínas que afecta una clase entera de proteínas, las enzimas solubles del lisosoma. ¿Cuál es el defecto molecular en la enfermedad de las células I? ¿Qué afecta el direccionamiento de una clase entera de proteínas? ¿Qué otros tipos de mutaciones podría producir el mismo fenotipo?

11. La RTG, la red *trans*-Golgi, es el sitio de múltiples procesos de clasificación a medida que las proteínas y los lípidos salen del complejo de Golgi. Compare y contraste la clasificación de proteínas a los lisosomas con el empaquetamiento de las proteínas en los gránulos secretorios regulados, tales como los que contienen insulina. Compare y contraste la clasificación de proteínas a las superficies celulares basolateral y apical en las células MDCK y a los hepatocitos.

12. ¿Qué revela el brote de los virus de la gripe y de la estomatitis vesicular (VSV) de las células MDCK polarizadas acerca de la clasificación de las proteínas de la membrana plasmática recién sintetizadas hacia los dominios apical o basolateral? Considere ahora el siguiente resultado: un péptido con una secuencia idéntica al dominio citoplasmático de la proteína G del VSV inhibe el direccionamiento de la proteína G a la superficie basolateral y carece de efecto en el direccionamiento de la HA a la membrana apical, pero un péptido en el cual un único residuo de tirosina está mutado a una alanina no tiene efecto sobre la proteína G en su direccionamiento a la cara basolateral. ¿Qué le dice esto acerca del proceso de clasificación?

13. Describa el modo en que el pH desempeña un papel en la regulación de la interacción entre la manosa 6-fosfato y el receptor de la manosa 6-fosfato. ¿Por qué el aumento del pH de los endosomas lleva a la secreción de enzimas lisosómicas recién sintetizadas al medio extracelular?

14. ¿Qué características mecánicas se comparten entre (a) la formación de endosomas multivesiculados por gemación al interior del endosoma y (b) la gemación hacia el exterior del VIH en la superficie de la célula? Usted desea diseñar un péptido inhibidor/competidor de la gemación del VIH y decide mimetizar en un péptido sintético una porción de la proteína Gag del VIH. ¿Qué porción de la proteína Gag del VIH sería una elección lógica? ¿Qué proceso celular normal bloquearía este inhibidor?

15. Las vías fagocítica y autofágica cumplen dos funciones fundamentales, pero ambas entregan sus vesículas al lisosoma. ¿Cuáles son las diferencias fundamentales entre ambas vías? Describa los tres pasos básicos en la formación y la fusión de las vesículas autofágicas.

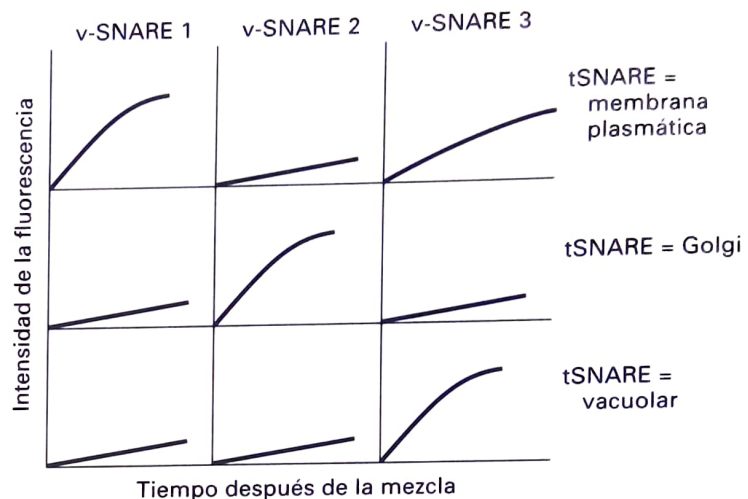
16. Compare y contraste la ubicación y la sensibilidad al pH de la interacción receptor-ligando de las vías de endocitosis mediada por receptor (EMR) de la LDL y la transferrina.

17. ¿Qué revelan las mutaciones del dominio citoplasmático del receptor de LDL (LDLR) que provocan hipercolesterolemia familiar acerca de la vía de la endocitosis mediada por receptor (EMR)?

Análisis de los datos

1. Para examinar la especificidad de la fusión de membrana conferida por las v-SNARE y t-SNARE específicas, los investigadores reconstituyeron liposomas (membranas lipídicas artificiales) con complejos t-SNARE o v-SNARE específicos (véase McNew y cols., 2000, *Nature* 407:153-159). Para medir la fusión, los liposomas con v-SNARE también contenían un lípido fluorescente a una concentración relativamente elevada, de modo tal que su fluorescencia se autoapagaba (el autoapagado es la reducción de la fluorescencia relativo a lo esperado. En este caso, el autoapagado ocurre porque los lípidos fluorescentes están demasiado concentrados e interfieren con la capacidad del resto como para excitarse). Al fusionarse estos liposomas con los que carecían del

lípido fluorescente, los lípidos con fluorescencia se diluían y disminuía el autoapagado. Tres conjuntos de liposomas se prepararon empleando los complejos t-SNARE de las levaduras: con t-SNARE de la membrana plasmática, con t-SNARE del aparato de Golgi y con t-SNARE vacuolar. Cada uno de ellos se mezcló con liposomas fluorescentes que contenían una de tres v-SNARE diferentes de levaduras. Se obtuvieron los siguientes datos:

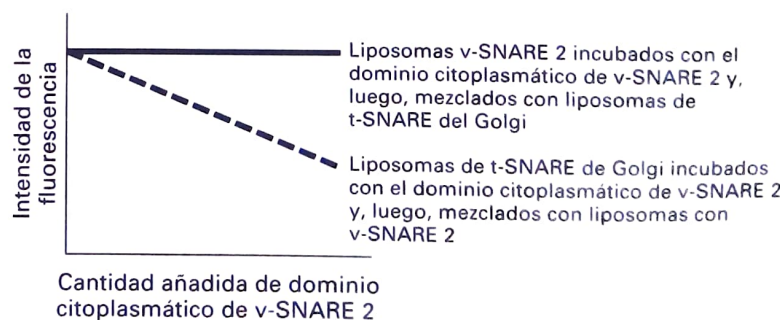


a. ¿Qué puede deducirse de estos datos acerca de la especificidad de los eventos de fusión de la membrana?

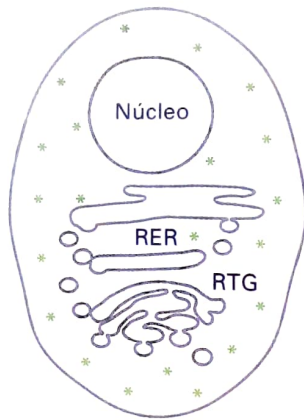
b. ¿Dónde podría esperar encontrar v-SNARE 1, 2 y 3 en las levaduras?

c. ¿Qué clase de experimento diseñaría para determinar en qué lugar de la vía secretora se requeriría un v-SNARE in vivo?

d. El dominio citoplasmático de la v-SNARE 2 se ha expresado y purificado a partir de *E. coli*. Cantidades variables de este dominio se incubaron con los liposomas de t-SNARE de Golgi o con liposomas v-SNARE 2; luego, los liposomas se lavaron y quedaron libres de proteína unida. Los distintos liposomas se mezclaron según se indicó y se midió la fluorescencia de cada muestra una hora después de mezcladas. ¿De qué manera podrían explicarse los datos? ¿Cómo podría predecir el resultado si las levaduras sobreexpresaran el dominio citoplasmático de la v-SNARE 2?

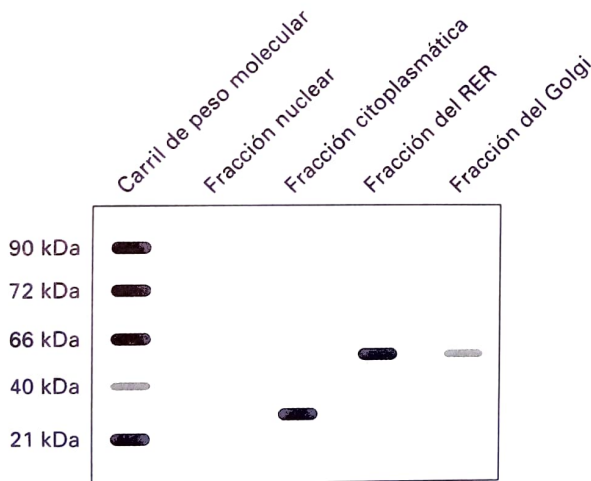


2. Usted ha diseñado genéticamente una proteína fluorescente verde (PFV) que contiene la secuencia KDEL. Cuando el constructo es transferido a fibroblastos humanos normales y examinado al microscopio de fluorescencia se ve fluorescencia en todo el citoplasma, según se muestra más abajo.



a. ¿Cómo explicaría este patrón, dado que se supone que KDEL es una secuencia de clasificación específica para el RE?

b. Para analizar los resultados más ampliamente se reunieron fracciones de diferentes orgánulos y del citoplasma a partir de células que expresaban este constructo de PFV que contenía KDEL y, luego, se examinaron con el método de transferencia Western empleando anticuerpos contra la PFV (de 27 kDa) y la proteína isomerasa disulfuro (PDI), una proteína residente del RE rugoso (RER) de, aproximadamente, 55 kDa.

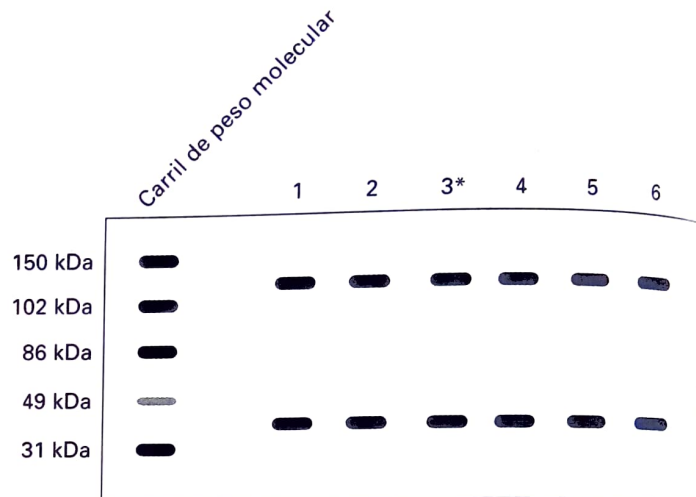


La transferencia confirma la presencia de PFV exclusivamente en el citoplasma y, como se esperaba, una señal PDI en la fracción RER. ¿Cómo explicaría la banda de PDI, aunque débil, en la fracción de Golgi? Dada la función de las proteínas PDI, ¿qué esperaría si ambos alelos de un gen de PDI estuvieran inactivados en un ratón?

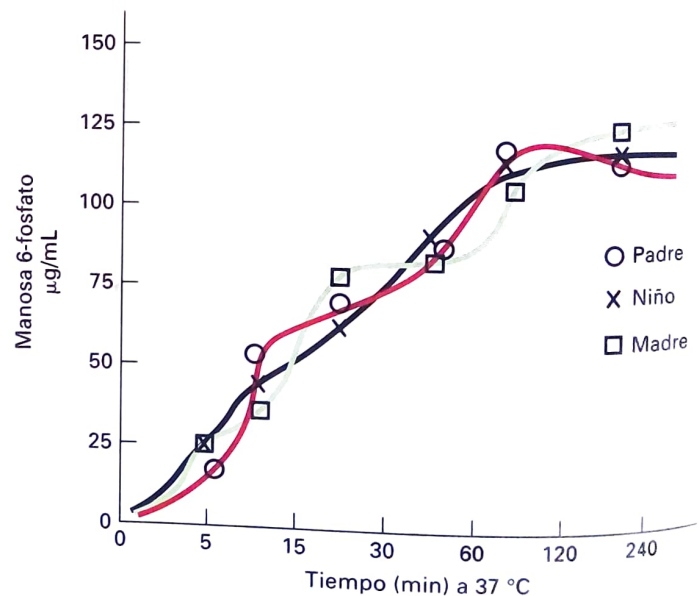
c. Los anticuerpos empleados más arriba no detectan ninguna señal en la fracción nuclear, lo cual indica su especificidad o el hecho de que no se aislaron proteínas y se cargaron en el carril de la fracción nuclear. ¿Qué anticuerpo debería usarse para mostrar que había proteínas nucleares presentes en esta muestra?

3. Un niño parece estar afectado por la enfermedad de las células I, pero cuando la muestra de sus proteínas (columna 3*, abajo), aisladas de fibroblastos de la piel, se compara con las muestras de proteínas de

fibroblastos de sus padres (columnas 1 y 2) y de sus hermanos (columnas 4 a 6), todos sanos, empleando método de transferencia Western y anticuerpos contra *N*-acetilglucosamina fosfotransferasa (~ 145 kDa) y actina (control carga, ~ 43 kDa), se observa lo siguiente:



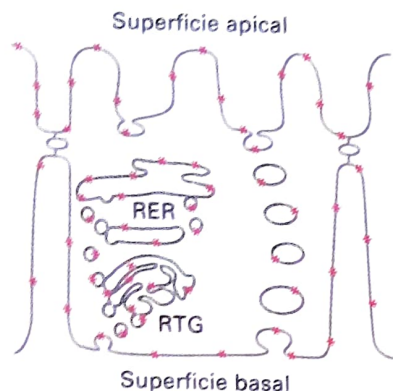
En un segundo conjunto de experimentos, la *N*-acetilglucosamina fosfotransferasa se aisló de las células del niño afectado y de sus padres, sanos, y se empleó en un ensayo con ^{32}P para medir la actividad enzimática y la producción de manosa 6-fosfato. El ensayo dio los siguientes resultados:



a. A partir de fibroblastos cultivados del niño, diseñe un experimento empleando anticuerpo de *N*-acetilglucosamina fosfotransferasa y microscopía de fluorescencia y extraiga los resultados que permitan explicar por qué el niño presenta síntomas similares a los de la enfermedad de células I.

b. Dados los resultados de estos tres experimentos, ¿cómo explicaría los síntomas de la enfermedad de células I presentes en el niño y qué experimento propondría para probar su hipótesis?

c. Una microfotografía confocal de barrido láser de las células MDCK marcadas con un anticuerpo contra el receptor de manosa 6-fosfato muestra lo siguiente:



¿Cómo explicaría el marcado de las superficies apical y basolateral para un receptor cuya función es dirigir las enzimas desde la red *trans*-Golgi (RTG) hacia el lisosoma? De modo similar, ¿qué explica la marca vista en el RER?

Referencias

Técnicas para el estudio de la vía secretora

- Beckers, C. J., et al. 1987. Semi-intact cells permeable to macromolecules: use in reconstitution of protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi complex. *Cell* 50:523-534.
- Kaiser, C. A., and R. Schekman. 1990. Distinct sets of SEC genes govern transport vesicle formation and fusion early in the secretory pathway. *Cell* 61:723-733.
- Novick, P., et al. 1981. Order of events in the yeast secretory pathway. *Cell* 25:461-469.
- Lippincott-Schwartz, J., et al. 2001. Studying protein dynamics in living cells. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2:444-456.
- Orci, L., et al. 1989. Dissection of a single round of vesicular transport: sequential intermediates for intercompartmental movement in the Golgi stack. *Cell* 56:357-368.
- Palade, G. 1975. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189:347-358.

Mecanismos moleculares de formación y fusión de las vesículas

- Bonifacino, J. S., and B. S. Glick. 2004. The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* 116:153-166.
- Grosshans, B. L., D. Ortiz, and P. Novick. 2006. Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:11821-11827.
- Jahn, R., et al. 2003. Membrane fusion. *Cell* 112:519-533.
- Kirchhausen, T. 2000. Three ways to make a vesicle. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 1:187-198.
- McNew, J. A., et al. 2000. Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. *Nature* 407:153-159.

Ostermann, J., et al. 1993. Stepwise assembly of functionally active transport vesicles. *Cell* 75:1015-1025.

Schimmöller, F., I. Simon, and S. Pfeffer. 1998. Rab GTPases, directors of vesicle docking. *J. Biol. Chem.* 273:22161-22164.

Weber, T., et al. 1998. SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell* 92:759-772.

Wickner, W., and A. Haas. 2000. Yeast homotypic vacuole fusion: a window on organelle trafficking mechanisms. *Ann. Rev. Biochem.* 69:247-275.

Zerial, M., and H. McBride. 2001. Rab proteins as membrane organizers. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2:107-117.

Etapas iniciales de la vía secretora

Barlowe, C. 2003. Signals for COPII-dependent export from the ER: what's the ticket out? *Trends Cell Biol.* 13:295-300.

Behnia, R., and S. Munro. 2005. Organelle identity and the signposts for membrane traffic. *Nature* 438:597-604.

Bi, X., et al. 2002. Structure of the Sec23/24-Sar1 pre-budding complex of the COPII vesicle coat. *Nature* 419:271-277.

Gurkan, C., et al. 2006. The COPII cage: unifying principles of vesicle coat assembly. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7:727-738.

Lee, M. C., et al. 2004. Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 20:87-123.

Letourneur, F., et al. 1994. Coatamer is essential for retrieval of dilysine-tagged proteins to the endoplasmic reticulum. *Cell* 79:1199-1207.

Losev, E., et al. 2006. Golgi maturation visualized in living yeast. *Nature* 441:1002-1006.

Pelham, H. R. 1995. Sorting and retrieval between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7:530-535.

Etapas finales de la vía secretora

Bonifacino, J. S. 2004. The GGA proteins: adaptors on the move. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5:23-32.

Bonifacino, J. S., and E. C. Dell'Angelica. 1999. Molecular bases for the recognition of tyrosine-based sorting signals. *J. Cell Biol.* 145:923-926.

Edeling, M. A., C. Smith, and D. Owen. 2006. Life of a clathrin coat: insights from clathrin and AP structures. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7:32-44.

Fotin, A., et al. 2004. Molecular model for a complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy. *Nature* 432:573-579.

Ghosh, P., et al. 2003. Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4:202-213.

Mostov, K. E., M. Verges, and Y. Altschuler. 2000. Membrane traffic in polarized epithelial cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12:483-490.

Schmid, S. 1997. Clathrin-coated vesicle formation and protein sorting: an integrated process. *Ann. Rev. Biochem.* 66:511-548.

Simons, K., and E. Ikonen. 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387:569-572.

Song, B. D., and S. L. Schmid. 2003. A molecular motor or a regulator? Dynamin's in a class of its own. *Biochemistry* 42:1369-1376.

Steiner, D. F., et al. 1996. The role of prohormone convertases in insulin biosynthesis: evidence for inherited defects in their action in man and experimental animals. *Diabetes Metab.* 22:94-104.

Tooze, S. A., et al. 2001. Secretory granule biogenesis: rafting to the SNARE. *Trends Cell Biol.* 11:116-122.

Endocitosis mediada por receptor

Brown, M. S., and J. L. Goldstein. 1986. Receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. Nobel Prize Lecture. *Science* 232:34-17.

Kaksonen, M., C. P. Toret, and D. G. Drubin. 2006. Harnessing actin dynamics for clathrin-mediated endocytosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7:404-414.

Rudenko, G., et al. 2002. Structure of the LDL receptor extracellular domain at endosomal pH. *Science* 298:2353-2358.

Direccionamiento de las proteínas de membrana y materiales citosólicos al lisosoma

Geng, J., and D. J. Klionsky. 2008. The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. *EMBO Rep.* 9:859-864.

Henne, W. M., N. J. Buchkovich, and S. D. Emr. 2011. The ESCRT pathway. *Dev. Cell* 21:77-91.

Katzmann, D. J., et al. 2002. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 3:893-905.

Lemmon, S. K., and L. M. Traub. 2000. Sorting in the endosomal system in yeast and animal cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12:457-466.

Pornillos, O., et al. 2002. Mechanisms of enveloped RNA virus budding. *Trends Cell Biol.* 12:569-579.

Shintani, T., and D. J. Klionsky. 2004. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* 306:990-995.

Seguimiento de una proteína hacia el exterior de la célula

J. Jamieson y G. Palade, 1966, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 55(2):424-431

La llegada de la microscopía electrónica permitió a los investigadores ver la célula y sus estructuras con un nivel de detalle sin precedentes. George Palade empleó esta herramienta no solo para mirar los detalles finos de la célula, sino también para analizar el proceso de secreción. Combinando la microscopía electrónica con los experimentos de pulso y caza, Palade descubrió las vías que las proteínas seguían para salir de la célula.

Antecedentes

Además de sintetizar proteínas para llevar a cabo funciones celulares, muchas células también producen y secretan proteínas adicionales que desempeñan sus tareas fuera de las células. Los biólogos celulares, incluido Palade, se preguntaron cómo las proteínas secretadas pasaban desde el interior hacia el exterior de la célula. Los experimentos iniciales que sugerían que las proteínas destinadas para la secreción se sintetizan en una localización intracelular particular y, luego, siguen una vía hasta la superficie celular empleaban métodos que rompían las células que sintetizaban una proteína secretada en particular y separaban sus diferentes orgánulos por centrifugación. Estos estudios de fraccionamiento celular mostraron que las proteínas secretadas pueden encontrarse en vesículas rodeadas por membrana derivadas del retículo endoplasmático (RE), donde se sintetizan, y dentro de los gránulos de zimógeno, desde donde, finalmente, se liberan. Desafortunadamente, los resultados de estos estudios resultaban difíciles de interpretar debido a las dificultades para obtener una separación limpia de todos los diferentes orgánulos que contienen proteínas secretadas. Para esclarecer adicionalmente la vía, Palade se volvió hacia una técnica recién desarrollada: la autorradiografía de alta resolución, que le permitió detectar la posición de proteínas marcadas radiactivamente en cortes finos de células que habían sido preparadas para el microscopio electrónico de orgánulos intracelulares. Su trabajo condujo al hallazgo fundamental de que las proteínas secretadas

viajan dentro de vesículas desde el RE hacia el complejo de Golgi y, luego, a la membrana plasmática.

El experimento

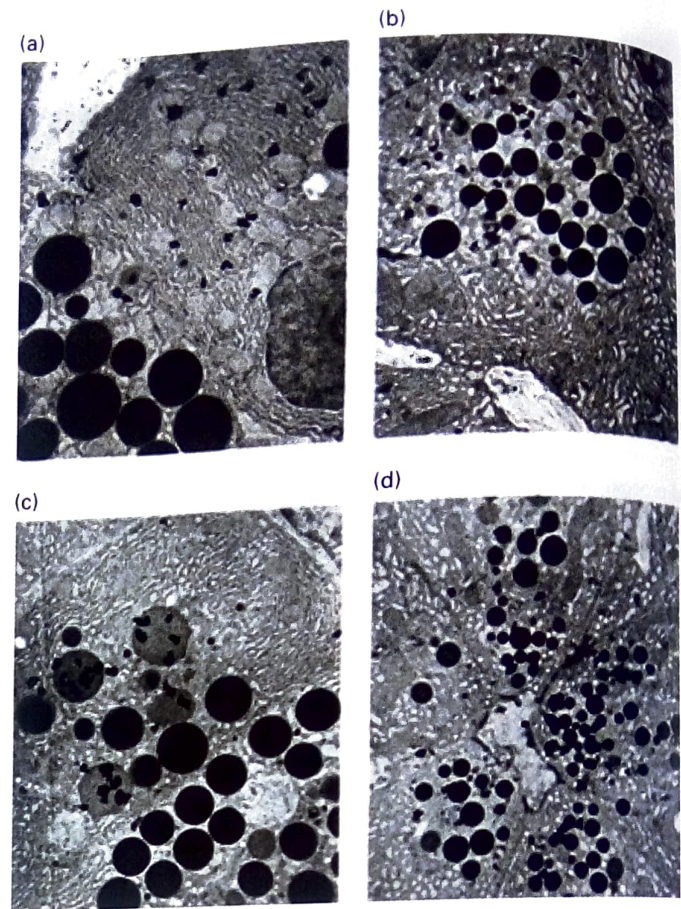
Palade deseaba identificar qué estructuras y orgánulos celulares participaban en la secreción de las proteínas. Para estudiar tal proceso complejo escogió cuidadosamente un sistema modelo apropiado para sus estudios, la célula exocrina pancreática responsable de la producción y la secreción de grandes cantidades de enzimas digestivas. Dado que estas células tienen la propiedad inusual de expresar solo proteínas secretadas, una marca general para una proteína recién sintetizada, tal como la leucina marcada radiactivamente, solo sería incorporada a moléculas de proteína que siguieran la vía de secreción.

Palade examinó en primer lugar la vía de secreción de la proteína in vivo, inyectando a cobayas vivas [^3H]-leucina, que fue incorporada a las proteínas recién sintetizadas, marcándolas radiactivamente. En distintos momentos, desde 4 minutos hasta 15 horas, sacrificó a los animales y fijó el tejido pancreático. Sometiendo las muestras a autorradiografía y visualizándolas en el microscopio electrónico pudo seguir la localización de las proteínas marcadas en las células en diferentes momentos. Como esperaba, la radiactividad se localizaba en vesículas en el RE en momentos puntuales —inmediatamente después de la inyección de [^3H]-leucina— y en la membrana plasmática en los últimos puntos de tiempo. La sorpresa se produjo en los puntos temporales intermedios. Más que viajar linealmente desde el RE hasta la membrana plasmática, las proteínas marcadas radiactivamente parecían detenerse en el complejo de Golgi en el medio de su viaje. Además, no había un momento en el cual las proteínas radiomarcadas no quedaran confinadas en las vesículas.

La observación de que el complejo de Golgi estaba involucrado en la secreción de las proteínas resultó tan sorprendente como intrigante. Para establecer completamen-

te el papel de este orgánulo en la secreción de proteínas, Palade se valió de los experimentos de pulso y caza in vitro, que le permitieron una monitorización más precisa del destino de las proteínas marcadas. Con esta técnica de marcado expuso las células al precursor radiomarcado —en este caso, [^3H]-leucina— durante un período breve, conocido como el *pulso*. El precursor radiactivo fue reemplazado luego con una forma no marcada, para el período ulterior de *caza*. Las proteínas sintetizadas durante el período de pulso estarían marcadas y se detectarían por autorradiografía, mientras que aquellas sintetizadas durante el período de caza, las cuales no estarían marcadas, no se detectarían. Palade comenzó cortando el páncreas de cobayas en lonchas gruesas que, luego, fueron incubadas durante tres minutos en un medio que contenía [^3H]-leucina. Al final del pulso, añadió un exceso de leucina no marcada. Luego, las lonchas de tejido fueron fijadas para autorradiografía, o bien se usaron para el fraccionamiento celular. Para asegurarse de que sus resultados fueran un reflejo preciso de la secreción de proteína in vivo, Palade caracterizó meticulosamente el sistema. Una vez convencido de que su sistema in vitro mimetizaba con precisión la secreción de proteínas in vivo, procedió al experimento crítico. Hizo pulso de marcado en lonchas de tejido con [^3H]-leucina durante tres minutos y, luego, hizo caza de la marca durante 7, 17, 37, 57 y 117 minutos con leucina no marcada. Nuevamente, la radiactividad confinada en las vesículas comenzaba en el RE, viajaba en vesículas al complejo de Golgi y permanecía en las vesículas a medida que pasaban a través del aparato de Golgi y a la membrana plasmática (véase la Fig. 1). A medida que las vesículas viajaban más lejos a lo largo de la vía, se volvían más densamente empaquetadas con la proteína radiactiva. A partir de esta notable serie de autorradiogramas en diferentes momentos de caza, Palade concluyó que las proteínas secretadas viajan en vesículas desde el RE hacia el aparato de Golgi y a la membrana plasmática y que, a lo largo de este proceso, permanecen en vesículas y no se mezclan con el resto de la célula.

FIGURA 1 Síntesis y movimiento de las proteínas secretorias pancreáticas de cobayas en autorradiografía microscópica electrónica. Después del marcado con $[^3\text{H}]$ - leucina, se fija el tejido, se corta para microscopio electrónico y se fotografía. La semidesintegración del $[^3\text{H}]$ en las proteínas sintetizadas produce gránulos en la emulsión, densos y similares a gusanos, que marcan su posición. (a) A los 3 minutos, los gránulos están sobre el RER. (b) A los 7 minutos, la mayor parte está en el Golgi. (c) A los 37 minutos, la mayor parte se encuentra en vesículas inmaduras. (d) A los 117 minutos, la mayor parte está en gránulos de zimógeno. (Cortesía de J. Jamleson y G. Palade.)



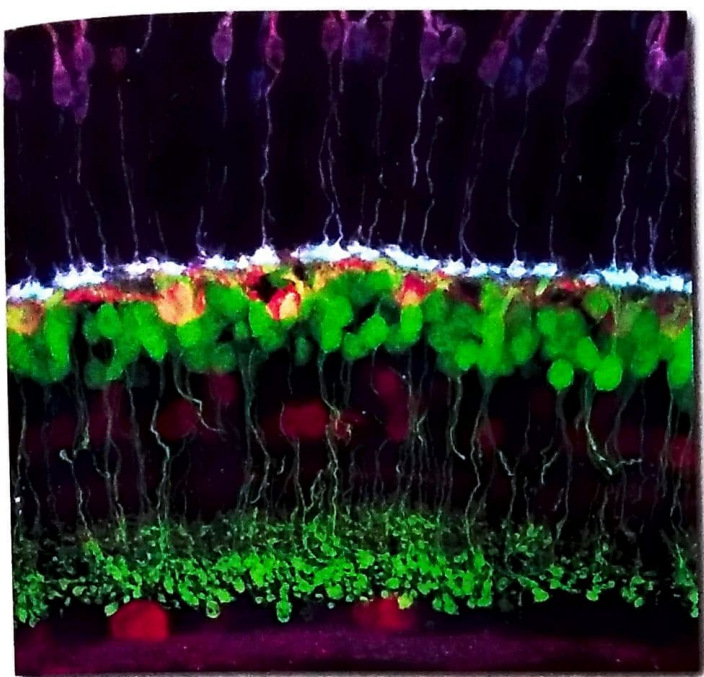
Análisis

Los experimentos de Palade proporcionaron a los biólogos la primera mirada clara sobre las etapas de la vía de secreción. Sus estudios sobre las células exocrinas del páncreas facilitaron dos observaciones fundamentales. La primera, que las proteínas secretadas pasan a través del complejo de Golgi en su camino hacia el exterior de la célula: esta fue la primera función asignada al complejo de Golgi; la segunda, que las proteínas que serán secretadas

nunca se mezclan con las proteínas celulares del citosol, sino que se segregan en vesículas durante todo el camino. Estos hallazgos fueron obtenidos a partir de dos aspectos importantes del diseño experimental. El cuidadoso uso de Palade de la microscopia electrónica y la autorradiografía le permitió mirar los detalles finos de la vía. De igual importancia fue la elección del tipo celular destinado a la secreción, la célula exocrina pancreática como sistema modelo. En un tipo celular distinto, cantidades significativas de proteínas no se-

cretadas también se hubieran producido durante el marcado, oscureciendo el destino de las proteínas secretadas en particular.

El trabajo de Palade estableció las bases para estudios más detallados. Una vez que la vía secretora fue descrita con claridad, campos enteros de investigación se abrieron para investigar la síntesis y el movimiento de proteínas secretadas tanto como el de proteínas de membrana. Por este trabajo fundamental, Palade recibió el premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1974.



La retina del ratón contiene fotorreceptores (púrpura) que detectan la luz mediante receptores acoplados a proteína G y otros cuatro tipos de neuronas (teñidas con amarillo, verde, rosa y azul) que conectan las células fotorreceptoras con el cerebro. (Rachel Wong, University of Washington)

Transducción de la señal y receptores acoplados a proteína G

Ninguna célula vive aislada. La comunicación celular es una propiedad fundamental de todas las células y formas que se desarrollan y funcionan en cada organismo vivo. Incluso los microorganismos eucariontes unicelulares, como las levaduras, los mohos y los protozoos, se comunican a través de las señales extracelulares: moléculas secretadas llamadas **feromonas** que coordinan la agregación de las células vivas para el apareamiento sexual o la diferenciación en ciertas condiciones ambientales. En las plantas y los animales, son más importantes las **hormonas** y otras moléculas de señalización extracelular que funcionan *dentro* de un organismo para controlar una variedad de procesos, incluyendo el metabolismo de azúcares, grasas y aminoácidos, el desarrollo y la diferenciación de tejidos, la síntesis y la secreción de proteínas y la composición de líquidos intra y extracelulares. Muchos tipos de células también responden a las señales del ambiente externo, incluyendo la luz, el oxígeno, los olores y los sabores en los alimentos.

En cualquier sistema, para que una señal tenga un efecto sobre un blanco, precisa ser recibida. En las células, una señal produce una respuesta específica solo en las células diana con **receptores** para esa señal. Para algunos receptores, esta señal es un estímulo físico como la

luz, el tacto, o el calor. Para otros, es una molécula química. Muchos tipos de químicos se utilizan como señales: pequeñas moléculas (p. ej., aminoácidos o derivados de lípidos, acetilcolina), gases (óxido nítrico), péptidos (tales como ACTH y vasopresina), proteínas solubles (p. ej., insulina y hormona de crecimiento) y proteínas que están sujetas a la superficie de una célula o unidas a la matriz extracelular. Muchas de estas moléculas de señalización son sintetizadas y liberadas por células de señalización especializadas dentro de organismos multicelulares. La mayoría de los receptores se unen a una única molécula o a un grupo de moléculas estrechamente relacionadas.

Algunas moléculas de señalización, en especial moléculas hidrófobas como los esteroides, los retinoides y la tiroxina, difunden espontáneamente a través de la membrana plasmática y se unen a receptores intracelulares; en el **Capítulo 7** se analiza en detalle la señalización a partir de tales receptores intracelulares.

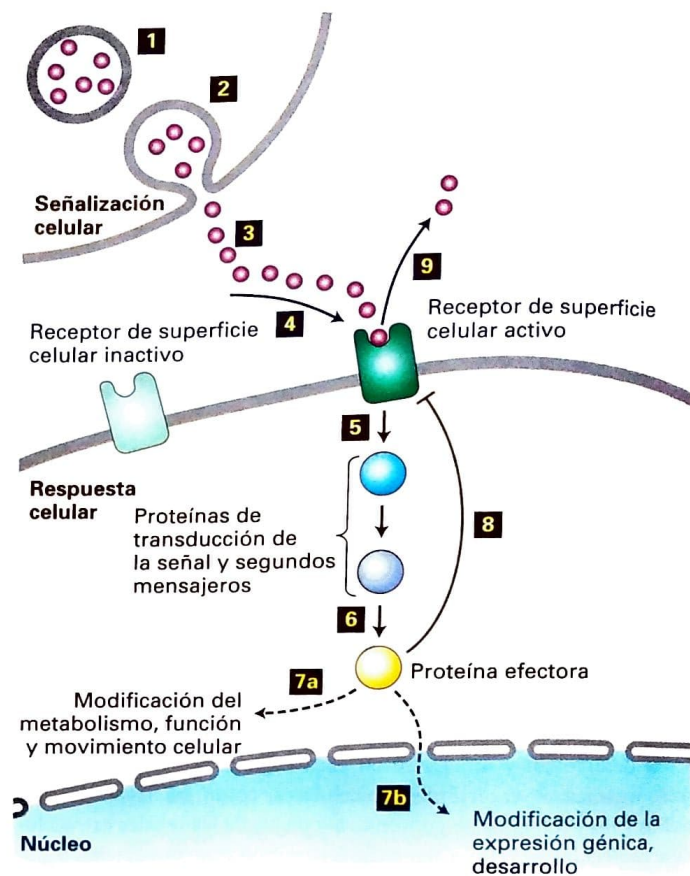
Sin embargo, la mayoría de las moléculas de señalización son demasiado grandes y demasiado hidrófilas para penetrar la membrana plasmática. ¿Entonces cómo pueden afectar los procesos intracelulares? Estas moléculas de señalización se unen a receptores de la superficie celular que son proteínas integrales de membrana embebidas en la

CONTENIDO

15.1 Transducción de la señal: desde la señal extracelular hasta la respuesta celular	675
15.2 Estudio de los receptores de la superficie celular y proteínas que transducen las señales	681
15.3 Receptores acoplados a proteína G: estructura y mecanismo	687

15.4 Receptores acoplados a proteína G que regulan los canales iónicos	693
15.5 Receptores acoplados a proteína G que activan o inhiben la adenilciclase	699
15.6 Receptores acoplados a proteína G que desencadenan elevaciones en el Ca^{2+} citosólico	707

FIGURA 15-1 Panorama general de la señalización mediante receptores de la superficie celular. La comunicación mediante las señales extracelulares suele involucrar los siguientes pasos: síntesis de la molécula de señalización por las células de señalización y su incorporación en pequeñas vesículas intracelulares (paso 1), su liberación en el espacio extracelular por exocitosis (paso 2) y transporte de la señal hasta la célula diana (paso 3). La unión de la molécula de señalización a una proteína receptora de la superficie celular específica desencadena un cambio conformacional en el receptor y lo activa (paso 4). El receptor activado luego activa una o más proteínas de transducción de la señal corriente abajo o pequeñas moléculas de segundos mensajeros (paso 5), lo que eventualmente lleva a la activación de una o más proteínas efectoras (paso 6). El resultado final de una cascada de señalización puede producir un cambio a corto plazo en la función, en el metabolismo, o un movimiento celular (paso 7a), o un cambio a largo plazo en la expresión génica o en el desarrollo (paso 7b). La terminación o la regulación negativa de la respuesta celular son causadas por retroalimentación negativa de moléculas de señalización intracelular (paso 8) y por la eliminación de la señal extracelular (paso 9).



membrana plasmática. En general, los receptores de la superficie celular consisten en tres dominios discretos, o segmentos: un dominio extracelular que enfrenta el líquido extracelular, otro que atraviesa la membrana (transmembrana) y el segmento de dominio intracelular que enfrenta al citosol. La molécula de señalización actúa como un **ligando**, que se une a un sitio complementario estructuralmente sobre los dominios que atraviesan la membrana o extracelulares del receptor. La unión del ligando a su sitio sobre el receptor induce un cambio conformacional en el receptor que es transmitido a través del dominio que atraviesa la membrana al dominio citoplasmático, lo que da como resultado la unión y posterior activación o inhibición de otras proteínas en el citosol o adheridas a la membrana plasmática. En muchos casos, estas proteínas activadas catalizan la síntesis de ciertas moléculas pequeñas o cambios de la concentración de un ion intracelular como el Ca^{2+} . Luego, estas proteínas intracelulares o pequeñas moléculas **segundos mensajeros** llevan la señal a una o más proteínas efectoras. El proceso global de conversión de las señales extracelulares en respuestas intracelulares, como así también los pasos individuales en este proceso, se llama **transducción de la señal** (Fig. 15-1).

En los eucariontes, existe alrededor de una docena de clases de receptores de superficie celular que activa varios otros tipos de vías de transducción de la señal. Nuestro conocimiento de la transducción de la señal ha avanzado mucho en años recientes, en gran medida debido a que estos receptores y vías están muy conservados y funcionan esencialmente de la misma forma en organismos tan diversos como moscas, gusanos, ratones y seres humanos. Los estudios genéticos combinados con análisis bioquímicos han posibilitado que los investigadores tracen muchas vías completas de señalización desde la unión del ligando a la respuesta celular final.

Tal vez la clase de receptores más numerosos, que se encuentran en organismos que van desde las levaduras hasta los seres humanos, son receptores acoplados a proteína G (GPCR). Como su nombre lo indica, los receptores acoplados a proteína G consisten en una proteína receptora de membrana integral acoplada a una proteína G intracelular que transmite señales al interior de la célula. El genoma humano codifica alrededor de 900 receptores acoplados a proteína G, incluyendo receptores en los sistemas visual, olfatorio, gustativo, muchos receptores

neurotransmisores y la mayoría de los receptores para hormonas que controlan los hidratos de carbono, los aminoácidos, y el metabolismo graso e incluso el comportamiento. En general, la transducción de señal a través de los GPCR induce cambios a corto plazo en la función celular, como un cambio en el metabolismo o el movimiento. Por el contrario, la activación de otros receptores de superficie celular principalmente altera un patrón de expresión génica de la célula que lleva a la diferenciación o división celular y otras consecuencias a largo plazo. Estos últimos receptores y las vías de señalización intracelular que activan se describen en el Capítulo 16.

En este capítulo, primero revisaremos algunos principios generales de la transducción de señal, como la base molecular para la unión del receptor-ligando, y ciertos componentes evolutivamente conservados de las vías de transducción de la señal. Luego describiremos cómo los receptores de la superficie celular y las proteínas de transducción de la señal son identificadas y caracterizadas bioquímicamente. Luego nos centraremos en un análisis exhaustivo de los receptores acoplados a proteína G, en sus estructuras y mecanismos de acción y luego sobre la vía de señalización que ellos activan. Se demostrará cómo estas vías afectan muchos aspectos de la función celular, incluyendo el metabolismo de la glucosa, la contracción muscular, la percepción de la luz y la expresión génica.

15.1 Transducción de la señal: desde la señal extracelular hasta la respuesta celular

Como se muestra en la Figura 15-1, la transducción de la señal comienza con la unión de las moléculas de señalización extracelular a los receptores de la superficie celular. La unión de las moléculas de señalización a sus receptores induce dos tipos principales de respuestas celulares: (1) cambios en la actividad o función de las enzimas específicas y otras proteínas que preexisten en la célula y (2) cambios en las cantidades de proteínas específicas producidas por una célula, por lo general mediante modificaciones de los factores de transcripción que estimulan o reprimen la expresión génica (véase la Fig. 15-1, pasos 7a y 7b). En general, el primer tipo de respuesta se produce más rápidamente que la segunda. Los factores de transcripción activados por estas vías en el citosol se mueven al interior del núcleo, donde estimulan (u ocasionalmente reprimen) la transcripción de genes diana específicos.

La conexión entre un receptor activado y una respuesta celular no es directa y en general involucra diversas proteínas o moléculas pequeñas. Colectivamente, esta cadena de intermediarios se denomina *vía de transducción de la señal* debido a que transduce, o convierte, la información de una forma a otra a medida que una señal es liberada desde un receptor a sus diana. Algunas de las vías de transducción de la señal contienen solo dos o tres intermediarios; otros pueden involucrar alrededor de una docena. Independientemente, la mayoría de las vías contienen miembros de ciertas clases de proteínas de transducción de señal que han sido muy conservadas a través de la evolución.

En esta sección, brindamos un panorama general de los principales pasos en la transducción de la señal, comenzando con las moléculas de señalización en sí mismas. Exploramos las bases moleculares para la unión receptor-ligando y la cadena de acontecimientos iniciada en la célula diana por la unión de la señal a su receptor, y nos centramos en unos pocos componentes que son centrales en muchas vías de transducción de la señal.

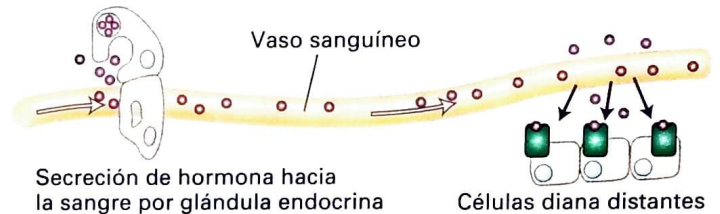
Las moléculas de señalización pueden actuar en forma local o a distancia

Las células responden a muchos tipos diferentes de señales (algunos se originan desde afuera del organismo; otros, internamente). Estos últimos pueden describirse por el modo en que alcanzan sus diana. Algunas moléculas de señalización son transportadas largas distancias por la sangre; otros tienen más efectos locales. En los animales, la señalización por moléculas extracelulares puede clasificarse en tres tipos (endocrina, paracrina o autocrina) según la distancia a la cual actúa la señal (Fig. 15-2a-c). Además, ciertas proteínas unidas a membrana sobre una célula pueden señalar directamente una célula adyacente.

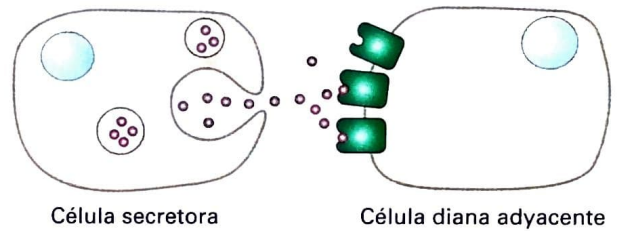
En la forma **endocrina**, las moléculas de señalización son sintetizadas y secretadas por células de señalización (p. ej., aquellas que se encuentran en las glándulas endocrinas) y transportadas a través del sistema circulatorio del organismo; por último, actúan sobre las células diana distantes de sus sitios de síntesis. En general, el término *hormona* se refiere a las moléculas de señalización que median la señalización endocrina. La insulina secretada por el páncreas y la adrenalina secretada por las glándulas suprarrenales son ejemplos de hormonas que viajan a través de la sangre y así median la señalización endocrina.

En la señalización **paracrina**, las moléculas de señalización liberadas por una célula afectan solo a aquellas células diana que se encuentran en estrecha proximidad. Una célula nerviosa que libera un neurotransmisor (p. ej., acetilcolina) que actúa sobre una célula nerviosa adyacente o una célula muscular (induciendo o inhibiendo contracción muscular) es un ejemplo de señalización paracrina. Además de los neurotransmisores, muchas proteínas **factores de crecimiento** que regulan el desarrollo en los organismos multicelulares actúan a corto alcance. Algunos de estas proteínas factores de crecimiento se unen fuertemente a componentes de la matriz extracelular y son incapaces

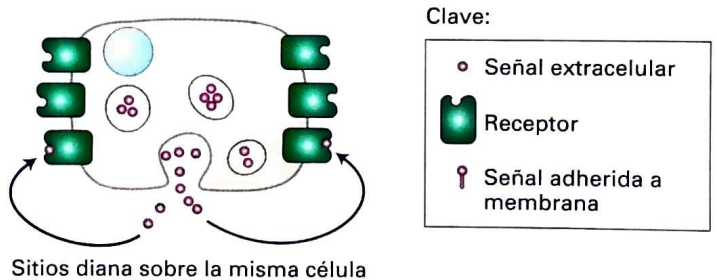
(a) Señalización endocrina



(b) Señalización paracrina



(c) Señalización autocrina



(d) Señalización por proteínas adheridas a la membrana plasmática

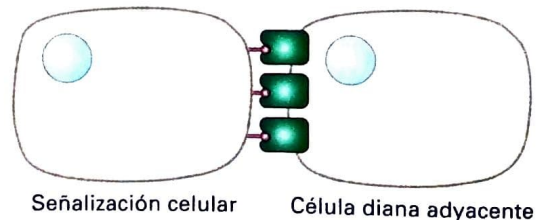


FIGURA 15-2 Tipos de señalización extracelular. (a-c) La señalización célula a célula por químicos extracelulares se produce a distancias que van desde unos pocos micrómetros en la señalización autocrina y paracrina hasta varios metros en la señalización endocrina. (d) Las proteínas adheridas a la membrana plasmática de una célula pueden interactuar directamente con los receptores de la superficie celular sobre células adyacentes.

de actuar como señal con células adyacentes; la posterior degradación de estos componentes de la matriz, desencadenada por lesión o infección, liberará el factor de crecimiento activo y podrá actuar como señal. Muchas proteínas de señalización importantes desde el punto de vista del desarrollo se difunden desde la célula de señalización, forman un gradiente de concentración e inducen diferentes respuestas dependiendo de la concentración de la proteína de señalización.

En la señalización **autocrina**, las células responden a las sustancias que ellas mismas liberan. Algunos factores de crecimiento actúan de esta forma, y las células cultivadas suelen secretar factores de crecimiento que estimulan su propio crecimiento y su proliferación. Este tipo de señalización es en particular característico de las células tumorales, muchas de las cuales producen y liberan un exceso de factores de crecimiento que estimulan su propia proliferación de forma desregulada e inadecuada, un proceso que puede llevar a la formación de un tumor.

Las proteínas de la membrana integral localizadas sobre la superficie basal cumplen una función importante en la señalización (Fig. 15-2d). En algunos casos, tales señales unidas a membrana sobre una célula ligan receptores sobre la superficie de una célula diana y desencadenan su diferenciación. En otros casos, la escisión proteolítica de una proteína de señalización unida a membrana libera el segmento extracelular, que funciona como una molécula de señalización soluble.

Algunas moléculas de señalización pueden actuar tanto a corta como a larga distancia. Por ejemplo, la adrenalina funciona como una hormona sistémica (señalización endocrina) y como un neurotransmisor (señalización paracrina). Otro ejemplo es el factor de crecimiento epidérmico (EGF), que es sintetizado como una proteína integral de membrana plasmática. El EGF unido a membrana puede unirse a re-

ceptores sobre una célula adyacente. Además, el corte por acción de una proteasa extracelular libera una forma soluble de EGF que puede señalar de manera autocrina o paracrina.

La unión de moléculas de señalización activa receptores sobre células diana

Las proteínas receptoras para las pequeñas moléculas extracelulares hidrófilas y las moléculas de señalización se localizan en la superficie de la célula diana. La molécula de señalización, o ligando, se une a un sitio sobre el dominio extracelular del receptor con alta especificidad y afinidad. En general, cada receptor se une a una única molécula de señalización o a un grupo de moléculas estructuralmente muy relacionadas. La *especificidad de unión* de un receptor se refiere a su capacidad para unir o no sustancias estrechamente relacionadas.

La unión del ligando depende de fuerzas débiles, no covalentes (p. ej., interacciones de van der Waals e hidrófobas), y la **complementariedad molecular** entre las superficies interactuantes de un receptor y el ligando (véase la Fig. 2-12). Por ejemplo, el receptor de hormona de crecimiento (Fig. 15-3) se une a la hormona de crecimiento pero no a otras hormonas con estructuras, aunque no idénticas, sí muy similares. De manera parecida, los receptores de acetilcolina unen esta molécula pequeña y no otros que difieren solo levemente en la estructura química, mientras que el receptor de insulina une insulina y hormonas relacionadas llamadas factores de crecimiento insulínico tipo 1 y 2 (IGF-1 e IGF-2), pero no otras hormonas.

La unión del ligando a su receptor causa un cambio conformacional en el receptor que inicia una secuencia de reacciones que lleva a re-

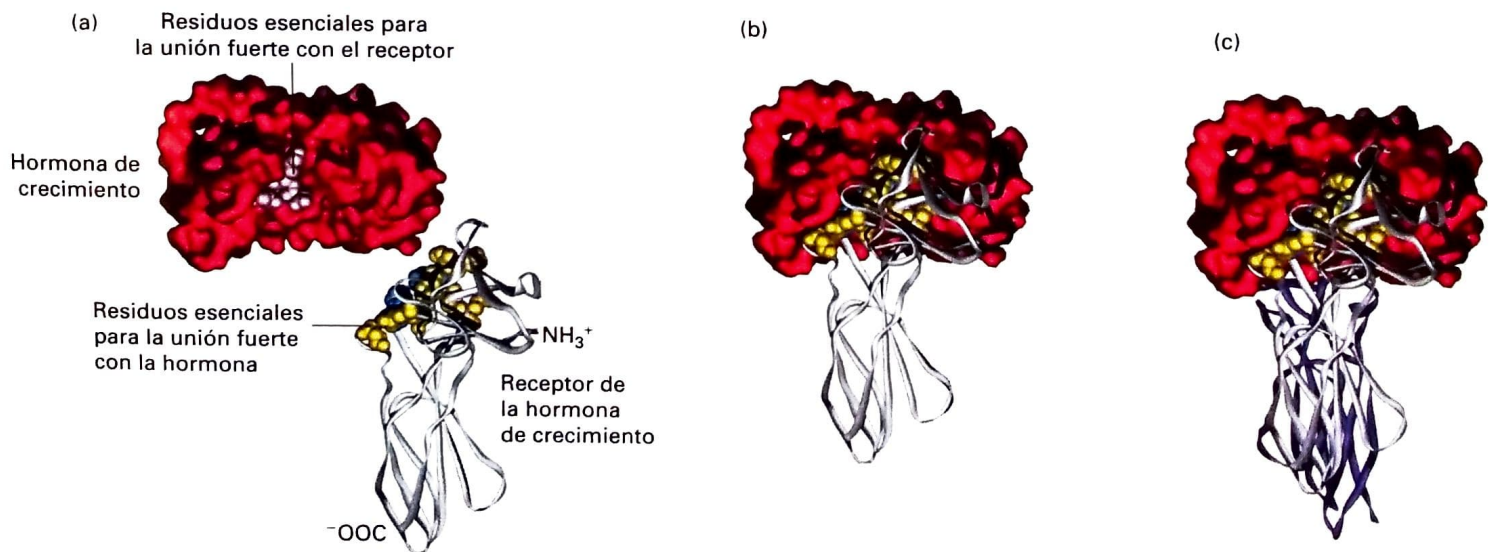


FIGURA EXPERIMENTAL 15-3 Las hormonas de crecimiento se unen a su receptor a través de complementariedad molecular. (a) Como se determina a partir de la estructura tridimensional del complejo receptor de hormona de crecimiento-hormona de crecimiento, 28 aminoácidos en la hormona están en la misma interfase de unión con un receptor. Para determinar qué aminoácidos son importantes para la unión receptor-ligando, los investigadores mutaron cada uno de estos aminoácidos de a uno por vez, para alanina, y midieron el efecto sobre la unión al receptor. A partir de este estudio, se encontró que solo ocho aminoácidos en el factor de crecimiento (rosa) contribuyen con el 85% de la energía responsable para la unión fuerte del receptor; estos aminoácidos se encuentran distantes entre sí en la secuencia primaria pero adyacentes en la proteína plegada. Estudios similares

demostraron que dos residuos de triptófano (azul) en el receptor contribuyen con la mayoría de la energía responsable para la unión fuerte de la hormona de crecimiento, aunque otros aminoácidos en la interfase con la hormona (amarilla) también son importantes. (b) La unión de la hormona de crecimiento a una molécula de receptor es seguida por (c) la unión de un segundo receptor (púrpura) al lado opuesto de la hormona; esto involucra el mismo grupo de aminoácidos amarillo y azul sobre el receptor pero diferentes residuos de la hormona. Como se describirá en el siguiente capítulo, tal dimerización de los receptores inducida por hormona es un mecanismo común para la activación de los receptores para hormonas proteicas. (De B. Cunningham y J. Wells, 1993, *J. Mol. Biol.* **234**:554, y T. Clackson y J. Wells, 1995, *Science* **267**:383)

una respuesta específica dentro de la célula. Los organismos han evolucionado para utilizar un único ligando a fin de estimular diferentes células para responder en diversas formas. Por ejemplo, distintos tipos de células pueden tener diferentes grupos de receptores para el mismo ligando, cada uno de los cuales induce una vía de respuesta a la señal intracelular diferente. De manera alternativa, el mismo receptor puede encontrarse sobre diversos tipos de célula en un organismo, pero la unión de un ligando particular sobre el receptor desencadena una respuesta diferente en cada tipo de célula, dado el complemento único de proteínas expresadas por la célula. En estas vías, el mismo ligando puede inducir a diferentes células para responder en una variedad de formas. Esto es lo que se conoce como *especificidad efectora* del complejo ligando-receptor.

Por ejemplo, las superficies de las células de músculo esquelético, las células de músculo cardíaco y las acinares pancreáticas que producen enzimas digestivas hidrolíticas tienen, cada una, diferentes tipos de receptores para acetilcolina. En una célula de músculo esquelético, la liberación de acetilcolina de una neurona motora que inerva la célula desencadena la contracción muscular mediante la activación de un canal iónico impulsado por acetilcolina. En el músculo cardíaco, la liberación de acetilcolina por ciertas neuronas activa un receptor acoplado a proteína G y disminuye la velocidad de contracción y, por ende, el ritmo cardíaco. La estimulación de la acetilcolina de las células acinares pancreáticas desencadena una elevación en el $[Ca^{2+}]$ citosólico que induce la exocitosis de las enzimas digestivas almacenadas en los gránulos secretores para facilitar la digestión de un alimento. Por lo tanto, la formación de diferentes complejos acetilcolina-receptor en distintos tipos de células lleva a diversas respuestas celulares.

La proteincinasa y las fosfatasa se utilizan en prácticamente todas las vías de señalización

La activación de casi todos los receptores de la superficie celular conlleva directa o indirectamente cambios en la fosforilación de proteínas a través de la activación de proteínas cinasas, que añaden grupos fosfato a residuos específicos de proteínas diana. Algunos receptores activan proteínas fosfatasas, que eliminan los grupos fosfatos de residuos específicos sobre proteínas diana. Los fosfatos actúan en concierto con cinasas para alternar la función de diversas proteínas al activarlas o desactivarlas (Fig. 15-4).

En el último recuento, el genoma humano codifica alrededor de 600 proteincinasas y 100 fosfatasas diferentes. En general, cada proteincinasa fosforila residuos de aminoácidos específicos en un grupo de dianas, o sustratos, proteínas cuyos patrones de expresión en general varían en diferentes tipos de células. Las células animales contienen dos tipos de proteincinasas: aquellas que añaden fosfato a los grupos hidroxilos sobre un residuo de tirosina y aquellas que añaden fosfato al grupo hidroxilo sobre un residuo de serina o treonina (o ambos). Todas las cinasas también se unen a secuencias específicas alrededor del residuo fosforilado, y así es posible observar las secuencias de aminoácidos alrededor de los residuos de tirosina, serina y treonina en una proteína y hacer una buena predicción de qué cinasas podría fosforilar este residuo.

En algunas vías de señalización, el receptor en sí mismo posee actividad cinasa intrínseca o bien está unido fuertemente a la cinasa citosólica. La Figura 15-5 ilustra una vía de transducción de señal simple que involucra una cinasa fuertemente unida a un receptor y una proteína diana predominante. En ausencia de un ligando uni-

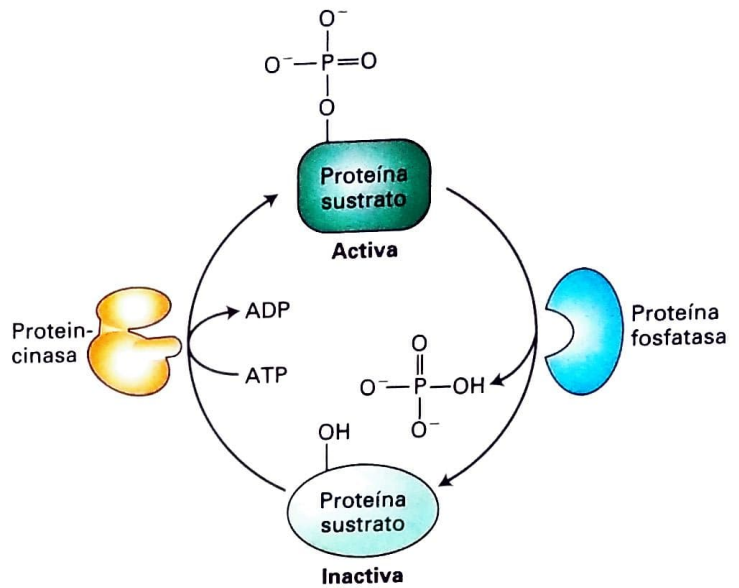


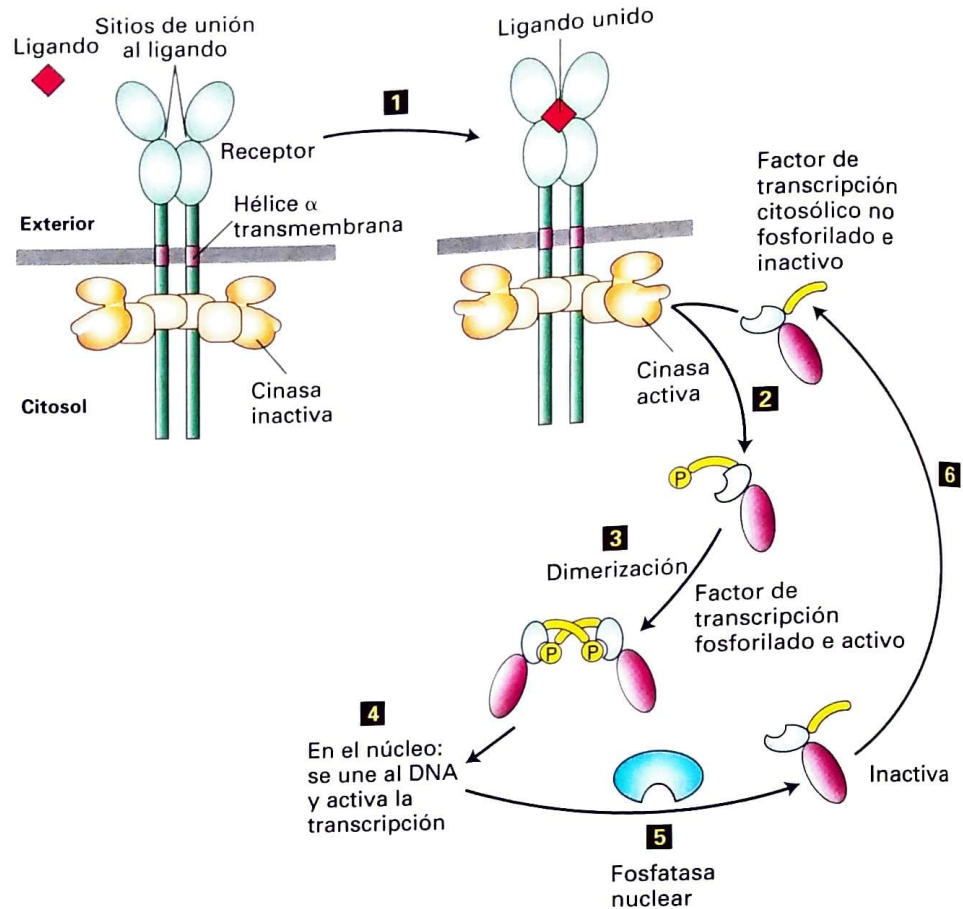
FIGURA 15-4 Regulación de la actividad proteica por un interruptor cinasa/fosfatasa. La fosforilación y desfosforilación cíclica de una proteína es un mecanismo celular común para la regulación de la actividad proteica. En este ejemplo, la proteína diana, o sustrato, se encuentra inactiva (verde claro) cuando no está fosforilada y se encuentra activa (verde oscuro) cuando está fosforilada; algunas proteínas tienen el patrón opuesto. Tanto la proteincinasa como la fosfatasa actúan solo sobre proteínas diana específicas, y sus actividades suelen estar altamente reguladas.

do, la cinasa es mantenida en estado inactivo. La unión del ligando desencadena un cambio conformacional en el receptor que lleva a la activación de la cinasa adjunta. Luego, la cinasa fosforila la forma monomérica, inactiva, de un factor de transcripción específico; esto lleva a la dimerización y movimiento del citosol al núcleo, donde se activan los genes diana. Una fosfatasa en el núcleo posteriormente elimina el grupo fosfato del factor de transcripción, y causa que forme dos monómeros inactivos y luego los regrese al citosol, donde puede ser reactivado por una cinasa asociada a receptor.

Como este ejemplo lo ilustra, la actividad de todas las proteincinasas es opuesta a la actividad de las fosfatasas, algunas de las cuales son en sí mismas reguladas por las señales extracelulares. Así, la actividad de una proteína en una célula puede ser una función compleja de las actividades de las múltiples cinasas y fosfatasas que actúan sobre esta, ya sea directa o indirectamente a través de la fosforilación de otra proteína. En la regulación del ciclo celular se producen diversos ejemplos de este fenómeno, que se describen en el Capítulo 19.

Muchas proteínas son sustratos de múltiples cinasas, cada una de las cuales fosforila diferentes aminoácidos. Cada acontecimiento de fosforilación puede modificar la actividad de una proteína diana en particular en diferentes formas, algunas activando su función, otras, inhibiéndola. Un ejemplo que encontraremos luego es la glucógeno fosforilasa cinasa, una enzima reguladora clave en el metabolismo de la glucosa. En muchos casos, la adición de un grupo fosfato a un aminoácido crea una superficie de unión que le permite a una segunda proteína unirse; en el siguiente capítulo, encontraremos muchos ejemplos de tales cinasas que conducen el ensamblado de múltiples complejos multiproteínas.

FIGURA 15-5 Una única vía de transducción de señal involucra una cinasa y una proteína diana. El receptor está fuertemente unido a una proteincinasa que, en ausencia de un ligando unido, se mantiene en el estado inactivo. La unión del ligando desencadena un cambio de conformación en el receptor, lo que lleva a la activación de la cinasa adjunta (1). La cinasa luego fosforila la forma monomérica, inactiva, de un factor de transcripción específico (2), lo lleva a su dimerización (3) y lo mueve desde el citosol hasta el núcleo (4), donde activa la transcripción de genes diana. Una fosfatasa en el núcleo eliminará el grupo fosfato del factor de transcripción (5) y causará que se forme el monómero inactivo y luego regrese al citosol (6).



Por lo general, la actividad catalítica de una proteincinasa en sí misma está modulada por la fosforilación de otras cinasas mediante la unión de otras proteínas a ella y por el cambio en la concentración de varias moléculas de señalización intracelular pequeñas y metabolitos. La cascada resultante de actividad cinasa es una característica común de muchas vías de señalización.

Las proteínas de unión a GTP se utilizan con frecuencia en la transducción de señales como interruptores

Muchas de las vías de transducción de señales utilizan proteínas “interruptoras” intracelulares que activan o desactivan proteínas que se encuentran corriente abajo. El grupo más importante de proteínas intracelulares interruptoras es la **superfamilia de las GTPasa**. Todas las proteínas interruptoras GTPasa existen en dos formas (Fig. 15-6): (1) una forma activa (“encendida”) con GTP unido (guanosina-trifosfato) que modula la actividad de las proteínas diana específicas, y (2) una forma inactiva (“apagada”) con GDP unido (guanosina-difosfato).

La conversión del estado inactivo al activo es desencadenada por una señal (p. ej., la unión de una hormona a un receptor) y mediada por el *factor de intercambio de nucleótido de guanina (GEF)*, que causa la liberación de GDP de la proteína interruptora. La posterior unión de GTP, favorecida por su alta concentración intracelular relativa a su afinidad de unión, induce un cambio conformacional para la forma activa. El principal cambio conformacional involucra dos segmentos altamente conservados de la proteína, llamados interruptor I e interruptor II, que permiten a la proteína unirse y activar otras proteínas de señalización

corriente abajo (Fig. 15-7). La conversión de la forma activa de regreso al estado inactivo es mediada por una GTPasa que hidroliza lentamente el GTP a GDP y P_i y altera así la conformación de los segmentos interruptores I y II de manera tal que ellos son incapaces de unirse a la proteína efectora. La GTPasa puede ser una parte intrínseca de la proteína G o una proteína separada.

La velocidad de hidrólisis de GTP regula el tiempo que la proteína interruptora permanece en la conformación activa y permite dirigir

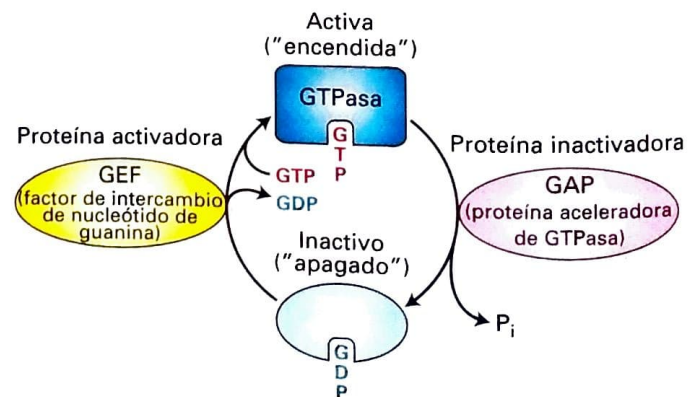


FIGURA 15-6 Las proteínas interruptoras GTPasa alternan entre las formas activa e inactiva. La proteína interruptora está activa cuando tiene unido GTP e inactiva cuando tiene unido GDP. La conversión de la forma activa a la inactiva mediante hidrólisis del GTP unido es acelerada por las GAP (proteínas aceleradoras de GTPasa) y otras proteínas. La reactivación es estimulada por los GEF (factores intercambiadores de nucleótido de guanina), que catalizan la disociación del GDP unido y su reemplazo por GTP.

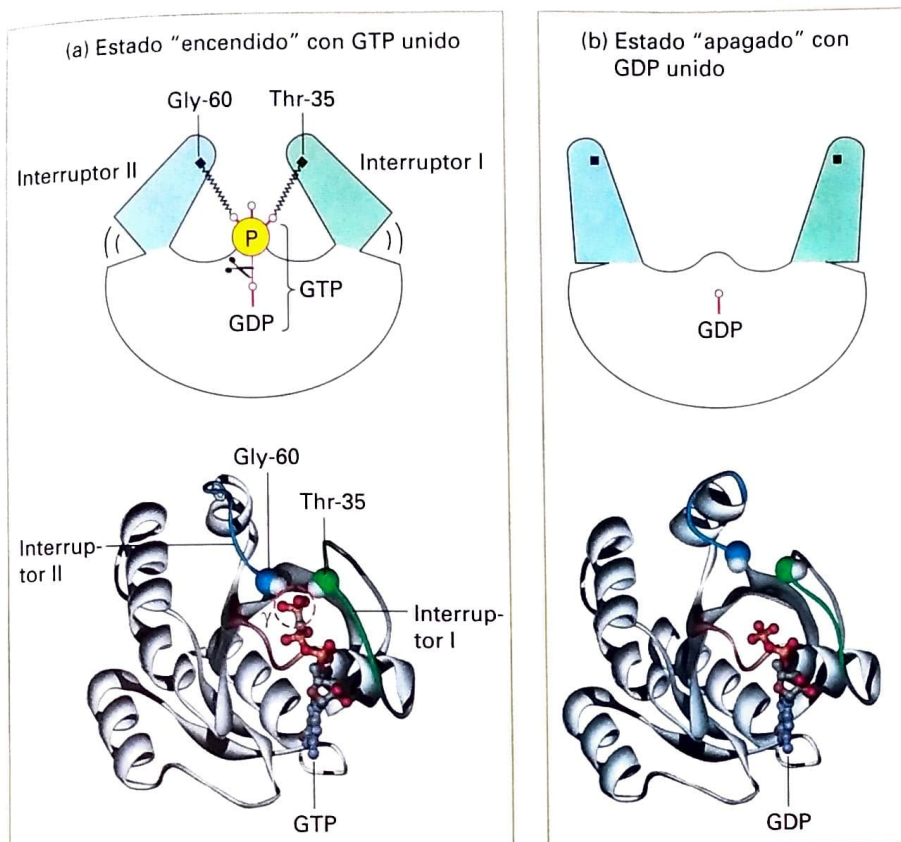


FIGURA 15-7 Mecanismos de alternancia de las proteínas G. La capacidad de una proteína G para interactuar con otras proteínas y así transducir una señal difieren en el estado "encendido" unido a GTP y el estado "apagado" unido a GDP. (a) En el estado "encendido", dos dominios, llamados interruptor I (verde) e interruptor II (azul), están unidos al fosfato gamma terminal del GTP a través de interacciones con los grupos amida del esqueleto de un residuo de treonina y glicina conservada. Cuando tienen unido GTP, los dos dominios interruptores están en una conformación tal que pueden unirse y, por lo tanto, activar proteínas efectoras corriente abajo específicas. (b) La liberación del fosfato gamma mediante la hidrólisis catalizada por GTPasa causa que los interruptores I y II se relajen a una conformación diferente, el estado "apagado" inactivo; en este estado, son incapaces de unirse a las proteínas efectoras. Los modelos con cintas que se muestran aquí representan las conformaciones de Ras, una proteína G monomérica. Un mecanismo de resorte similar cambia la subunidad alfa en las proteínas G triméricas entre las conformaciones activa e inactivas mediante el movimiento de tres segmentos interruptores. (Adaptado de I. Vetter y A. Wittinghofer, 2001, *Science* **294**:1299)

la señal corriente abajo. La velocidad de hidrólisis de GTP suele estar modulada por otras proteínas. Por ejemplo, tanto las *proteínas activadoras de la GTPasa* (GAP) como las *proteínas de señalización de reguladores de proteína G* (RGS) aceleran la hidrólisis de GTP. Muchos reguladores de la actividad de la proteína G son en sí mismos controlados por señales extracelulares.

Dos clases de proteínas interruptoras GTPasa se utilizan en la señalización. Las **proteínas G triméricas (grandes)** directamente se unen y son activadas por ciertos receptores de superficie celular. Como se verá en la Sección 15.3, los receptores acoplados a proteína G funcionan como factores de intercambio de nucleótido de guanina (GEF) (desencadenan la activación de GDP y la unión de GTP, y activan así a la proteína G). Las **proteínas G monoméricas (pequeñas)**, como Ras y varias otras similares a esta, no se unen a los receptores sino que cumplen funciones cruciales en muchas vías que regulan la división y la movilidad celulares, como lo evidencia el hecho de que mutaciones en los genes que codifican estas proteínas G frecuentemente llevan al cáncer. Otros miembros de ambas clases de GTPasa, al alternar entre las formas GTP unida "encendida" y GDP unida "apagada", funcionan en la síntesis de proteína, el transporte de proteínas entre el núcleo y el citoplasma, la formación de vesículas recubiertas y sus fusiones con las membranas diana y reordenamientos del citoesqueleto de actina.

Los "segundos mensajeros" intracelulares transmiten y amplifican señales a partir de muchos receptores

La unión de los ligandos ("primeros receptores") a muchos receptores de la superficie celular lleva a un incremento (o disminución) de corta duración en la concentración de ciertas moléculas de señalización in-

tracelular de bajo peso molecular llamados **segundos mensajeros**. A su vez, estos se unen a otras proteínas y modifican dicha actividad.

Un segundo mensajero usado en casi todas las células de metazoos son los iones Ca^{2+} . En el Capítulo 11 mencionamos que la concentración del Ca^{2+} libre en el citosol se mantiene bastante baja ($< 10^{-7}$ M) a través de la bomba impulsada por ATP que continuamente transporta Ca^{2+} fuera de la célula o hacia el retículo endoplasmático (RE). La concentración de Ca^{2+} citosólico puede elevarse desde 10 hasta 100 veces a través de una señal que induce la liberación de Ca^{2+} desde los almacenes del RE o por su importación a través de los canales de calcio a partir del ambiente extracelular; este cambio puede ser detectado mediante colorantes fluorescentes introducidos en la célula (véase la Fig. 9-11). En el músculo, una elevación en el Ca^{2+} citosólico inducida por una señal desencadena la contracción (véase la Fig. 17-35). En las células endocrinas, un aumento similar en el Ca^{2+} induce la exocitosis de las vesículas secretoras que contienen hormonas, que así son liberadas a la circulación sanguínea. En las células nerviosas, un aumento en el Ca^{2+} citosólico lleva a la exocitosis de las vesículas que contienen neurotransmisores (véase el Cap. 22). En todas las células, esta elevación en el Ca^{2+} citosólico es detectada por proteínas de unión a Ca^{2+} , en particular aquellas que pertenecen a la familia de la mano EF, como la *calmodulina*, que contienen el motivo hélice-bucle-hélice (véase la Fig. 3-9b). La unión de Ca^{2+} a la calmodulina y otras proteínas de la mano EF causa cambios conformacionales que permiten a las proteínas unirse a varias proteínas diana, lo que cambia así sus actividades de encendido o apagado (véase la Fig. 3-31).

Otro segundo mensajero casi universal es el **AMP cíclico (cAMP)**. En muchas células eucariontes, una elevación en el cAMP desencadena la activación de una proteína cinasa particular, una proteína cinasa A, que a su vez fosforila proteínas diana específicas para inducir cambios espe-

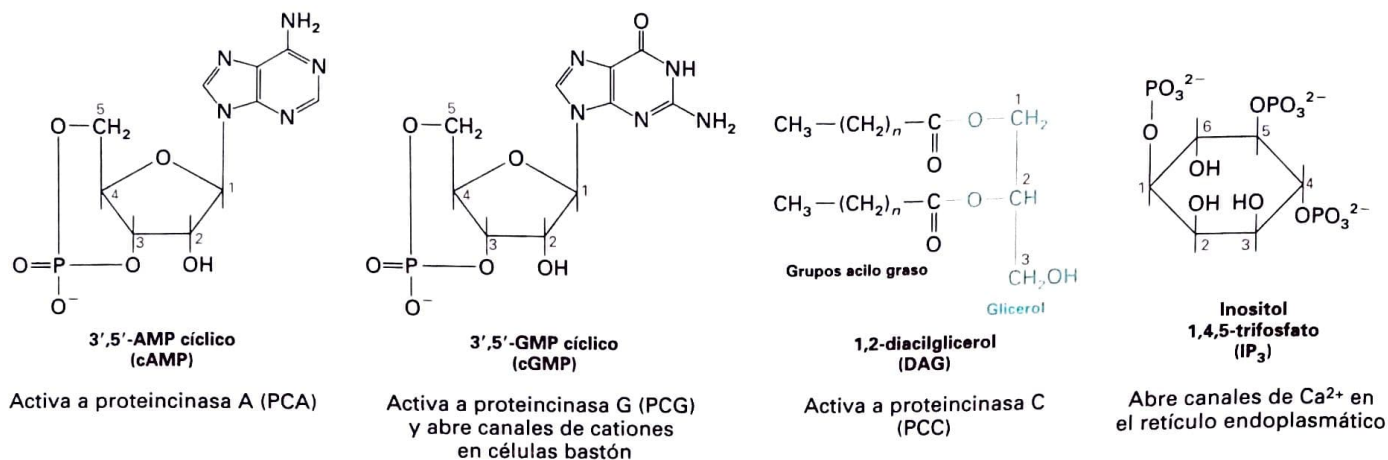


FIGURA 15-8 Cuatro segundos mensajeros comunes. El o los efectos principales directos de cada compuesto se indican debajo de su fórmula

estructural. Los iones calcio (Ca²⁺) y varios derivados fosfatidilinositol unidos a membrana también actúan como segundos mensajeros.

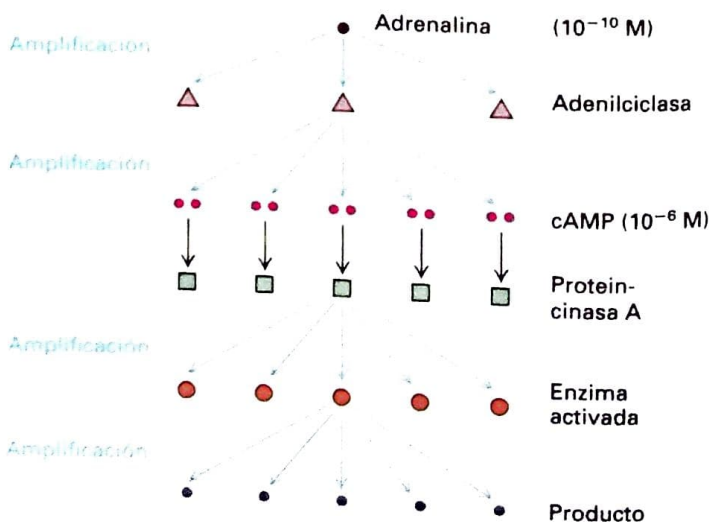
cíficos en el metabolismo celular. En algunas células, el cAMP regula la actividad de ciertos canales de iones. Las estructuras del cAMP y otros tres segundos mensajeros comunes se muestran en la **Figura 15-8**. Más adelante en este capítulo, analizaremos las funciones específicas de los segundos mensajeros en las vías de señalización activadas por diversos receptores acoplados a proteínas G.

Debido a que los segundos mensajeros como el Ca²⁺ y el cAMP se difunden a través del citosol mucho más rápido que las proteínas, pueden utilizarse en las vías en las que la diana corriente abajo se localiza en un orgánulo intracelular (tal como una vesícula secretora o el núcleo) distante del receptor de la membrana plasmática donde se genera el mensajero.

Otra ventaja de los segundos mensajeros es que facilitan la **amplificación** de una señal extracelular. La activación de una *única* molécula receptora de la superficie celular puede resultar en un aumento de tal vez miles de moléculas de cAMP o iones de Ca²⁺ en el citosol. A su vez, cada una de estas afecta la actividad de múltiples proteínas corriente abajo mediante la activación de la proteína diana. En muchas vías de transducción de la señal, la amplificación es necesaria debido a que los receptores de la superficie celular son típicamente proteínas de baja abundancia, presentes en solo unas miles de copias por célula. Incluso las respuestas celulares inducidas por la unión de una pequeña canti-

dad de hormonas a los receptores disponibles suelen requerir la producción de decenas o cientos de miles de moléculas efectoras activadas por célula. En el caso de los receptores acoplados a proteína G, la **amplificación de la señal** es posible en parte debido a que un único receptor puede activar múltiples proteínas G, cada una de las cuales activa una proteína efectora. Por ejemplo, un complejo GPCR-adrenalina causa la activación de hasta 100 moléculas de adenilciclase, y cada una de estas a su vez cataliza la síntesis de muchas moléculas de cAMP durante el tiempo que permanece en el estado activo. Dos moléculas de cAMP activan una molécula de proteincinasa A, que a su vez fosforila y activa múltiples moléculas diana (**Fig. 15-9**). Más adelante en este capítulo, se verá cómo esta cascada de amplificación permite que concentraciones sanguíneas de adrenalina tan bajas como 10⁻¹⁰ M estimulen la glucogenólisis (la conversión de glucógeno en glucosa) en el hígado y la liberación de glucosa en la sangre.

FIGURA 15-9 Amplificación de una señal extracelular. En este ejemplo, la unión de una molécula de adrenalina a una molécula de receptor acoplada a proteína G induce la activación de varias moléculas de adenilciclase, la enzima que cataliza la síntesis de AMP cíclico, y cada una de estas enzimas sintetiza una gran cantidad de moléculas cAMP, el primer nivel de amplificación. Dos moléculas de cAMP activan una molécula de proteincinasa A (PCA), pero cada PCA fosforila y activa múltiples proteínas diana. Este segundo nivel de amplificación puede involucrar diversas reacciones secuenciales en las cuales el producto final de una reacción activa la enzima que cataliza la siguiente reacción. Cuanto más pasos en una de tales cascada, mayor será la amplificación de la señal posible.



CONCEPTOS CLAVE de la Sección 15.1

Transducción de la señal: desde la señal extracelular hasta la respuesta celular

- Todas las células se comunican a través de señales extracelulares. En los organismos unicelulares, las moléculas de señalización extracelular regulan interacciones entre los individuos, mientras que en los organismos multicelulares regulan la fisiología y el desarrollo.
- Las señales externas incluyen las proteínas o péptidos secretados y las ancladas a membrana (p. ej., la vasopresina y la insulina), pequeñas moléculas hidrófobas (tales como hormonas esteroideas e insulina), pequeñas moléculas hidrófilas (p. ej., adrenalina), gases (p. ej., O₂, óxido nítrico) y estímulos físicos (p. ej., luz).
- La unión de moléculas de señalización extracelular a los receptores de superficie celular desencadena un cambio conformacional en el receptor que, a su vez, lleva a la activación de las vías de transducción de la señal intracelular que, en última instancia, modulan el metabolismo, la función o la expresión génica celular (Fig. 15-1).
- Las señales de una célula actúan sobre células distantes en la señalización endocrina, o células cercanas en la señalización paracrina, o sobre la señalización de la célula en sí misma en la regulación autocrina (véase la Fig. 15-2).
- La fosforilación y la desfosforilación proteicas, catalizadas por las cinasas y las fosfatasas, son utilizadas en prácticamente todas las vías de señalización. Las actividades de las cinasas y las fosfatasas están muy reguladas por varios receptores y proteínas de transducción de la señal (véanse las Figs. 15-4 y 15-5).
- Las proteínas de unión a GTP de la superfamilia de las GTPasas actúan como interruptores al regular muchas vías de transducción de la señal (véanse las Figs. 15-6 y 15-7).
- El Ca²⁺, el cAMP y otras moléculas intracelulares no proteicas de bajo peso molecular (véase la Fig. 15-8) actúan como “segundos mensajeros” al liberar y a menudo amplificar la señal del “primer mensajero,” es decir, el ligando. La unión del ligando a los receptores de superficie celular suelen dar como resultado un incremento rápido (u ocasionalmente una disminución) en la concentración intracelular de estos iones o moléculas.

15.2 Estudio de los receptores de la superficie celular y proteínas que transducen las señales

La respuesta de una célula a una señal externa depende del complemento celular de receptores que reconozcan la señal y las vías de transducción de la señal activadas por aquellos receptores. En esta sección, analizaremos las bases bioquímicas para la especificidad de la unión ligando-receptor, como así también la capacidad de las diferentes concentraciones de ligando de activar una vía. También analizaremos las técnicas experimentales utilizadas para caracterizar a las proteínas receptoras. Muchos de estos métodos también se aplican a los receptores que median la endocitosis (véase el Cap. 14) o la adhesión celular

(véase el Cap. 20). Finalizaremos con una descripción de las técnicas que suelen utilizarse para medir la actividad de los componentes de la transducción de señal, como las cinasas y la unión de proteínas “interruptoras” de unión a GTP.

La constante de disociación es una medida de la afinidad de un receptor con su ligando

La unión de ligandos a un receptor puede ser vista como una simple reacción reversible, donde el receptor es representado como R, el ligando como L, y el complejo receptor-ligando como RL:



k_{apagada} es la constante de velocidad para la disociación del ligando de su receptor, y $k_{\text{encendida}}$ es la constante de velocidad para la formación del complejo receptor-ligando a partir del ligando libre y el receptor.

En el equilibrio, la velocidad de formación del complejo receptor-ligando es igual a la de su disociación y puede describirse mediante una ecuación simple de unión en el equilibrio

$$K_d = \frac{[R][L]}{[RL]} \quad (15-2)$$

donde [R] y [L] son las concentraciones libres del receptor (es decir, receptor sin ligando unido) y ligando, respectivamente, en el equilibrio, y [RL] es la concentración del complejo receptor-ligando. K_d , la **constante de disociación**, es una medida de la *afinidad* (o la hermeticidad de unión) del receptor por su ligando (véase también el Cap. 2). Para una simple reacción de unión, $K_d = k_{\text{apagada}}/k_{\text{encendida}}$. Cuanto *menor* es el valor de k_{apagada} en relación con $k_{\text{encendida}}$, *más estable* es el complejo RL, mayor será la fuerza de unión y, por ende, *menor* el valor de K_d . Otra forma de visualizar este punto clave es que K_d es igual a la concentración del ligando en la cual la mitad de los receptores tienen un ligando unido cuando el sistema está en equilibrio; a esta concentración de ligando, $[R] = [RL]$ y por lo tanto, de la ecuación 15-2, $K_d = [L]$. Cuanto menor es K_d , menor es la concentración de ligando necesario para unir el 50% de los receptores de la superficie celular. La K_d para una reacción de unión aquí es esencialmente equivalente a la constante de Michaelis K_m , que refleja la afinidad de una enzima por su sustrato (véase el Cap. 3). Sin embargo, al igual que las constantes de equilibrio, los valores de K_d no dependen de los *valores absolutos* de k_{apagada} y $k_{\text{encendida}}$, solo de su relación. En la siguiente sección, aprenderemos cómo determinar experimentalmente los valores de K_d .



Los receptores hormonales se caracterizan por sus afinidades y especificidades elevadas para sus ligandos. Debido a sus altas afinidades y gran especificidad para sus hormonas diana, los dominios de unión al ligando, extracelulares, de los receptores de la superficie celular pueden ser convertidos en fármacos potentes. Considérese la hormona el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), secretado por numerosas células del sistema inmunitario. El TNF α induce la inflamación por reclutamiento de diversas células inmunitarias a un sitio de lesión o infección; concentraciones anómalas de TNF α cau-

san excesiva inflamación, como es posible observar en pacientes con enfermedades autoinmunitarias como las ampollas de la piel en la enfermedad de psoriasis o la enfermedad articular en la artritis reumatoidea. Estas enfermedades están comenzando a tratarse con proteínas “fusión” quiméricas, generadas por DNA recombinante, que contienen el dominio extracelular de un receptor $\text{TNF}\alpha$ fusionado a la región constante (Fc) de una inmunoglobulina humana (véanse las Figs. 3-19 y 23-8). El fármaco se une fuertemente al $\text{TNF}\alpha$ libre y evita que estos se unan a los receptores de la superficie celular y causen inflamación; el dominio Fc fusionado causa que la proteína sea estable cuando se la inyecta en el cuerpo. ■

Los ensayos de unión se utilizan para detectar receptores y determinar sus afinidades y especificidad para ligandos

En general, los receptores son detectados y medidos por sus capacidades para unir ligandos radioactivos o fluorescentes a células intactas o a fragmentos celulares. La Figura 15-10 ilustra un *ensayo de unión* para la interacción de la hormona formadora de glóbulos rojos eritropoyetina (Epo) con los receptores Epo que son expresados por el DNA recombinante en una línea de células cultivadas. Las cantidades de Epo radiactivo unidas a su receptor en células en proliferación (eje vertical) se midió como una función de la concentración creciente de Epo marcada con ^{125}I añadida al líquido extracelular (eje horizontal). Tanto el número de sitios de unión al ligando por célula como el valor de la K_d se determinan fácilmente a partir de la curva de unión específica (curva C). Asumiendo que cada receptor une solo una molécula de ligando, el número total de sitios de unión al ligando sobre una célula es igual al número de receptores activos por célula. En el ejemplo que se muestra en la Figura 15-10, el valor de K_d es alrededor de $1,1 \times 10^{-10} \text{ M}$, o 0,1 nM. En otras palabras, una concentración Epo de $1,1 \times 10^{-10} \text{ M}$ en el líquido extracelular es necesario para que el 50% de los receptores Epo de una célula tenga unido Epo.

Los ensayos de unión directa como el de la Figura 15-10 son factibles con los receptores que tienen una alta afinidad para sus ligandos, como el receptor de eritropoyetina y el receptor de insulina sobre las células hepáticas ($K_d = 1,4 \times 10^{-10} \text{ M}$). Sin embargo, muchos ligandos, como la adrenalina y otras catecolaminas, se unen a sus receptores con mucha menos afinidad. Si la K_d para la unión es mayor que $\sim 1,1 \times 10^{-7} \text{ M}$, un caso en el cual la constante de velocidad k_{apagada} es relativamente grande en comparación con la $k_{\text{en-}}^{\text{cendida}}$, entonces es probable que durante los segundos a minutos necesarios para medir la cantidad de ligando unido algunos ligandos unidos a receptores se disocien y, por lo tanto, los valores de unión observados sistemáticamente serán más bajos.

Una forma de medir la unión relativamente débil de un ligando por su receptor es un *ensayo de competición* con otro ligando que se una al mismo receptor con mayor afinidad (valor de K_d más bajo). En este tipo de ensayo, se añaden cantidades crecientes de un ligando de baja afinidad no marcado (el competidor) a una muestra de células con una cantidad constante de ligando de alta afinidad, radiomarcado (Fig. 15-11). La unión del competidor no marcado al receptor bloquea la unión de ligando radiactivo al receptor. La dependencia de la concentración de esta competición se puede utilizar junto con el valor de K_d del ligando radiactivo para calcular la constante inhibitoria, K_i , que está muy cercana al valor de la K_d para la unión del

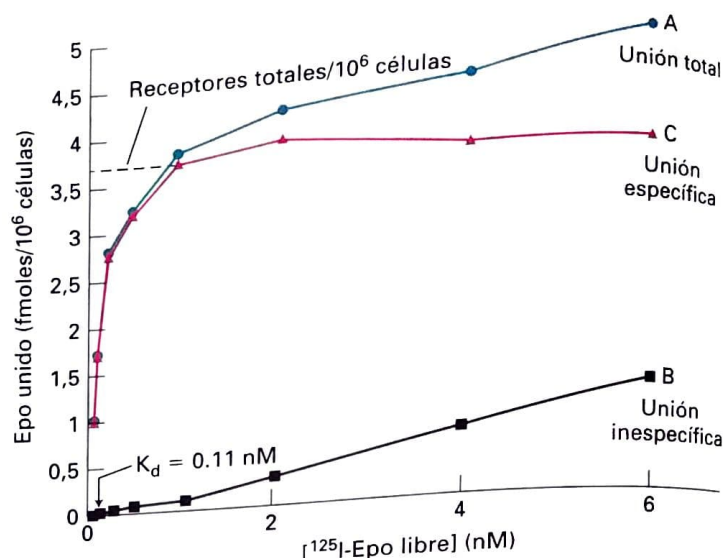


FIGURA EXPERIMENTAL 15-10 Los ensayos de unión pueden determinar la K_d y el número de receptores por célula. Aquí se muestran los datos para los receptores específicos de eritropoyetina sobre la superficie de una línea celular que expresa un receptor de eritropoyetina humana recombinante (Epo) en comparación con las células control que normalmente no expresan el receptor. Se incubó una suspensión de células durante 1 hora a 4 °C con concentraciones crecientes de Epo marcada con ^{125}I ; la baja temperatura se usa para evitar la endocitosis de los receptores de superficie celular. Las células se separan de la ^{125}I Epo no unida, en general mediante centrifugación, y se mide la cantidad de radioactividad unida. El total de unión de la curva A representa Epo específicamente unida a receptores de alta afinidad, como así también Epo unida inespecíficamente y con baja afinidad a otras moléculas sobre la superficie celular. La contribución de la unión inespecífica a la unión total se determina mediante repetición de los ensayos de unión con la línea celular control, donde Epo se une solo a sitios inespecíficos y produce la curva B. La unión específica de la curva C se calcula como la diferencia entre las curvas A y B. Como se determina por el máximo de la unión específica de la curva C, el número de sitios de unión Epo-específicos (receptores de superficie) por célula es alrededor de 2 200 ($3,7 \times 10^{-15} \text{ moles} \times 6,02 \times 10^{23} / \text{moles} / 10^6 \text{ células} = 2\,227 \text{ moléculas/célula}$). La K_d es la concentración de Epo necesaria para unir el 50% de los receptores Epo de superficie (en este caso alrededor de 1 050 receptores/célula). Así, la K_d es aproximadamente $1,1 \times 10^{-10}$, o 1 nM. [Cortesía de Alec Gross, de A. Gross y H. Lodish, 2006, *J. Biol. Chem.* **281**: 2024.]

competido al receptor. Es posible medir con precisión la cantidad del ligando de alta afinidad unido en este ensayo debido a que se disocia poco durante las manipulaciones experimentales necesarias para la medición (k_{apagada} relativamente baja).



La unión competitiva suele utilizarse para estudiar análogos sintéticos a las hormonas naturales que activan o inhiben receptores. Estos análogos, que se utilizan ampliamente en investigación sobre receptores de superficie celular y como fármacos, se encuentran dentro de dos clases: los **agonistas**, que imitan la función de una hormona natural mediante unión a su receptor e inducen la respuesta normal, y los **antagonistas**, que se unen al receptor pero no inducen respuesta. Al ocupar los sitios de unión al ligando de un receptor, un antagonista puede bloquear la unión de la hormona natural (o agonista) y así reducir la actividad fisiológica normal de la hormona. En otras palabras, los antagonistas inhiben la señalización del receptor. ■

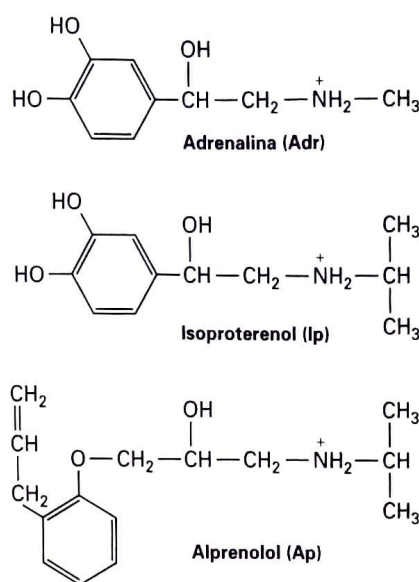
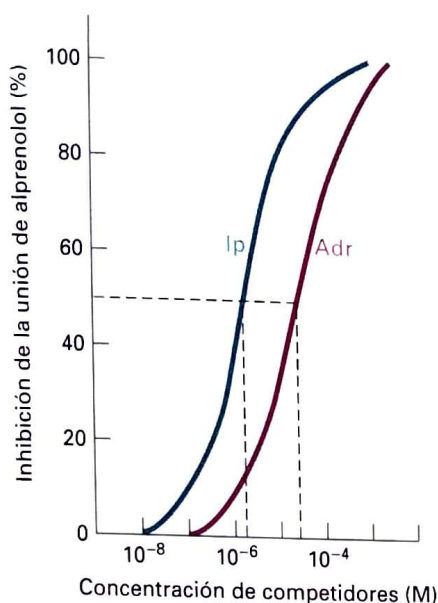


FIGURA EXPERIMENTAL 15-11 Para cuatro ligandos de baja afinidad, la unión puede detectarse en ensayos de competición. En este ejemplo, el ligando sintético alprenolol, que se une con alta afinidad al receptor de adrenalina sobre las células hepáticas ($K_d \sim 3 \times 10^{-12}$ M), se utiliza para detectar la unión de dos ligandos de baja afinidad, la hormona natural adrenalina (Adr) y un ligando sintético llamado isoproterenol (Ip). Los ensayos se realizan como se describe en la Figura 15-10 pero en reacciones que contienen una cantidad constante de $[^3\text{H}]$ alprenolol y cantidades crecientes de adrenalina no marcada o isoproterenol. A la concentración de cada competidor, se determina la

cantidad de alprenolol marcado unido. En un gráfico de la inhibición de la unión de $[^3\text{H}]$ alprenolol versus concentración de adrenalina o isoproterenol, como el que se muestra aquí, la concentración del competidor que inhibe la unión de alprenolol es aproximado al 50% del valor de la K_d para la unión de competidor. Nótese que la concentración de competidores se representa en una escala logarítmica. La K_d para la unión de la adrenalina a su receptor sobre las células hepáticas es de solo $\sim 5 \times 10^{-6}$ M y no podría ser medida por un ensayo de unión directo con $[^3\text{H}]$ adrenalina. La K_d para la unión de isoproterenol, que induce la respuesta celular normal, es más de 10 veces menor.

Considérese, por ejemplo, el fármaco isoproterenol, utilizado para tratar el asma. El isoproterenol es sintetizado por la adición química de dos grupos metilos a la adrenalina (véase la Fig. 15-11, *derecha*). El isoproterenol, un agonista de los receptores acoplados a proteína G que responden a la adrenalina sobre las células de músculo liso bronquiales, se une alrededor de 10 veces más fuertemente (K_d 10 veces menor) de lo que lo hace la adrenalina (véase la Fig. 15-11, *izquierda*). Debido a que la activación de estos receptores estimula la relajación del músculo liso bronquial y por lo tanto la apertura de los pasos de aire en los pulmones, el isoproterenol se utiliza en el tratamiento del asma bronquial, la bronquitis crónica y el enfisema. Por el contrario, la activación de un tipo diferente de receptores acoplados a proteína G que responden a la adrenalina sobre las células del músculo cardíaco (llamados receptores β -adrenérgicos) aumentan la velocidad de contracción del corazón. Los antagonistas de este receptor, como el alprenolol y compuestos relacionados, son referidos como *betabloqueantes*; tales antagonistas se utilizan para disminuir las contracciones cardíacas en el tratamiento de las arritmias cardíacas y la angina.

La respuesta celular máxima a una molécula de señalización en general no requiere la activación de todos los receptores

Los sistemas de señalización evolucionaron de manera tal que una elevación en la concentración de las moléculas de señalización extracelular induce una respuesta proporcional en la célula que responde.

Para que esto suceda, la afinidad de unión (valor de K_d) de un receptor de superficie celular para una molécula de señalización debe ser mayor que la concentración normal (sin estimular) de esa molécula en el líquido extracelular o la sangre. En la práctica, este principio puede observarse al comparar las concentraciones de insulina presentes en el cuero y la K_d para la unión de la insulina a su receptor sobre las células hepáticas, $1,4 \times 10^{-10}$ M. Por ejemplo, supongamos que la concentración normal de insulina en el cuerpo es 5×10^{-12} M. Al sustituir este valor y la K_d de insulina en la Ecuación 15-2, es posible calcular la fracción de los receptores de insulina con insulina unida

$$\frac{[\text{RL}]}{([\text{RL}] + [\text{R}])}$$

en el equilibrio como 0,0344; es decir, alrededor del 3% del total de receptores de insulina unirán insulina. Si la concentración de insulina aumenta cinco veces a $2,5 \times 10^{-11}$ M, el número de complejos de receptor-hormona se elevará proporcionalmente casi cinco veces; por lo tanto, alrededor del 15% del total de los receptores tendrá insulina unida. Si la extensión de la respuesta celular inducida es paralela al número de complejos receptor-hormona $[\text{RL}]$, como suele ser el caso, entonces las respuestas celulares también aumentarán alrededor de cinco veces.

Por el otro lado, supongamos que la concentración normal de insulina en la sangre fuese la misma que el valor de K_d de $1,4 \times 10^{-10}$ M; en este caso, el 50% del total de receptores tendrá una insulina unida. Un aumento de cinco veces en la concentración de insulina a 7×10^{-10} M dará como resultado que el 83% de todos los receptores de insuli-

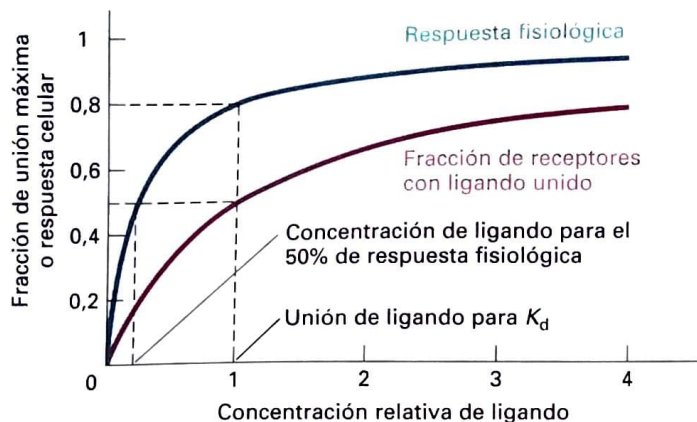


FIGURA EXPERIMENTAL 15-12 La respuesta fisiológica máxima a una señal externa se produce cuando solo una fracción de los receptores está ocupada por ligandos. Para las vías de señalización que exhiben este comportamiento, los gráficos de la extensión de la unión de ligando al receptor y las respuestas fisiológicas a diferentes concentraciones de ligandos difieren. En el ejemplo que aquí se muestra, el 50% de la respuesta fisiológica máxima es inducida a una concentración de ligando a la cual solo el 18% de los receptores están ocupados. Igualmente, el 80% de la respuesta máxima es inducida cuando la concentración de ligando iguala el valor de K_d , al cual el 50% de los receptores están ocupados.

na tengan insulina unida (un incremento del 66%). Por lo tanto, para que un aumento en la concentración de hormona cause un incremento proporcional de los receptores con el ligando unido, la concentración normal de la hormona debe estar muy por debajo del valor de K_d .

En general, la respuesta celular máxima a un ligando particular es inducida cuando mucho menos del 100% de sus receptores están unidos al ligando. Este fenómeno puede revelarse al determinar la extensión de la respuesta y de la unión receptor-ligando a diferentes concentraciones de ligando (Fig. 15-12). Por ejemplo, una célula progenitora (eritroide) de eritrocito típico tiene ~ 1 000 receptores superficiales para la eritropoyetina, la hormona proteica que induce a estas células a proliferarse y diferenciarse en glóbulos rojos. Debido a que solo se necesita que 100 de estos receptores unan eritropoyetina para inducir la división de una célula progenitora, la concentración del ligando necesaria para inducir el 50% de la respuesta celular máxima es proporcionalmente menor que el valor K_d para la unión. En tales casos, un gráfico del porcentaje de unión máxima versus la concentración de ligando difieren respecto del gráfico del porcentaje de respuesta celular máxima versus la concentración de ligando.

La sensibilidad de una célula a las señales externas está determinada por el número de receptores de superficie y sus afinidades por el ligando

Debido a que la respuesta celular a una molécula de señalización particular depende del número de complejos receptor-ligando, cuanto menor es el número de receptores presentes en la superficie de una célula, menor es la sensibilidad de la célula a ese ligando. Como consecuencia, se necesita una mayor concentración de ligando para inducir la respuesta fisiológica de lo que sería el caso si más receptores estuviesen presentes.

Para ilustrar la relación importante entre la cantidad de receptores y la sensibilidad al ligando, ampliaremos nuestro ejemplo de una célula

progenitora eritroide típica. La K_d para la unión de la eritropoyetina (Epo) a su receptor es alrededor de 10^{-10} M. Como se mencionó anteriormente, solo el ~ 10% de los 1 000 receptores de eritropoyetina sobre la superficie de una célula debe estar unido al ligando para inducir la respuesta celular máxima. Es posible determinar las concentraciones del ligando [L] necesarias para inducir la respuesta máxima al reescribir la Ecuación 15-2 de la siguiente manera:

$$[L] = \frac{K_d}{\frac{R_T}{[RL]} - 1} \quad (15-3)$$

donde $R_T = [R] + [RL]$, el número total de receptores por célula. Si el número total de receptores Epo por célula, R_T , es 1 000, K_d es 10^{-10} M, y [RL] es 100 (el número de receptores Epo ocupados necesario para inducir la respuesta máxima), entonces una concentración Epo ([L]) de $1,1 \times 10^{-11}$ M provocará la respuesta máxima. Si el número total de receptores Epo (R_T) se reduce a 200 por célula, entonces se necesita una concentración de Epo 9 veces mayor (10^{-10} M) para ocupar 100 receptores e inducir la respuesta máxima. Claramente, la sensibilidad de una célula a una molécula de señalización está extremadamente influenciada por el número de receptores para ese ligando presente, como así también por la K_d .



Como su nombre lo indica, el factor de crecimiento epitelial (EGF) estimula la proliferación de muchos tipos de células epiteliales, incluyendo aquellas que revisten los conductos de la glándula mamaria. En alrededor del 25% de los cánceres de mama, las células tumorales producen concentraciones elevadas de un receptor EGF particular llamado HER2. La sobreproducción de HER2 torna a las células hipersensibles a las concentraciones ambientales de EGF que normalmente son demasiado bajas para estimular la proliferación celular; como consecuencia, el crecimiento de estas células tumorales es inadecuadamente estimulado por EGF. En el Capítulo 16 se verá que una comprensión de la función de HER2 en ciertos cánceres de mama lleva al desarrollo de anticuerpos monoclonales que unen HER2 y, por lo tanto, bloquean la señalización de EGF; estos anticuerpos han probado ser útiles en el tratamiento de pacientes con cáncer de mama. ■

La conexión de HER2-cáncer de mama demostró vívidamente que la regulación del número de receptores para una molécula de señalización dada expresada por una célula cumple una función clave en dirigir los acontecimientos fisiológicos y del desarrollo. Tal regulación puede ocurrir a nivel de la transcripción, la traducción y el procesamiento postraduccional o por control de la velocidad de degradación de los receptores. Alternativamente, la endocitosis de los receptores sobre la superficie celular puede reducir lo suficiente el número presente tal que se termine la respuesta celular. Como se describirá más adelante, otros mecanismos pueden reducir la afinidad de un receptor por su ligando y, así, disminuir la respuesta celular para una concentración dada de ligando. De esta manera, la reducción en la sensibilidad de una célula a un ligando particular, llamada *desensibilización*, puede ser el resultado de diversos mecanismos y es importante para la capacidad de las células de responder adecuadamente a las señales externas.

Los receptores pueden purificarse mediante las técnicas de afinidad

Para poder comprender totalmente cómo funcionan los receptores, es necesario purificarlos y analizar sus propiedades bioquímicas. La determinación de sus estructuras moleculares con y sin un ligando unido, por ejemplo, puede elucidar los cambios conformacionales que se producen con la unión del ligando que activa proteínas de la transducción de la señal corriente abajo. Pero esto puede ser un desafío. Una célula de mamífero "típico" tiene 1 000 a 50 000 copias de un único tipo de receptor de superficie celular. Esto podría ser un número grande, pero cuando se considera que la misma célula contiene $\sim 10^{10}$ moléculas de proteínas total y $\sim 10^6$ proteínas en la membrana plasmática sola, usted se dará cuenta de que estos receptores constituyen solo 0,1 al 5% de las proteínas de la membrana plasmática. Esta baja abundancia complica el aislamiento y la purificación de los receptores de la superficie celular. La purificación de los receptores también es dificultosa debido a que estas proteínas integrales de membrana primero deben solubilizarse de la membrana con un detergente no iónico (véase la Fig. 10-23) y luego separarse de otras proteínas celulares.

Al igual que vimos con el receptor Epo descrito anteriormente, las técnicas de DNA recombinante pueden utilizarse para generar células que expresen grandes cantidades de estas proteínas. Pero incluso cuando se utilizan técnicas de DNA recombinante para generar células que expresen receptores en grandes cantidades, se necesitan técnicas especiales para aislarlas y purificarlas a partir de otras proteínas de membrana. Una técnica utilizada a menudo en la purificación de receptores de la superficie celular que retienen sus capacidades de unión al ligando cuando son solubilizadas con detergentes es similar a la *cromatografía de afinidad* mediante el empleo de anticuerpos (véase la Fig. 3-38c). Para purificar un receptor con esta técnica, se une químicamente un ligando para el receptor de interés, en lugar de un anticuerpo, a las esferas utilizadas para formar una columna. Se pasa a través de la columna una preparación cruda, solubilizada con detergente, de las proteínas de membrana; solo se une el receptor, mientras que las otras proteínas son eliminadas por lavado. El paso de un exceso de ligando soluble a través de la columna causa que el receptor unido sea desplazado de las esferas y eluido de la columna. En algunos casos, un receptor puede ser purificado tanto como 100 000 veces en un único paso de cromatografía de afinidad.

Es posible utilizar ensayos de inmunoprecipitación y técnicas de afinidad para estudiar la actividad de proteínas de transducción de la señal

Después de la unión del ligando, los receptores activan una o más proteínas de transducción de señal que, a su vez, pueden afectar la actividad de múltiples proteínas efectoras (véase la Fig. 15-1); para comprender una cascada de señalización, es necesario que el investigador sea capaz de cuantificar la actividad de estas proteínas de transducción de la señal. Las cinasas y las proteínas de unión a GTP se encuentran en muchas cascadas de señalización, y en esta sección se describirán varios ensayos usados para medir sus actividades.

Inmunoprecipitación de cinasas La función cinasa en prácticamente todas las vías de señalización, y de forma típica en las células de mamí-

fero, contiene unas cien o más cinasas diferentes, cada una de las cuales está altamente regulada y puede fosforilar muchas proteínas diana. Los ensayos de inmunoprecipitación se utilizan con frecuencia para medir la actividad de una cinasa particular en un extracto celular. En una versión del método, un anticuerpo específico para la cinasa deseada se hace reaccionar con esferas cubiertas con la Proteína A; esto provoca que el anticuerpo se una a las esferas a través de su segmento Fc (véase la Fig. 9-29). Luego, estas esferas son mezcladas con una preparación de citosol o núcleo celular y después recuperadas por centrifugación y lavadas profundamente con una solución salina para eliminar las proteínas débilmente unidas que es improbable que se unan de manera específica al anticuerpo. Así, sólo las proteínas celulares que se unen específicamente al anticuerpo, la cinasa en sí misma y proteínas que se unen fuertemente a la cinasa, están presentes sobre las esferas. Las esferas luego son incubadas en una solución amortiguadora con una proteína sustrato y γ - ^{32}P ATP, donde solo el fosfato γ está marcado. La cantidad de ^{32}P transferido a la proteína sustrato es una medida de la actividad cinasa y puede ser cuantificada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida seguida por autorradiografía (véase la Fig. 3-36) o por inmunoprecipitación con un anticuerpo específico para el sustrato seguido por conteo de la radioactividad en el inmunoprecipitado. Al comparar los extractos de las células antes y después de la adición del ligando, por ejemplo, puede determinarse rápidamente si una cinasa particular es activada o no en la vía de transducción de la señal desencadenada por ese ligando.

Se mencionó que muchas proteínas pueden ser fosforiladas por varias cinasas diferentes, en general sobre distintos residuos de serina, treonina o tirosina. Por ende, es importante medir la extensión de la fosforilación de una única cadena lateral de aminoácido en una proteína específica antes y después de la estimulación de hormonas. Los anticuerpos cumplen una función importante en la detección de tales acontecimientos de fosforilación. Para generar un anticuerpo que pueda reconocer un aminoácido fosforilado específico en una proteína específica, primero se sintetiza químicamente un péptido de alrededor de 15 aminoácidos que tiene una secuencia aminoácídica que rodea el aminoácido fosforilado de la proteína específica pero donde un grupo fosfato ha sido unido químicamente a serina, treonina o tirosina. Después del acoplamiento de este péptido a un adyuvante para incrementar la inmunogenicidad, se lo utiliza para generar un conjunto de anticuerpos monoclonales (véase la Fig. 9-6). Luego es posible seleccionar un anticuerpo monoclonal que solo reacciona con el péptido fosforilado pero no con el desfosforilado; en general, tal anticuerpo se unirá a la proteína progenitora tan solo cuando este aminoácido específico esté fosforilado. Esta especificidad es posible debido a que el anticuerpo se une simultáneamente al aminoácido fosforilado y a las cadenas laterales de los aminoácidos adyacentes. A modo de ejemplo del uso de tales anticuerpos, la Figura 15-13 muestra que tres proteínas de transducción de la señal en células progenitoras rojas se fosforilan sobre residuos de aminoácidos específicos dentro de los 10 minutos posteriores a la estimulación al variar las concentraciones de la hormona eritropoyetina; la fosforilación aumenta con la concentración de Epo y es el primer paso en el desencadenamiento de la diferenciación de estas células en eritrocitos.

Ensayos de unión de proteínas mediante soporte (pull-down) de proteínas de unión a GTP Hemos visto que la superfamilia de las GTPasas de las proteínas interruptoras intracelulares alternan entre una forma activa ("encendida") con el GTP unido que modula la ac-

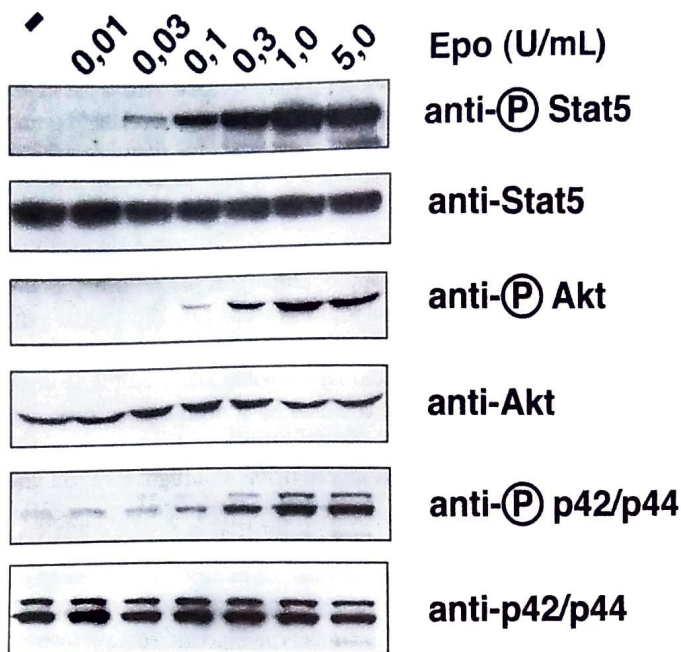


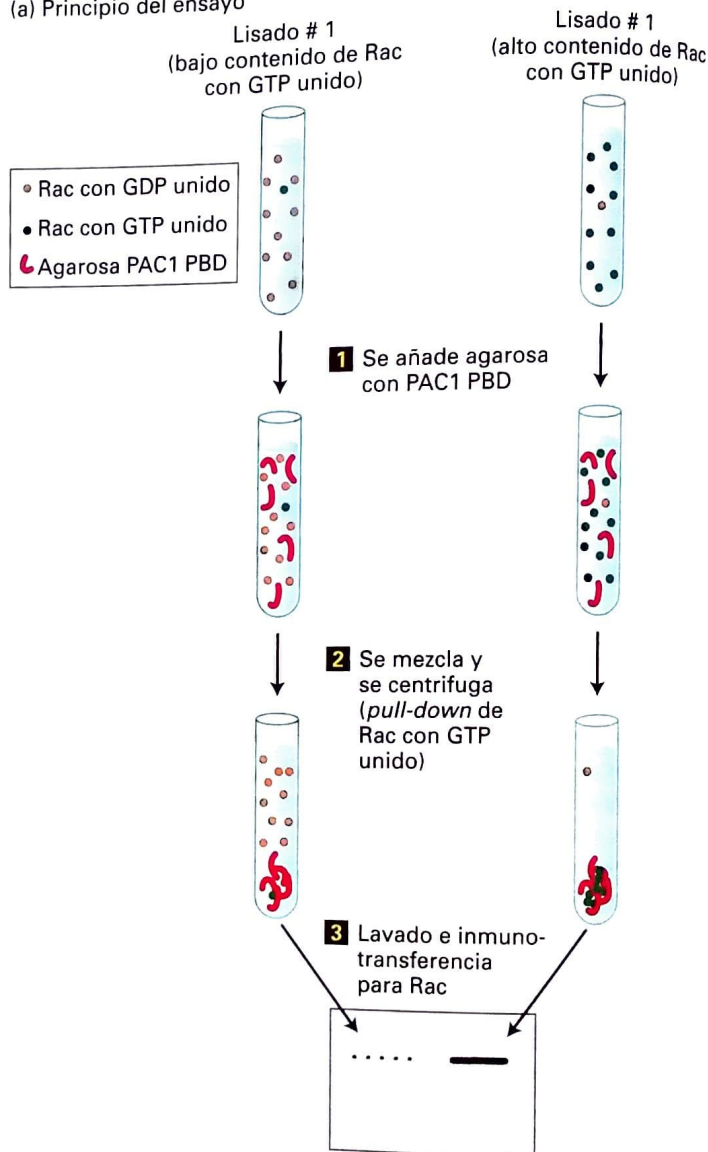
FIGURA EXPERIMENTAL 15-13 Activación mediante fosforilación de tres proteínas de transducción de la señal. Las células progenitoras de eritrocito murino fueron tratadas durante 10 min con diferentes concentraciones de la hormona eritropoyetina (Epo). Los extractos de la célula se analizaron mediante transferencia Western con tres anticuerpos diferentes específicos para las formas fosforiladas de las tres proteínas de transducción de la señal y tres que reconocen el segmento no fosforilado de aminoácidos en la misma proteína. Los datos muestran que, con concentraciones crecientes de Epo, las tres proteínas se fosforilan. El tratamiento con 1 unidad de Epo por mL es suficiente para fosforilar al máximo y, por lo tanto, activar las tres vías. Stat 5 = factor de transcripción fosforilado sobre la tirosina 694; Akt = cinasa fosforilada sobre serina 473; p42/p44 = p42/p44 MAP cinasa fosforilada sobre treonina 202 y tirosina 204. (Cortesía de Jing Zhang, Zhang y cols., 2003, *Blood* 102:3938)

tividad de proteínas diana específicas y una forma ("apagada") con el GDP unido. El principal ensayo para medir la activación de esta clase de proteínas aprovecha el hecho de que cada una de tales proteínas tiene una o más dianas a las cuales solo se unen cuando estas tienen GTP unido; en general, la proteína diana tiene un dominio de unión específico que se une a los segmentos interruptores de la proteína de unión a GTP. Los ensayos de *pull-down* utilizados para cuantificar la

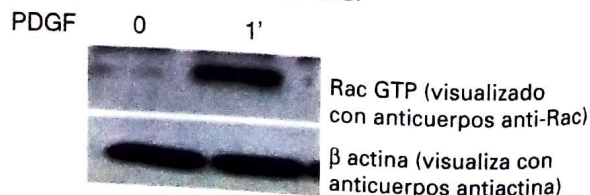
FIGURA EXPERIMENTAL 15-14 Un ensayo de unión de proteínas mediante soporte (*pull-down*) muestra que la pequeña proteína de unión a GTP Rac1 es activada por el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Al igual que otras pequeñas GTPasa, Rac1 regula los acontecimientos moleculares mediante alternancia entre una forma inactiva con GDP unido y una forma activa con GTP unido. En su estado activo (GTP unido), Rac1 se une específicamente al dominio de unión p21 (PBD) de la proteína cinasa activada por p21 (PAC) para controlar cascadas de señalización corriente abajo. (a) Principio del ensayo: el dominio PBD de unión a Rac1 es generado por técnicas de DNA recombinante y adherido a esferas de agarosa luego mezcladas con extracto celulares (paso 1). Las esferas son recuperadas por centrifugación (paso 2) y se cuantifica la cantidad de GTP unido a Rac1 mediante transferencia Western usando un anticuerpo anti-Rac1 (paso 3). (b) La transferencia Western muestra la activación de Rac1 después del tratamiento de las células madre hematopoyéticas durante 1 minuto con la hormona factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF). Se utiliza una transferencia Western para activar a fin de controlar que se cargue cada carril del gel con la misma cantidad de proteína total. ([a] De Cell Biolabs Inc, [b] de G. Ghisla y cols., 2006, *Blood* 108:2087-2094).

activación de una proteína de unión a GTP específica son similares a las inmunoprecipitaciones, excepto que el dominio de unión específico de la proteína diana está inmovilizado sobre esferas pequeñas (Fig. 15-14). Las esferas se mezclan con un extracto celular y luego se recuperan por centrifugación; la cantidad de proteína de unión a GTP sobre las esferas es cuantificada por transferencia Western. El ejemplo en la Figura 15-14 muestra que la fracción de la GTPasa pequeña Rac1 que tiene un GTP unido aumenta marcadamente después de la estimulación mediante la hormona, el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), lo cual indica que Rac1 es una proteína de transducción de la señal activada por el receptor PDGF.

(a) Principio del ensayo



(b) Transferencia Western de células madre hematopoyéticas antes y después del tratamiento con PDGF



CONCEPTOS CLAVE de la Sección 15.2

Estudio de los receptores de la superficie celular y proteínas que transducen las señales

- La concentración de ligando a la cual la mitad de los receptores del ligando están ocupados, la K_d , puede ser determinada experimentalmente y es una medida de la afinidad del receptor con el ligando (véase la Fig. 15-10).
- Debido a la alta afinidad de los receptores para sus ligandos diana, el dominio extracelular de los receptores puede utilizarse como un fármaco para reducir la concentración de la hormona libre.
- En general, la respuesta máxima de una célula a un ligando particular se produce a concentraciones de ligandos a la cual menos del 100% de sus receptores están unidos al ligando (véase la Fig. 15-12).
- Las técnicas de cromatografía de afinidad pueden usarse para purificar receptores incluso cuando están presentes en baja abundancia.
- Los ensayos de inmunoprecipitación que utilizan anticuerpos específicos para proteincinasas pueden medir la actividad cinasa. Los ensayos de inmunoprecipitación que emplean anticuerpos específicos para los péptidos fosforilados pueden medir la fosforilación de un aminoácido específico sobre cualquier proteína deseada dentro de una célula (véase la Fig. 15-13).
- Los ensayos de unión de proteínas mediante soporte (*pull-down*) que utilizan el dominio de unión a proteína de una proteína diana pueden emplearse para cuantificar la activación de una proteína de unión a GTP dentro de una célula (véase la Fig. 15-14).

15.3 Receptores acoplados a proteína G: estructura y mecanismo

Como hemos mencionado, tal vez la clase más numerosa de receptores son los receptores acoplados a proteína G (GPCR). En los seres humanos, los GPCR se utilizan para detectar y responder a muchos tipos diferentes de señales, incluyendo neurotransmisores, hormonas involucradas en el metabolismo del glucógeno y las grasas, e incluso fotones de luz. Todas las vías de transducción de la señal de los GPCR tienen los siguientes elementos en común: (1) un receptor que contiene siete hélices α que atraviesan la membrana; (2) una proteína G trimérica, que funciona como un interruptor al alternar entre las formas activas e inactivas; (3) una proteína efectora unida a membrana; y (4) proteínas que participan en la regulación por retroalimentación y desensibilización de la vía de señalización. En muchas vías GPCR, también se produce un segundo mensajero. Las vías GPCR suelen tener efectos a corto plazo en la célula al modificar rápidamente proteínas existentes, ya sea enzimas o canales de iones. Por lo tanto, las vías permiten a las células responder con rapidez a una variedad de señales, ya sea estímulos ambientales como la luz u hormonales como la adrenalina.

En esta sección, describiremos la estructura básica y el mecanismo de los GPCR y sus proteínas G triméricas asociadas. En las Secciones 15.4 a 15.6, se describirán las vías GPCR que activan diferentes proteínas efectoras.

Todos los receptores acoplados a proteína G comparten la misma estructura básica

Todos los receptores acoplados a proteína G tienen la misma orientación en la membrana y contienen siete regiones α helicoidales transmembrana (H1-H7), cuatro segmentos extracelulares y cuatro segmentos citosólicos (Fig. 15-15). Invariablemente, el extremo N-terminal está sobre el lado exoplasmático y el extremo C-terminal, sobre el lado citosólico de la membrana. El segmento carboxilo terminal (C4), el lazo C3, y en algunos receptores también el lazo C2, están involucrados en interacciones con una proteína G trimérica asociada. Durante la evolución, se han conservado muchas subfamilias de receptores acoplados a proteína G; miembros de estas subfamilias son en especial similares en secuencia aminoácida y estructura.

Los receptores acoplados a proteína G están anclados establemente en el centro hidrófobo de la membrana plasmática por muchos aminoácidos hidrófobos sobre las superficies más externas de los siete segmentos que atraviesan la membrana. Un grupo de receptores acoplados a proteína G cuya estructura molecular es conocida en detalle son los **receptores β -adrenérgicos**, que unen hormonas como la adrenalina y la noradrenalina (Fig. 15-16). En estos y muchos otros receptores, los segmentos de diversas hélices α embebidas en la membrana y lazos extracelulares forman el sitio de unión al ligando que se abre hacia la superficie exoplasmática. El antagonista cianopindolol, que se muestra en la Figura 15-16, se une con mucha mayor afinidad al receptor que la mayoría de los agonistas, y se ha cristalizado y determinado la estructura del complejo receptor-ligando. Cadenas laterales de 15 aminoácidos localizados en cuatro hélices α transmembrana y el lazo o bucle 2 extracelular hacen contacto con el ligando.

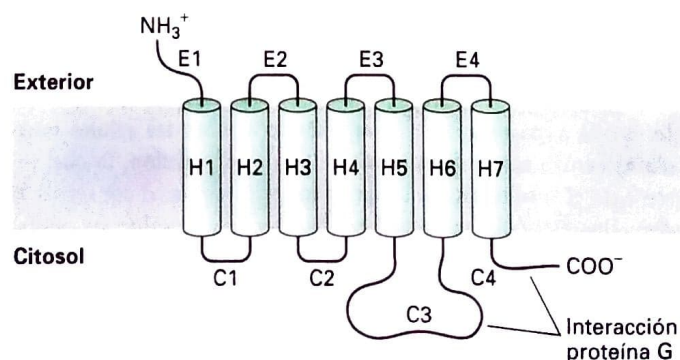
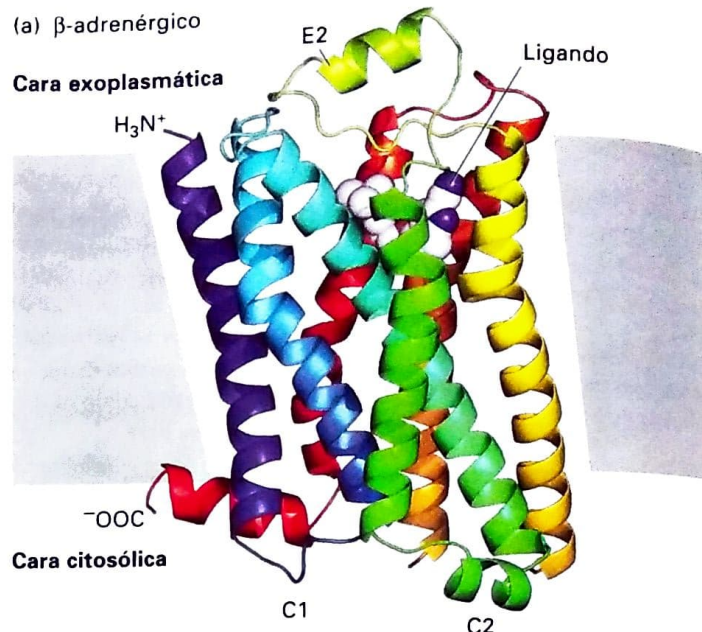


FIGURA 15-15 Estructura general de los receptores acoplados a proteína G. Todos los receptores de este tipo tienen la misma orientación en la membrana y contienen siete regiones α -helicoidales transmembrana (H1-H7), cuatro segmentos extracelulares (E1-E4) y cuatro segmentos citosólicos (C1-C4). El segmento carboxilo terminal (C4), el lazo C3 y, en algunos receptores, también el lazo C2 están involucrados en las interacciones con una proteína G trimérica.

FIGURA 15-16 Estructura del receptor β -adrenérgico de pavo que forma complejo con el antagonista cianopindolol. (a) Vista lateral que muestra la localización aproximada de la bicapa fosfolipídica de la membrana. Una representación de cintas coloreadas de la estructura del receptor (extremo N-terminal, azul, extremo C-terminal, rojo), con el cianopindolol como un modelo de esferas rellenas de color gris. El lazo 2 extracelular (E2) y los lazos 1 y 2 citoplasmáticos (C1, C2) están marcados. (b) Vista desde el lado externo que muestra en primer plano un bolsillo de unión al ligando que está formado por aminoácidos en las hélices 3, 5, 6 y 7, como así también el lazo 2 extracelular, localizado entre las hélices 4 y 5. Los átomos del cianopindolol están coloreados en gris (carbono), azul (nitrógeno) y rojo (oxígeno). El bolsillo de unión al ligando comprende 15 cadenas laterales de los residuos de aminoácidos en cuatro α -hélices transmembrana y el lazo 2 extracelular. Como ejemplo de interacciones de unión específica, el átomo N cargado positivamente en el grupo de amino que se encuentra tanto en el cianopindolol como en la adrenalina forma un enlace iónico con el carboxilato de la cadena lateral del aspartato 121 (D¹²¹) en la hélice 3 y el carboxilato de la asparagina 329 (N³²⁹) en la hélice 7. (De T. Wayne y cols., 2008, *Nature* **454**:486).

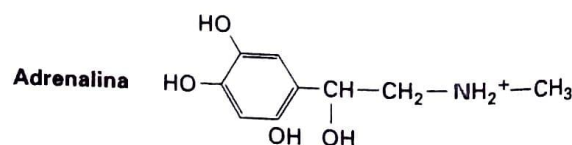
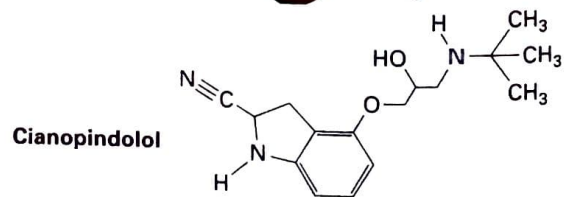
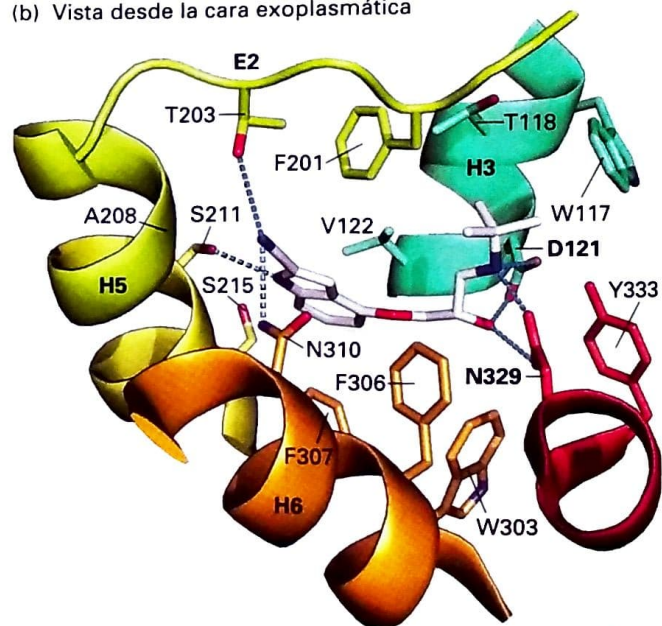


Los aminoácidos que forman el interior de diferentes receptores acoplados a proteína G son diversos, lo que permite que distintos receptores se unan a moléculas pequeñas muy diversas, ya sean hidrófilas como la adrenalina o hidrófobas como muchos odorantes.

Mientras que todos los receptores acoplados a proteína G comparten la misma estructura básica, diferentes subtipos de GPCR pueden unir la misma hormona, con distintos efectos celulares. Para ilustrar la versatilidad de estos receptores, consideraremos un grupo de ellos acoplados a proteína G para adrenalina que se encuentran en diferentes tipos de células de mamífero. La hormona **adrenalina** tiene particular importancia en mediar la respuesta del cuerpo al estrés, también conocida como la respuesta de lucha o huida. Durante momentos de miedo o ejercicio intenso, cuando los tejidos pueden tener una necesidad incrementada para catabolizar glucosa y ácidos grasos para producir ATP, la adrenalina señala la degradación rápida de glucógeno a glucosa en el hígado y de triacilgliceroles a ácidos grasos en los adipocitos (células grasas); en segundos, estos principales combustibles metabólicos son suministrados a la sangre. En los mamíferos, la liberación de glucosa y ácidos grasos es desencadenada por la unión de adrenalina (o sus derivados de noradrenalina) a los receptores β -adrenérgicos sobre la superficie de células hepáticas (hígado) y adipocitos.

La adrenalina también tiene otros efectos corporales. Por ejemplo, unida a los receptores β -adrenérgicos sobre las células musculares cardíacas aumenta la velocidad de contracción, lo cual incrementa el suministro de sangre a los tejidos. Por el contrario, la adrenalina estimula los receptores β -adrenérgicos sobre las células del músculo liso del intestino y provoca la relajación. Otro tipo de GPCR de adrenalina, los **receptores α -adrenérgicos**, se encuentra sobre las células de músculo liso que recubren los vasos sanguíneos en el tracto intestinal, la piel y los riñones. La unión de adrenalina a estos receptores causa que las arterias se constriñan y se corte así la circulación a dichos órganos. Estos diversos efectos de la adrenalina ayudan a orquestar las respuestas integradas a través de todo el cuerpo y a dirigirlas hacia un fin común: suministrar energía a los principales músculos locomotores mientras que, al mismo tiempo, desviarla de otros órganos no es tan crucial en la ejecución de una respuesta al estrés corporal.

(b) Vista desde la cara exoplasmática



Los receptores acoplados a proteína G activados por ligando catalizan el intercambio de GTP por GDP sobre la subunidad α de una proteína G trimérica

Las proteínas G triméricas contienen tres subunidades designadas α , β y γ . Tanto la subunidad G_α como la G_γ están unidas a la membrana mediante lípidos adheridos covalentemente. Las subunidades β y γ siempre están unidas juntas y suelen mencionarse como la subunidad $G_{\beta\gamma}$. En el estado de reposo, cuando no hay ligando unido al receptor, la subunidad G_α tiene un GDP unido y forma complejo con $G_{\beta\gamma}$. La unión de un ligando (p. ej., adrenalina) o un agonista (p. ej., isoproterenol) a

un receptor acoplado a proteína G cambia la conformación de sus lazos que miran al citosol y permite al receptor unir la subunidad G_α (Fig. 15-17, pasos 1 y 2). Esta unión libera el GDP unido; así, el receptor unido a ligando activado funciona como un factor de intercambio de nucleótido de guanina (GEF) para la subunidad G_α (paso 3). Luego, el GTP se une rápidamente al sitio de nucleótido de guanina "vacío", lo que causa un cambio en la conformación de sus segmentos interruptores (véase la Fig. 15-7). Estos cambios debilitan la unión de G_α tanto con el receptor y como con la subunidad $G_{\beta\gamma}$ (paso 4). En la mayoría de los casos, $G_\alpha \cdot \text{GTP}$, que permanece anclado en la membrana, luego interacciona con una proteína efectora y la activa, como se describe en

ANIMACIÓN GENERAL: Señalización extracelular

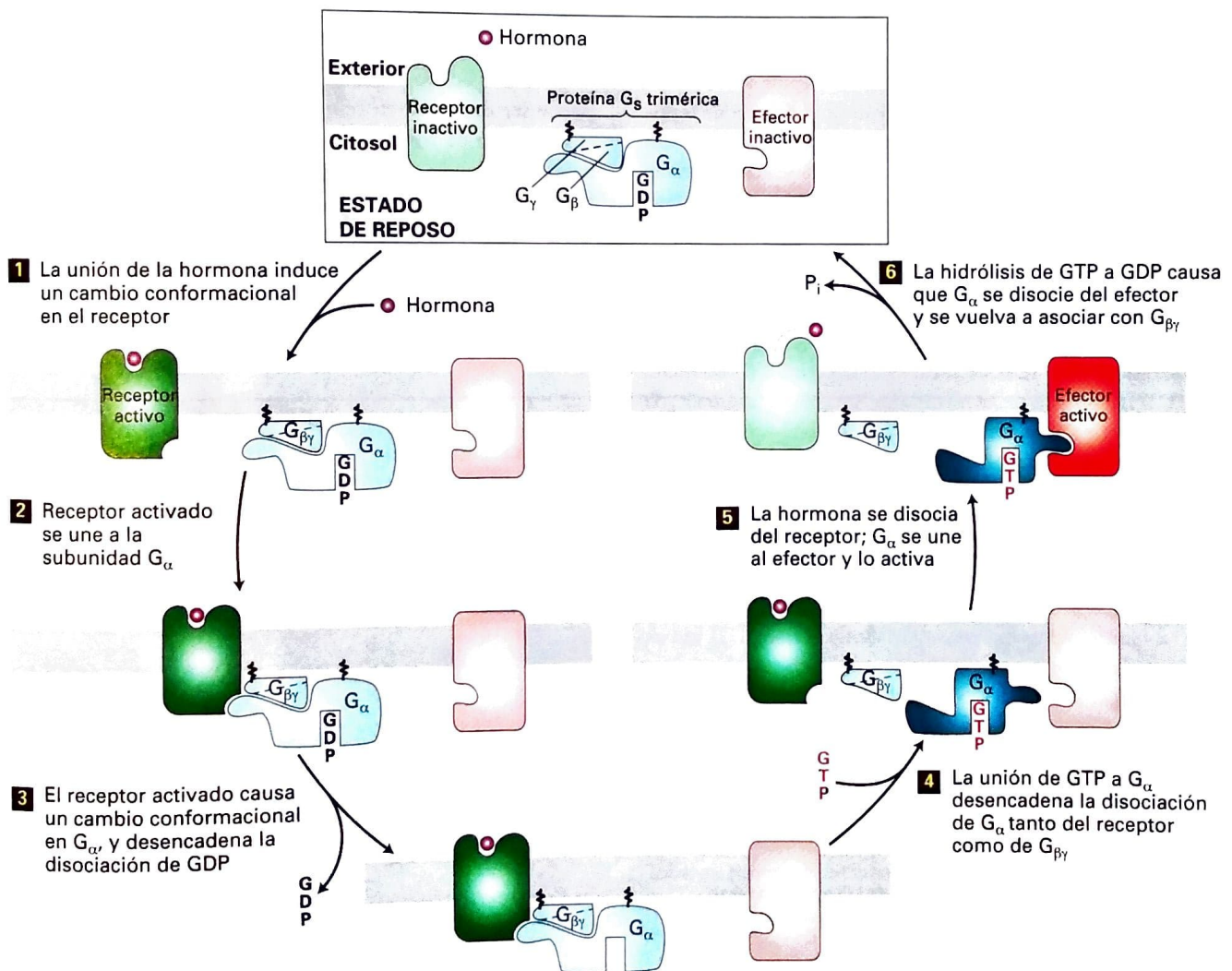


FIGURA 15-17 Mecanismo general de la activación de las proteínas efectoras asociadas con los receptores acoplados a proteína G. Las subunidades G_α y $G_{\beta\gamma}$ de las proteínas G triméricas están unidas a la membrana a través de moléculas de lípidos unidos covalentemente (líneas negras onduladas). A continuación de la unión del ligando, del intercambio de GDP por GTP y de la disociación de las subunidades de la proteína G (pasos 1-4),

el $G_\alpha \cdot \text{GTP}$ libre se une y activa a una proteína efectora (paso 5). La hidrólisis de GTP termina la señalización y se produce nuevamente el ensamblaje de la proteína G trimérica, y el sistema regresa a su estado de reposo (paso 6). La unión de otra molécula de ligando causa la repetición del ciclo. En algunas vías, la proteína efectora es activada por la subunidad $G_{\beta\gamma}$ libre. La s en la proteína G, trimérica indica "estimuladora." (De W. Oldham y H. Hamm, 2006, *Quart. Rev. Biophys.* 39:117).

la Figura 15-17 (paso 5). En algunos casos, $G_\alpha \cdot \text{GTP}$ inhibe al efector. Más aún, la dependencia con el tipo de célula y la proteína G, la subunidad $G_{\beta\gamma}$ liberada de su subunidad α , a veces traducirá una señal al interactuar con una proteína efectora.

El estado $G_\alpha \cdot \text{GTP}$ activo es de corta duración debido a que el GTP unido es hidrolizado a GDP en minutos, catalizado por la actividad GTPasa intrínseca de la subunidad G_α (véase la Fig. 15-17, paso 6). Por ende, la conformación de la G_α vuelve a cambiar al estado inactivo $G_\alpha \cdot \text{GDP}$ y bloquea así cualquier activación posterior de proteínas efectoras. La velocidad de la hidrólisis de GTP es a veces potenciada aún más mediante la unión del complejo $G_\alpha \cdot \text{GTP}$ al efector; por lo tanto, el efector funciona como una proteína de activación de GTPasa (GAP). Este mecanismo reduce significativamente la duración de la activación efectora y evita una sobreacción celular. En muchos casos, un segundo tipo de proteína GAP llamada regulador de la señalización de proteína G (RGS) también acelera la hidrólisis de GTP mediante la subunidad G_α , y reduce aún más el tiempo que el efector permanece activado. El $G_\alpha \cdot \text{GTP}$ resultante vuelve a asociarse rápidamente con $G_{\beta\gamma}$ y el complejo comienza a interactuar con un receptor activado; así, todo el proceso empieza de nuevo. De esta forma, el sistema de transducción de señal GPCR contiene un mecanismo integrado de retroalimentación que asegura que la proteína efectora solo se active durante unos pocos segundos o minutos después de la activación del receptor; la activación continua de receptores a través de la unión de ligando,

junto con la activación subsiguiente de la proteína G correspondiente, es esencial para la activación prolongada del efector.

El modelo que se muestra en la Figura 15-17 está avalado por evidencia que proviene de estudios con compuestos llamados análogos de GTP que son estructuralmente similares al GTP y, por lo tanto, pueden unirse a las subunidades G_α como lo hace el GTP pero no pueden ser hidrolizados por la GTPasa intrínseca. En algunos de estos compuestos, el enlace fosfodiéster P-O-P que conecta los fosfatos β y γ del GTP son reemplazados por una unión P-NH-P o P-CH₂-P no hidrolizable. La adición de tal análogo de GTP a una membrana plasmática en presencia de un agonista para un receptor particular resulta en una activación de la proteína G y su proteína efectora asociada de mucha mayor duración de la que ocurre con GTP. En este experimento, una vez que el análogo de GTP no hidrolizable es intercambiado por GDP unido a G_α , se mantiene unido de manera permanente a G_α . Debido a que el complejo análogo $G_\alpha \cdot \text{GTP}$ es tan funcional como un complejo $G_\alpha \cdot \text{GTP}$ normal, la proteína efectora continúa permanentemente activa.

La disociación mediada por GPCR de las proteínas triméricas puede ser detectada en células vivas. Estos estudios han explotado el fenómeno de *transferencia de energía fluorescente*, que cambia la longitud de onda de la fluorescencia emitida cuando dos proteínas fluorescentes interactúan (véase la Fig. 9-22). La Figura 15-18 muestra cómo el enfoque experimental ha demostrado que la disociación

ARCHIVO DE AUDIO (INGLÉS): Activación de las proteínas G medida por transferencia de energía por resonancia fluorescente (FRET)

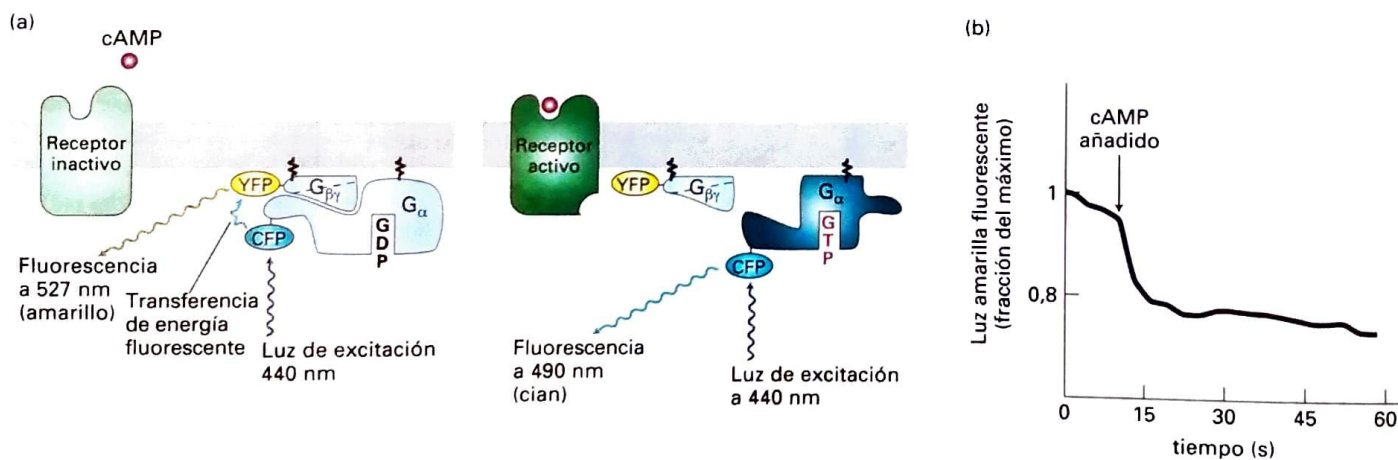
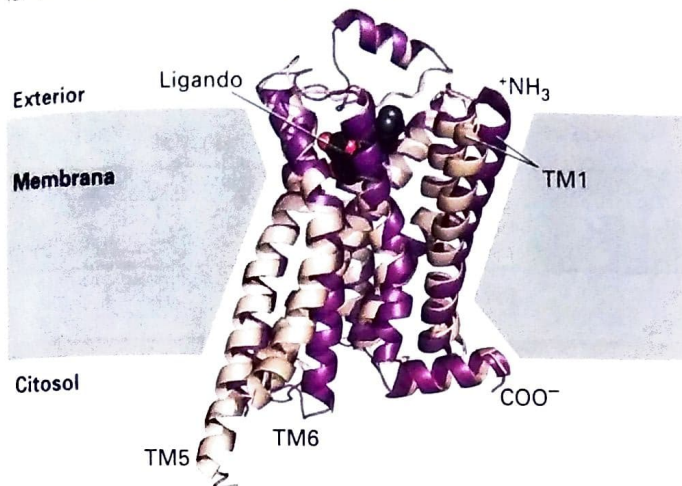


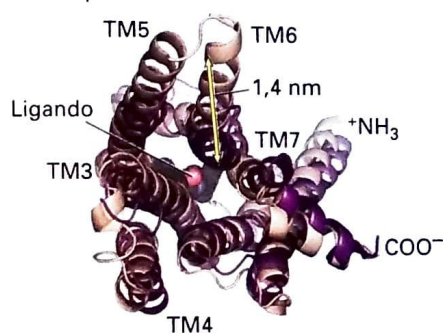
FIGURA EXPERIMENTAL 15-18 La activación de las proteínas G se produce dentro de los segundos de la unión del ligando en las células amebas. En la célula de ameba *Dictyostelium discoideum*, el cAMP actúa como una molécula de señalización y se une a un receptor acoplado a proteína G; no es un segundo mensajero. Las células de ameba se transfectaron con genes que codifican dos proteínas de fusión: una G_α fusionada a la proteína cian fluorescente (CFP), una forma mutante de la proteína verde fluorescente (GFP) y una G_β fusionada a otra variante de GFP, la proteína amarilla fluorescente (YFP). CFP normalmente fluoresce con luz a 490 nm; YFP, con luz a 527 nm. (a) Cuando CFP y YFP están próximas, como en el complejo $G_\alpha \cdot G_{\beta\gamma}$ en reposo, se puede producir transferencia de energía fluorescente entre CFP y YFP (izquierda). Como resultado, la irradiación de células en reposo con luz a 440

nm (la cual excita directamente a CFP pero no a YFP) causa emisión de luz a 527 nm (amarillo), característico de YFP. Sin embargo, si la unión del ligando lleva a la disociación de las subunidades G_α y $G_{\beta\gamma}$ entonces no se produce la transferencia de energía fluorescente. En este caso, la irradiación de células a 440 nm causa la emisión de luz a 490 nm (cian) característica de la CFP (derecha). (b) Gráfico de emisión de luz amarilla (527 nm) desde una célula de ameba transfectada antes y después de la adición de AMP cíclico extracelular (flecha), el ligando para el receptor acoplado a proteína G en estas células. La caída en la fluorescencia amarilla, la cual resulta de la disociación de la proteína de fusión G_α -CFP de la proteína de fusión G_β -YFP, se produce dentro de los segundos de la adición de cAMP (Adaptado de C. Janietopoulos y cols., 2001, *Science* 291:2408).

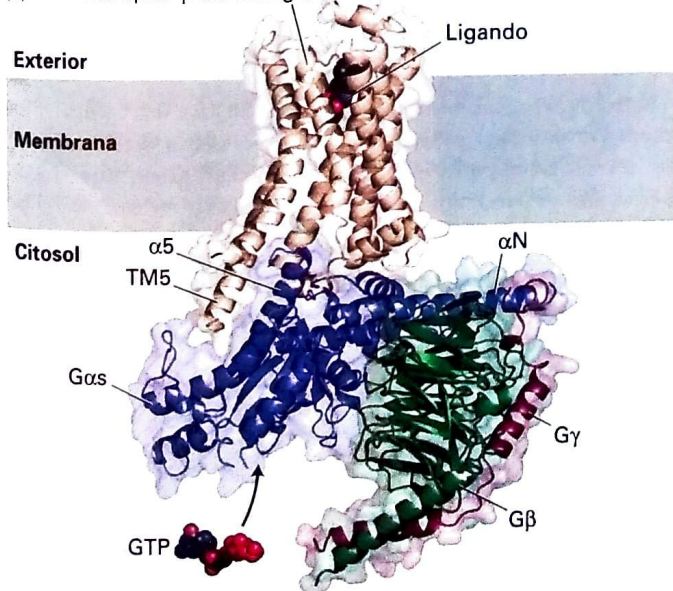
(a) Vista lateral del receptor β -adrenérgico



(b) Vista desde la superficie citosólica



(c) Receptor β -adrenérgico



del complejo $G_{\alpha} \cdot G_{\beta\gamma}$ a los pocos segundos de la adición del ligando proporciona evidencia adicional para el modelo de la alternancia de la proteína G. Esta técnica experimental general puede utilizarse para seguir la formación y disociación de otros complejos proteína-proteína en células vivas.

FIGURA 15-19 Estructura del receptor β -adrenérgico en los estados activo e inactivo y con su proteína G trimérica asociada, la $G_{\alpha s}$ (a)

Comparación de las estructuras tridimensionales del receptor β -adrenérgico activado (dorado) unido a un agonista fuerte y el receptor inactivo (púrpura) unido a un antagonista. (b) Vista desde la superficie citosólica. Nótese los principales cambios vistos en las conformaciones de los dominios intracelulares de las hélices transmembrana 5 (TM5) y 6 (TM6). En el estado activo, TM5 es extendida por dos giros helicoidales, mientras que TM6 se mueve hacia afuera 1,4 nm. (c) La estructura del complejo receptor activo muestra el receptor adrenérgico (dorado) unido a un agonista (esferas negras y rojas) y que participa en interacciones extensas con un segmento de $G_{\alpha s}$ (púrpura). $G_{\alpha s}$ junto con G_{β} (verde) y G_{γ} (rojo) constituyen la proteína G heterotrimérica G_s . [De S. Rasmussen y cols., 2011, *Nature* **476** 387-390]

Durante muchos años, fue imposible determinar la estructura del mismo GPCR en los estados activo e inactivo. En la actualidad, esto se ha logrado con el receptor β -adrenérgico (como así también con la rodopsina, analizada en la Sección 15.4). Las siete hélices α embebidas en la membrana del receptor β -adrenérgico rodean totalmente un segmento central al cual se une no covalentemente un agonista o un antagonista (Fig. 15-19). La unión de un agonista al receptor induce un cambio conformacional (Fig. 15-19a) en el cual existen sustanciales movimientos de las hélices transmembrana 5 y 6 que cambian en la estructura del lazo C3; juntos, crean una superficie que ahora puede unirse a un segmento de la subunidad $G_{\alpha s}$ (Fig. 15-19b).

Los estudios de cristalografía de rayos X del complejo de receptor activado y G_s también han revelado cómo las subunidades de una proteína G interactúan entre sí y proporcionan pistas acerca de cómo la unión de GTP lleva a la disociación de la G_{α} a partir de la subunidad $G_{\beta\gamma}$. Como se reveló en el modelo estructural de la Figura 15-19b, una superficie grande de $G_{\alpha} \cdot GDP$ interactúa con la subunidad G_{β} ; parte de esta superficie se localiza en la hélice alfa α_N en el segmento N-terminal de $G_{\alpha} \cdot GDP$. Nótese que G_{α} contacta directamente a G_{β} pero no a G_{γ} . La unión de los segmentos N-terminales alfa helicoidales α_N y α_5 de la proteína $G_{\alpha s}$ con las hélices transmembranas 5 y 6 del receptor activado (Fig. 15-19b) será seguida, junto con otras proteínas G, por la apertura de la subunidad G_{α} , la expulsión del GDP unido y su reemplazo con GTP; esto es inmediatamente seguido por cambios conformacionales dentro de interruptores I y II que perturban las interacciones moleculares entre G_{α} y $G_{\beta\gamma}$, lo que lleva a sus disociaciones.

Diferentes proteínas G son activadas por distintos GPCR y, a su vez, regulan diversas proteínas efectoras

Todas las proteínas efectoras en las vías GPCR son canales de iones unidos a membrana o enzimas unidas a membrana que catalizan la formación de los segundos mensajeros que se muestra en la Figura 15-8. Las variaciones sobre el tema de la señalización GPCR que describimos en las Secciones 15.4 a 15.6 surgen debido a que múltiples proteínas G están codificadas en los genomas eucariotes. Según el último conteo, los seres humanos tienen 21 subunidades G_{α} diferentes codificadas por 16 genes, varios de los cuales sufren corte y empalme alternativo, seis subunidades G_{β} y 12 subunidades G_{γ} . Hasta donde se conoce, las diferentes subunidades G son esencialmente intercambiables en sus funciones, mientras que distintas subunidades $G_{\beta\gamma}$ permiten a las varias proteínas G sus especificidades. Así, podemos referirnos a la proteína G completa de tres subunidades por el nombre de su subunidad alfa.

Cuadro 15-1 Principales clases de proteínas G triméricas de mamífero y sus efectores*

Clase G_α	Efectores asociados	Segundo mensajero	Ejemplos de receptores
G_{ts}	Adenilciclase	cAMP (aumentado)	Receptor β -adrenérgico (adrenalina); receptores para glucagón, serotonina, vasopresina
G_{ai}	Canal de K^+ adenilciclase ($G_{\beta\gamma}$ activa al efector)	cAMP (disminuido) Cambio en el potencial de membrana	Receptor α_2 -adrenérgico Receptor muscarínico de acetilcolina
G_{tolf}	Adenilciclase	cAMP (aumentado)	Receptores de olor en la nariz
G_{aq}	Fosfolipasa C	IP_3 , DAG (aumentado)	Receptor α_1 -adrenérgico
G_{ao}	Fosfolipasa C	IP_3 , DAG (aumentado)	Receptor de acetilcolina en células endoteliales
G_{at}	cGMP fosfodiesterasa	cGMP (reducido)	Rodopsina (receptor de luz) en los bastones

* Una subclase G_α dada puede estar asociada con más de una proteína efectora. Hasta la actualidad, solo se ha identificado una clase principal de G_α , pero se han descrito múltiples proteínas G_{aq} y G_{at} . Por lo general, las proteínas efectoras están reguladas por G_α , pero en algunos casos por $G_{\beta\gamma}$ o la acción combinada de G_α y $G_{\beta\gamma}$.
 IP_3 = inositol 1,4,5-trifosfato; DAG = 1,2-diacilglicerol.
 FUENTES: véase L. Birnbaumer, 1992, *Cell* 71:1069; Z. Farfel y cols., 1999, *New Eng. J. Med.* 340:1012; y K. Pierce y cols., 2002, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 3:639.

El Cuadro 15-1 resume las funciones de las principales clases de proteínas G con diferentes subunidades G_α . Por ejemplo, los diversos tipos de receptores de adrenalina mencionados anteriormente están acoplados a diferentes subunidades G_α que influyen de manera diferente en proteínas efectoras y, por ende, tienen efectos distintos sobre el comportamiento celular en una célula diana. Ambos subtipos de receptores β -adrenérgicos, llamados β_1 y β_2 , están acoplados a una proteína G estimuladora (G_s) cuya subunidad alfa (G_α) activa enzimas efectoras unidas a membrana llamadas **adenilciclasas**. Una vez activada, esta enzima cataliza la síntesis del segundo mensajero cAMP. Por el contrario, el subtipo α_2 del receptor β -adrenérgico está acoplado a una proteína G inhibitoria (G_i) cuya subunidad alfa G_α inhibe a la adenilciclase, la misma enzima efectora asociada con los receptores β -adrenérgicos. La subunidad G_{aq} , que está acoplada al receptor α_1 -adrenérgico, activa una enzima efectora diferente, la **fosfolipasa C**, que genera otros dos segundos mensajeros, DAG e IP_3 (véase la Fig. 15-8). En el Cuadro 15-1 se enumeran ejemplos de vías de señalización que utilizan cada una de las subunidades G_α y que se describirán en las siguientes tres secciones.

 Algunas toxinas bacterianas contienen una subunidad que penetra la membrana plasmática de las células de mamífero diana y cataliza en el citosol una modificación química sobre las proteínas G_α que evita la hidrólisis del GTP unido a GDP. Por ejemplo, las toxinas producidas por la bacteria *Vibrio cholera*, que causa cólera, o ciertas cepas de *E. coli* modifican la proteína G_α en las células epiteliales intestinales. Como resultado, G_α permanece en el estado activo, y así activa de manera continua al efector adenilciclase en ausencia de estimulación hormonal. La elevación excesiva resultante en el cAMP intracelular lleva a una pérdida de electrolitos y agua hacia el lumen intestinal, lo que ocasiona la diarrea característica de la infección por estas bacterias. La toxina producida por *Bordetella pertussis*, una bacteria que comúnmente infecta el tracto intestinal y causa tos ferina, cataliza una modificación de G_α que evita la liberación de GDP unido. Como resultado, G_α está bloqueada en el estado inactivo, lo que reduce la inhi-

bición de la adenilciclase. El incremento resultante en el cAMP en las células epiteliales de las vías aéreas estimula la pérdida de líquidos y electrolitos y la secreción mucosa. ■

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 15.3

Receptores acoplados a proteína G: estructura y mecanismo

- Los receptores acoplados a proteína G (GPCR) son una familia grande y diversa con una estructura común de siete hélices α que atraviesan la membrana y un bolsillo de unión al ligando interno que es específico para ligandos (véanse las Figs. 15-15 y 15-16).
- Los GPCR pueden tener una variedad de efectos celulares dependiendo del subtipo de receptor que une ligando. Por ejemplo, la hormona adrenalina, que media la respuesta de lucha o huida, se une a múltiples subtipos de GPCR en diversos tipos celulares, con efectos psicológicos variables.
- Los GPCR están acoplados a proteínas G triméricas, que contienen tres subunidades designadas α , β y γ . La subunidad G_α es una proteína interruptora GTPasa que alterna entre un estado activo (“encendido”) con GTP unido y otro inactivo (“apagado”) con GDP unido. La forma “encendida” se separa de las subunidades β y γ y activa un efector unido a membrana. Las subunidades β y γ permanecen unidas juntas y solo ocasionalmente transducen señales (véase la Fig. 15-17).
- La unión del ligando causa un cambio conformacional en ciertas hélices que atraviesan la membrana y los lazos intracelulares del GPCR, lo que le permite unirse a y funcionar como un factor intercambiador de nucleótido de guanina (GEF) para su subunidad G_α acoplada; así, cataliza la disociación del GDP y posibilita que se una el GTP. El cam-

bio resultante en la conformación de las regiones interruptoras en G_{α} causa que esta se disocie de la subunidad $G_{\beta\gamma}$ y del receptor e interactúe con una proteína efectora (véase la Fig. 15-17).

• Los experimentos de transferencia de energía fluorescente demuestran la disociación mediada por receptor de las subunidades G_{α} y $G_{\beta\gamma}$ en células vivas (véase la Fig. 15-18).

• Las proteínas efectoras activadas (o inactivadas) por proteínas G triméricas son enzimas que forman segundos mensajeros (p. ej., adenilciclase, fosfolipasa C) o canales de iones (véase el Cuadro 15-1). En cada caso, es la subunidad G_{α} la que determina la función de la proteína G y permite su especificidad.

15.4 Receptores acoplados a proteína G que regulan los canales iónicos

Una de las respuestas celulares más simples a una señal es la apertura de canales iónicos esenciales para la transmisión de los impulsos nerviosos. Estos son fundamentales para la percepción sensorial de los estímulos ambientales como la luz y los olores, la transmisión de información hacia y desde el cerebro, y para la estimulación del movimiento muscular. Durante la transmisión de los impulsos nerviosos, la apertura y cierre de canales de iones produce cambios en el potencial de membrana. Muchos receptores de neurotransmisores son canales de iones regulados por ligando que se abren en respuesta a la unión de un ligando. Tales receptores incluyen algunos tipos de receptores de glutamato, serotonina y acetilcolina, incluyendo los receptores de acetilcolina que se encuentran en las sinapsis músculo-nervio. Los canales de iones regulados por ligando que funcionan como receptores de neurotransmisores se tratan en el Capítulo 22.

Sin embargo, muchos receptores de neurotransmisores son receptores acoplados a proteína G cuyas proteínas efectoras son canales de Na^+ o K^+ . Los neurotransmisores que se unen a estos receptores causan que el canal iónico asociado se abra o se cierre, lo que lleva a cambios en el potencial de membrana. Aun así, otros receptores de neurotransmisores, como así también receptores de olor en la nariz y fotorreceptores en el ojo, son receptores acoplados a proteína G que indirectamente modulan la actividad de los canales iónicos a través de la acción de segundos mensajeros. En esta sección, se consideran dos receptores acoplados a proteína G que ilustran los mecanismos directo e indirecto para la regulación de los canales de iones: el receptor muscarínico de acetilcolina del corazón y la proteína rodopsina activada por luz en el ojo.

Los receptores de acetilcolina en el músculo cardíaco activan una proteína G que abre los canales de K^+

Los receptores muscarínicos para la acetilcolina son un tipo de GPCR que se encuentra en el músculo cardíaco. Cuando se activan, estos receptores disminuyen la velocidad de la contracción

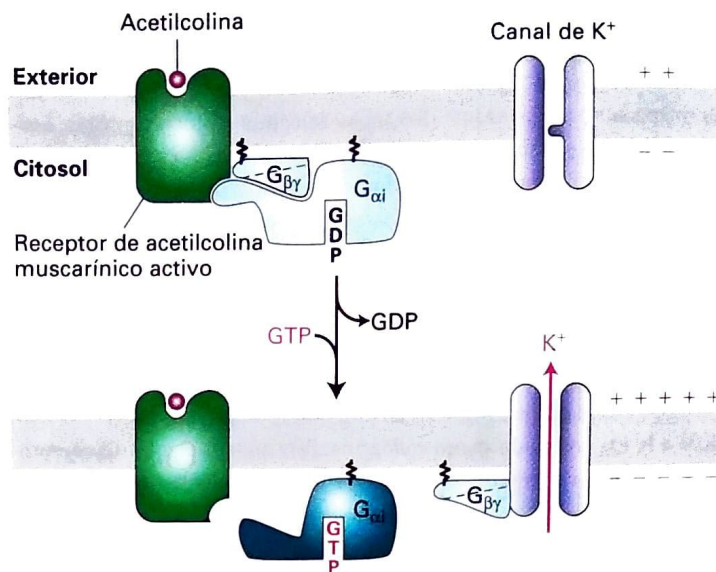


FIGURA 15-20 Activación del receptor muscarínico de acetilcolina y su canal de K^+ efector en el músculo cardíaco. La unión de acetilcolina desencadena la activación de la subunidad G_{α} y su disociación de la subunidad $G_{\beta\gamma}$ en la forma usual (véase la Fig. 15-17). En este caso, la subunidad $G_{\beta\gamma}$ liberada (en lugar de $G_{\alpha} \cdot GTP$) se une a la proteína efectora asociada, un canal de K^+ , y la abre. El aumento en la permeabilidad del K^+ hiperpolariza la membrana, lo cual reduce la frecuencia de contracción del músculo cardíaco. Aunque aquí no se muestra, la activación termina cuando el GTP unido a G_{α} es hidrolizado (por una enzima GAP que es una parte intrínseca de la subunidad G_{α}) al GDP y $G_{\alpha} \cdot GDP$ se recombina con $G_{\beta\gamma}$ (Véase K. Ho y cols., 1993, *Nature* **362**:31, e Y. Kubo y cols., 1993, *Nature* **362**:127).

muscular. Debido a que la muscarina, un análogo de la acetilcolina, también activa estos receptores, estos últimos se denominan “muscarínicos.” Dicho tipo de receptor de acetilcolina está acoplado a una subunidad G_{α} , y la unión de ligando lleva a la apertura de los canales de K^+ asociados (la proteína efectora) en la membrana plasmática (Fig. 15-20). El flujo de salida subsiguiente de iones K^+ a partir del citosol causa un aumento en la magnitud del habitual potencial interior negativo a través de la membrana plasmática que dura varios segundos. Este estado de la membrana, llamado **hiperpolarización**, reduce la frecuencia de la contracción muscular. Es posible demostrar experimentalmente este efecto mediante la adición de acetilcolina a las células de músculo cardíaco aislado y por la medición del potencial de membrana utilizando un microelectrodo insertado en la célula (véase la Fig. 11-19).

Como se muestra en la Figura 15-20, la señal de los receptores muscarínicos es traducida a la proteína canal efectora mediante la subunidad $G_{\beta\gamma}$ liberada por el $G_{\alpha} \cdot GTP$. $G_{\beta\gamma}$ activa directamente el canal de K^+ ; esto fue demostrado mediante experimentos de pinzamiento de micromembrana (*patch-clamping*), que pueden medir el flujo de iones a través de un único canal de iones en una zona diminuta de membrana (véase la Fig. 11-22). Cuando la proteína purificada $G_{\beta\gamma}$ se añadió al lado citosólico de una microzona de membrana plasmática de músculo cardíaco, los canales de K^+ se abrieron de inmediato, incluso en ausencia de acetilcolina u otros neurotransmisores lo cual indica claramente que es la proteína $G_{\beta\gamma}$ la responsable de la apertura de los canales de K^+ efectoras y no $G_{\alpha} \cdot GTP$.

La luz activa las rodopsinas acopladas a proteína G en las células bastones del ojo

La retina humana contiene dos tipos de células fotorreceptoras, *bastones* y *conos*, que son los receptores primarios de la estimulación visual. Los conos están involucrados en la visión de los colores, mientras que los bastones son estimulados por luz débil como la de luna en un intervalo de longitudes de onda. Las células fotorreceptoras forman sinapsis capa sobre capa de interneuronas que están invadidas por diferentes combinaciones de células fotorreceptoras. Todas estas señales son procesadas e interpretadas por la parte del cerebro que se denomina *corteza visual*.

Las células bastones detectan la luz con la adición de un GPCR sensible a la luz conocido como *rodopsina*. Esta consiste en proteína opsina, que tiene la estructura GPCR usual, unida covalentemente a un pig-

mento que absorbe luz llamado retinal. La rodopsina, que se encuentra solo en las células bastones, se localiza en los 1 000 o menos discos de membrana aplanada que constituyen el segmento más externo de estas células con forma de bastón (Fig. 15-21). Una célula bastón humana contiene alrededor de 4×10^7 moléculas de rodopsina. La proteína G trimérica acoplada a la rodopsina, llamada *transducina* (G_t), contiene una unidad de G_α conocida como $G_{\alpha t}$; al igual que la rodopsina, $G_{\alpha t}$ se encuentra solo en las células bastón.

La rodopsina difiere de otros GPCR en que la unión de un ligando no es lo que activa al receptor. Más bien, la absorción de un fotón de luz por el retinal unido es la señal de activación. Con la absorción de un fotón, el resto retinal de la rodopsina es convertido de inmediato de la forma *cis* (conocida como 11-*cis*-retinal) al isómero *all-trans*, lo que causa un cambio conformacional en la proteína opsina (Fig. 15-22). Esto es equivalente al cambio conformacional de activación que se pro-

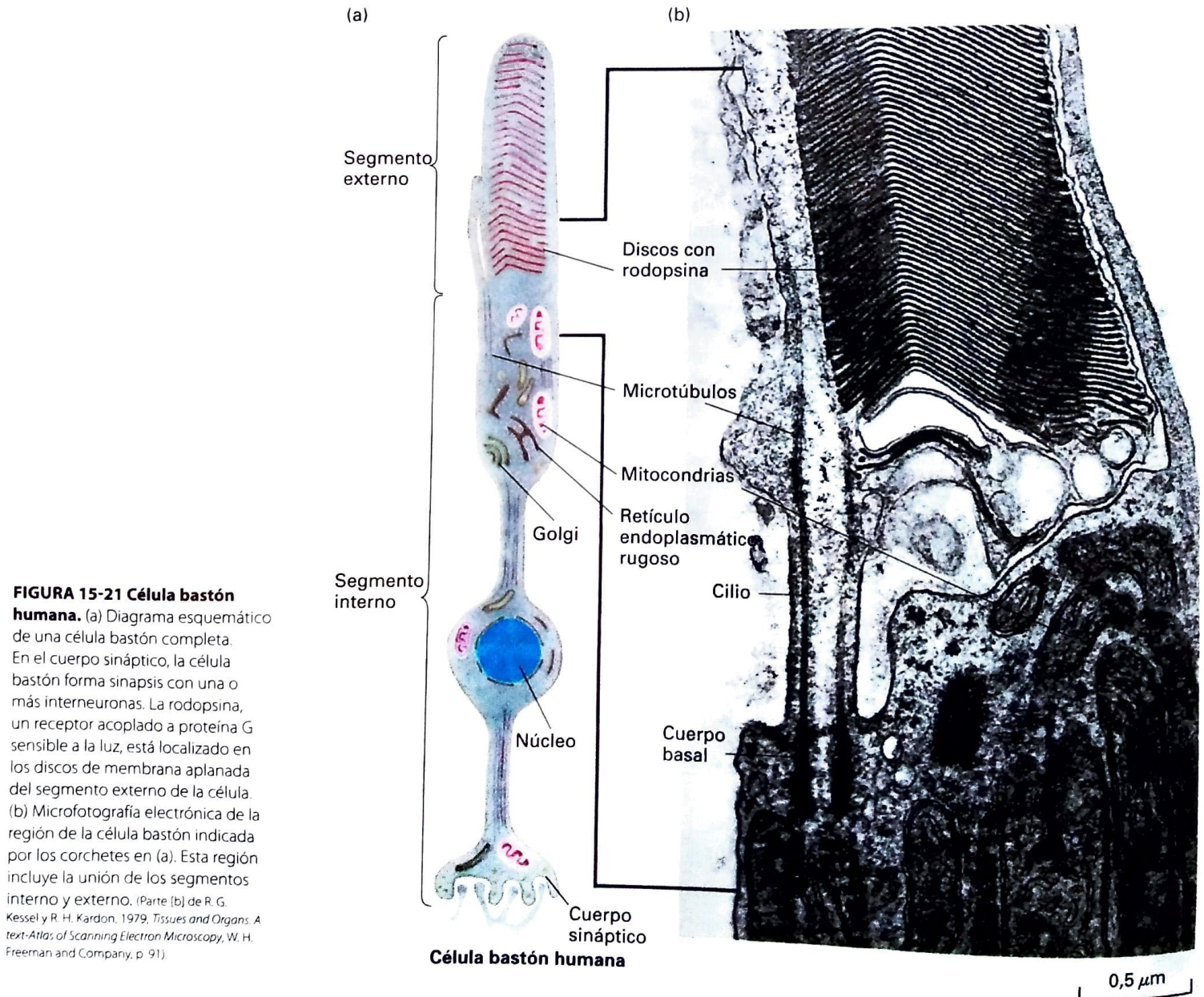


FIGURA 15-21 Célula bastón humana. (a) Diagrama esquemático de una célula bastón completa. En el cuerpo sináptico, la célula bastón forma sinapsis con una o más interneuronas. La rodopsina, un receptor acoplado a proteína G sensible a la luz, está localizado en los discos de membrana aplanada del segmento externo de la célula. (b) Microfotografía electrónica de la región de la célula bastón indicada por los corchetes en (a). Esta región incluye la unión de los segmentos interno y externo. (Parte [b] de R. G. Kessel y R. H. Kardon, 1979, *Tissues and Organs: A text-Atlas of Scanning Electron Microscopy*, W. H. Freeman and Company, p. 91).

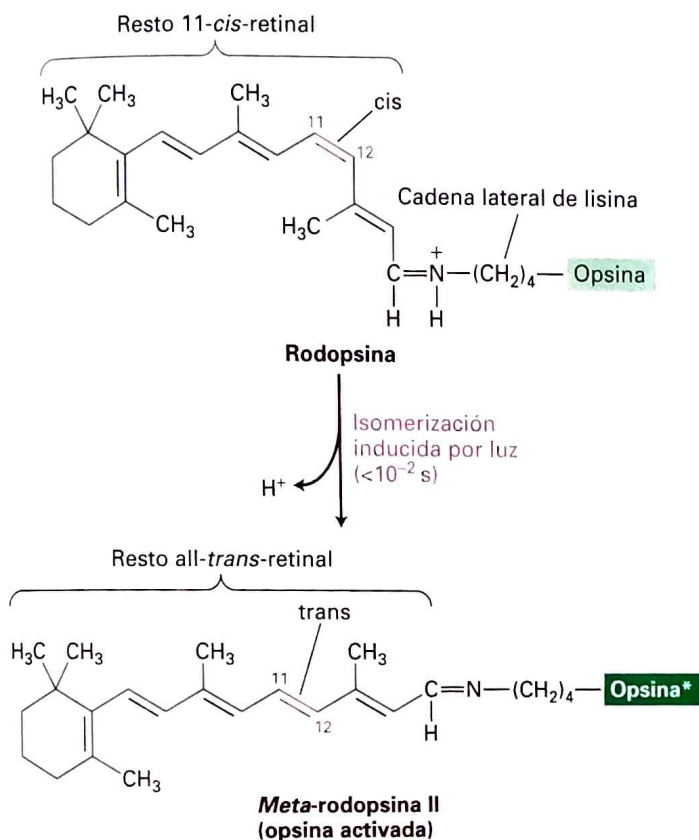


FIGURA 15-22 Paso desencadenado en la visión por la luz. El pigmento que absorbe luz 11-*cis*-retinal se une covalentemente al grupo amino de un residuo de lisina en la opsina, la parte proteica de la rodopsina. La absorción de luz causa una fotoisomerización rápida del isómero *cis*-retinal a *all-trans*-retinal. Esto desencadena un cambio conformacional en la proteína opsina y se forma el intermediario inestable *meta*-rodopsina II, u opsina activada (véase la Fig. 15-23), que activa las proteínas G_i . Dentro de los segundos, *all-trans*-retinal se disocia de la opsina y es convertido por una enzima nuevamente al isómero *cis*, que luego se vuelve a unir a otra molécula de opsina. (Véase J. Nathans, 1992.

Biochemistry 31:4923.)

duce con la unión del ligando por otros receptores acoplados a proteína G; dicho cambio permite a la rodopsina unirse a la subunidad G_{ai} adyacente de la proteína G acoplada, lo cual desencadena el intercambio de GTP por GDP. La rodopsina activada, R^* , es inestable y se disocia espontáneamente a sus partes componentes; así, libera la opsina adherida covalentemente, que no puede unirse más a una subunidad G_{ai} y *all-trans*-retinal, lo que de este modo termina la señalización visual. En la oscuridad, el *all-trans*-retinal libre es convertido otra vez a la forma 11-*cis*-retinal, que luego puede volver a unirse a opsina y formar nuevamente rodopsina.

La activación de la rodopsina por la luz lleva al cierre de los canales de cationes regulados por cGMP

En la oscuridad, el potencial de membrana de una célula bastón es de alrededor de -30 mV, considerablemente menor que el potencial de reposo (-60 a -90 mV) típico de neuronas y otras células eléctricamente activas. Este estado de la membrana, llamado **despolarización**, causa que en la oscuridad las células bastones secreten de manera constante neurotransmisores; por lo tanto, las neuronas con las cuales forman sin-

napsis están continuamente estimuladas. El estado de despolarización de la membrana plasmática de las células bastón en reposo se debe a la presencia de una gran cantidad de canales iónicos *no selectivos* abiertos que admiten Na^+ y Ca^{2+} ; recuérdese del **Capítulo 11** que el movimiento de los iones cargados positivamente como Na^+ y Ca^{2+} del lado exterior de la célula hacia el interior reducirá la magnitud del potencial de membrana negativo adentro. La absorción de luz por parte de la rodopsina lleva a un cierre de estos canales y causa que el potencial de membrana se torne *más* negativo adentro.

Cuanto más fotones absorba la rodopsina, más canales estarán cerrados, menos iones Na^+ y Ca^{2+} cruzarán la membrana desde el exterior, más negativo se tornará el potencial de membrana y se liberarán menos neurotransmisores. La reducción en la liberación de neurotransmisores es transmitida hacia el cerebro por una serie de neuronas, donde es percibida como luz.

A diferencia del receptor muscarínico de acetilcolina analizado anteriormente, las proteínas G activadas por rodopsina no actúan directamente sobre canales de iones. El cierre de los canales catiónicos en la membrana plasmática de la célula bastón requiere cambios en la concentración del segundo mensajero **GMP cíclico**, o **cGMP** (véase la Fig. 15-18). Segmentos externos en la célula bastón contienen una concentración inusualmente elevada ($\sim 0,07$ mM) de cGMP, que se forma de manera continua a partir de GTP en una reacción catalizada por guanilciclase. Sin embargo, la absorción de luz por parte de la rodopsina induce la activación de *cGMP fosfodiesterasa* (*PDE*), que hidroliza cGMP a 5'-GMP. Como resultado, la concentración de cGMP disminuye con la iluminación. La alta concentración de cGMP presente en la oscuridad actúa para mantener abiertos los *canales de cationes regulados por cGMP*; la disminución en cGMP inducida por la luz lleva al cierre de canales, hiperpolarización de membrana y liberación reducida de neurotransmisores.

Como se describe en la **Figura 15-23**, la cGMP fosfodiesterasa es la proteína efectora para G_{ai} , y ambas se localizan en la membrana disco de la célula bastón. El complejo $G_{ai} \cdot GTP$ libre que es generado después de la absorción de luz por parte de la rodopsina se une a las dos subunidades α y β inhibitorias de la cGMP fosfodiesterasa y libera las subunidades catalíticas α y β , que luego convierten el cGMP a GMP. Esto es un claro ejemplo de cómo la eliminación inducida por la señal de un inhibidor puede rápidamente activar una enzima, un mecanismo común en las vías de señalización. A su vez, la concentración disminuida de cGMP lleva al cierre del canal iónico regulado por cGMP en la membrana plasmática de la célula bastón, lo que reduce así la liberación de neurotransmisor.

Se ha obtenido evidencia directa para la función del cGMP en la actividad de la célula bastón en estudios de pinzamiento o fijación de micromembrana (*patch-clamping*) al utilizar microzonas aisladas de membrana plasmática del segmento externo, que contiene abundantes canales iónicos regulados por cGMP. Cuando se añade cGMP a la superficie citosólica de estas microzonas, existe un rápido incremento en el número de canales de iones abiertos; cGMP se une directamente a un sitio sobre la proteína canal para mantenerlos abiertos. Al igual que con los canales de K^+ analizados en el **Capítulo 11**, la proteína canal regulada por cGMP contiene cuatro subunidades (véase la Fig. 11-20). En este caso, cada una de las subunidades es capaz de unirse a una molécula de cGMP. Tres o cuatro moléculas de cGMP deben unirse por canal para poder abrirlo; esta interacción alostérica torna a la apertura del canal muy sensible a los cambios en las concentraciones de cGMP.

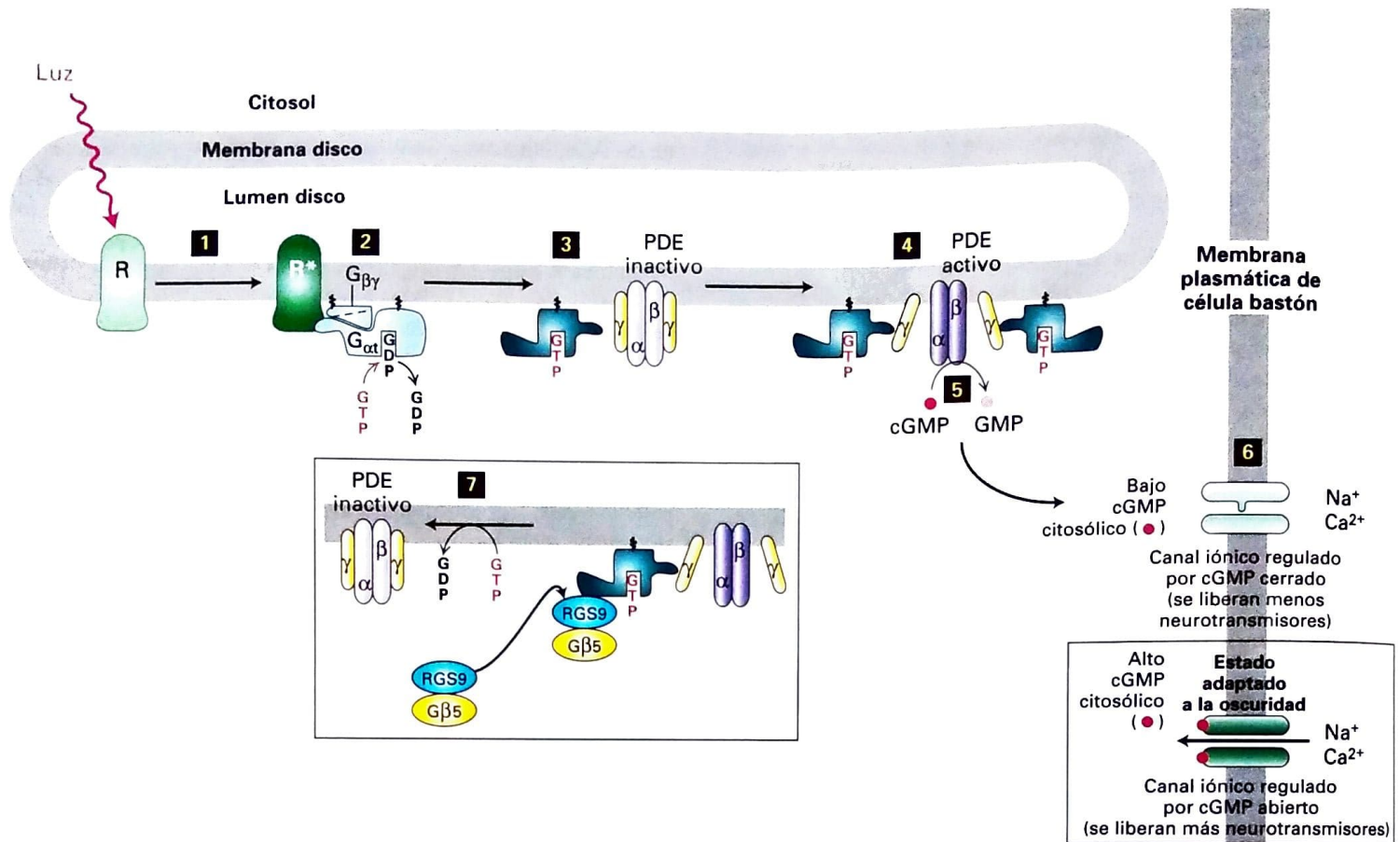


FIGURA 15-23 La vía de rodopsina activada por luz y el cierre de los canales de cationes en las células bastón. En las células bastón adaptadas a la oscuridad, una concentración alta de cGMP mantiene abierto los canales de cationes no selectivos regulados por nucleótido y lleva a la despolarización de la membrana plasmática y a la liberación del neurotransmisor. La absorción de luz genera rodopsina activada, R* (paso 1), que se une a la proteína G_α con GDP unido y media el reemplazo de GDP por GTP (paso 2). La G_α·GTP libre generada luego activa la cGMP fosfodiesterasa (PDE) mediante unión a sus subunidades γ inhibitorias (paso 3) y disociándolas de las subunidades catalíticas α y β (paso 4). Liberadas de su inhibición, las subunidades α y β

de la PDE hidrolizan cGMP a GMP (paso 5). La disminución resultante en el cGMP citosólico lleva a la disociación de cGMP de sus canales regulados por nucleótido en la membrana plasmática y al cierre de los canales (paso 6). La membrana luego se torna transitoriamente hiperpolarizada, y el neurotransmisor liberado es reducido. El complejo de G_α·GTP y las subunidades γ de PDE se unen al complejo de activación GTPasa llamado RGS9-Gβ5 (paso 7); mediante hidrólisis del GTP unido, esto desencadena la inactivación fisiológicamente rápida de la fosfodiesterasa. (Adaptado de V. Arshavsky y E. Pugh, 1998, *Neuron* 20:11, y V. Arshavsky, 2002, *Trends Neurosci.* 25:124.)

La conversión de G_α·GTP activo de regreso a G_α·GDP es acelerada por una proteína de activación de GTPasa (GAP) específica. En los mamíferos, por lo general G_α permanece en el estado activo con GTP unido durante solo una fracción de segundo. Así, la cGMP fosfodiesterasa se torna inactiva con rapidez, y la concentración de cGMP gradualmente se eleva a su concentración original cuando se elimina el estímulo de luz. Esto permite respuestas rápidas del ojo hacia el movimiento de los objetos que cambian.

La amplificación de señal torna sumamente sensible la vía de transducción de señal de la rodopsina

Notablemente, un único fotón absorbido por una célula bastón en reposo produce una respuesta medible, un cambio más negativo en el interior negativo en el potencial de membrana de alrededor de 1 mV, que en los anfibios dura uno o dos segundos. Los seres humanos son capaces de detectar un destello de apenas cinco fotones. El sistema de

detección de luz es tan sensible debido a que la señal es amplificada en gran medida durante la vía de transducción de señal. Cada opsina activada en la membrana disco de la célula bastón puede activar 500 moléculas G_α, cada una de las cuales a su vez activa una cGMP fosfodiesterasa. Cada molécula de fosfodiesterasa hidroliza cientos de moléculas cGMP durante la fracción del segundo que permanece activa. Por lo tanto, la absorbancia de un único fotón (con producción de una molécula de opsina activada) puede desencadenar el cierre de cientos de canales de iones en la membrana plasmática y un cambio medible en el potencial de membrana de la célula.

La terminación rápida de la vía de transducción de señal de rodopsina es esencial para la visión aguda

Al igual que en todas las vías de transducción de la señal acoplada a proteína G, la terminación oportuna de la vía de señalización de la rodopsina requiere que todos los intermediarios activados sean

activados rápidamente a fin de restaurar el sistema a su estado basal, listo para una nueva señalización. Así, las tres proteínas intermedias, rodopsina activada (R^*), $G_{\alpha} \cdot \text{GTP}$ y cGMP fosfodiesterasa (PDE), deben ser inactivadas, y la concentración citoplasmática del mensajero cGMP debe ser restaurada a su concentración en oscuridad mediante la adenilciclase. Durante una respuesta de un único fotón de una célula bastón de mamífero, el proceso completo de activación e inactivación de rodopsina se completa dentro de los ~ 50 milisegundos, lo que permite al ojo detectar movimientos rápidos u otros cambios en los objetos a nuestro alrededor. Diversos mecanismos actúan en conjunto para tornar posible esta respuesta muy rápida.

Proteínas GAP que inactivan $G_{\alpha} \cdot \text{GTP}$ El complejo de la subunidad inhibitoria y fosfodiesterasa y $G_{\alpha} \cdot \text{GTP}$ recluta un complejo de dos proteínas, RGS9 y G β 5, que juntas actúan como una proteína GAP e hidrolizan el GTP unido a GDP. Esto libera la subunidad y inhibitoria y termina la activación fosfodiesterasa. Los experimentos con ratones que tienen inactivado el gen RGS9 demuestran que esta proteína es esencial para la inactivación normal de la cascada in vivo. En las células de bastón murinas, el tiempo de recuperación de un único destello aumenta del valor normal de 0,2 s a alrededor de 9 s en el mutante, un incremento de 45 veces, lo que demuestra la importancia de esta proteína GAP.

Proteínas sensibles al Ca^{2+} que activan la guanilato ciclasa El cierre desencadenado por la luz de los canales de Na^+ y Ca^{2+} regulados por cGMP causará una caída en la concentración citosólica de Ca^{2+} ,

puesto que el Ca^{2+} es bombeado de forma continua fuera de la célula independientemente del estado de estos canales. La caída de Ca^{2+} intracelular es detectada por las proteínas de unión a Ca^{2+} llamadas proteínas de activación de guanilato ciclasa, o GCAP. Esto produce una estimulación rápida de la síntesis de cGMP por la guanilato ciclasa, lo que causa que los canales de iones vuelvan a abrirse.

Fosforilación de la rodopsina y unión de la arrestina Un proceso importante que modula en forma negativa y termina la respuesta visual involucra la fosforilación de la rodopsina en su conformación activa (R^*) pero no en su forma inactiva, o forma oscura (R), por parte de la *rodopsina-cinasa* (Fig.15-24), un miembro de una clase de GPCR cinasas. Cada molécula de opsina tiene tres sitios principales de fosforilación de serina sobre su segmento C4 C-terminal que mira hacia el citosol; cuanto más sitios son fosforilados, menos capaz es R^* de activar G_{α} ; por lo tanto, induce el cierre de los canales catiónicos regulados por GMP. La proteína *arrestina* se une a tres residuos de serina fosforilados sobre el segmento opsina C-terminal. La arrestina unida evita por completo la interacción de G_{α} con R^* fosforilada, bloquea totalmente la formación del complejo $G_{\alpha} \cdot \text{GTP}$ activo y detiene la activación adicional de la fosfodiesterasa cGMP. Durante una respuesta de un solo fotón de una célula bastón de mamífero, el proceso entero de múltiple fosforilación de rodopsina y unión de arrestina se completa dentro de los ~ 50 milisegundos. Los fosfatos unidos a la rodopsina son eliminados continuamente por parte de enzimas fosfodiesterasas, y esto causa la disociación de arrestina y una rápida restauración de rodopsina a su estado original, nativo.

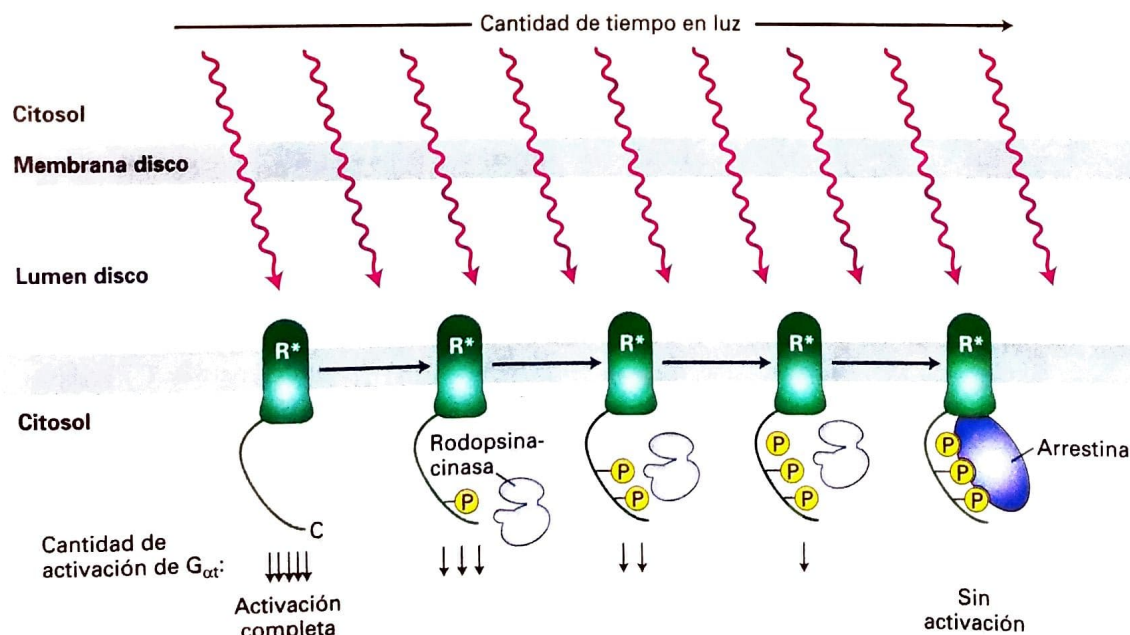


FIGURA 15-24 Inhibición de la señalización de rodopsina por la rodopsina-cinasa. La rodopsina activada por luz (R^*), pero no la rodopsina adaptada a oscuridad, es un sustrato para la rodopsina-cinasa. La cantidad de la fosforilación de la rodopsina es proporcional a la cantidad de tiempo que cada molécula de rodopsina pasa en la forma activada por luz y reduce la

capacidad de la R^* para activar la transducina. La arrestina se une a la opsina completamente fosforilada y forma un complejo que no puede activar la transducina en absoluto. (Véase A. Mendez y cols., 2000, *Neuron* **28**:153, y V. Arshavsky, 2002, *Trends Neurosci.* **25**:124.)

Las células bastón se adaptan a las concentraciones variables de luz ambiental mediante tráfico intracelular de arrestina y transducina

Las células conos son insensibles a niveles bajos de iluminación, y la actividad de las células bastón es inhibida a niveles altos de luz. Así, cuando nos movemos de la luz del día a una habitación tenuemente iluminada, en un inicio quedamos cegados. Lentamente, sin embargo, las células bastón se tornan sensibles a la luz tenue y se distinguen objetos. Durante este intervalo, en la célula bastón “aparece” su sensibilidad a los destellos de luz, o contraste. A través de este proceso de *adaptación visual*, una célula bastón puede percibir el contraste en un rango de

100 000 veces los niveles de luz ambiental, desde luz muy tenue hasta luz solar brillante. Este amplio rango de sensibilidad es posible debido a que diferencias en los niveles de luz en el campo visual, en lugar de en la cantidad absoluta de luz absorbida, son en última instancia percibidos por el cerebro y utilizados para formar imágenes visuales. Un mecanismo para la regulación dependiendo de luz de la vía de señalización de la rodopsina que involucra el tráfico subcelular de dos proteínas clave de transducción de la señal (Fig. 15-25) es responsable para este rango de sensibilidad extraordinariamente amplio.

En las células bastón adaptadas a la oscuridad, ~ 80 al 90% de las subunidades G_{at} y G_{ay} están en los segmentos externos, mientras que menos del 10% de arrestina se localiza allí (Fig. 15-25). Esto permite la activación máxima de la cGMP fosfodiesterasa efectora corriente abajo y, por lo tanto, sensibilidad máxima a cambios pequeños en la luz. Pero la exposición durante 10 minutos a intensidades de luz diurna moderada causa una redistribución completa de estas proteínas: más del 80% de las subunidades G_{at} y G_{ay} se mueven fuera del segmento externo hacia otras partes de la célula mientras que más del 80% del inhibidor arrestina se mueve hacia el segmento externo. Aún se desconoce el mecanismo por el cual estas proteínas se mueven, pero probablemente involucra motores adheridos a microtúbulos que mueven proteínas adheridas y partículas hacia adentro y hacia afuera (véase el Capítulo 18). La reducción en G_{at} y G_{ay} en el segmento externo significa que las proteínas G_{at} son físicamente incapaces de unir rodopsina activada y, por lo tanto, de activar cGMP fosfodiesterasa. Al mismo tiempo, el aumento en arrestina en el segmento externo significa que cualquier rodopsina activada se inactivará más rápidamente. Juntos, la caída en la transducina y el aumento en la arrestina reducen en gran medida la capacidad de pequeños incrementos en los niveles de luz de activar la cGMP fosfodiesterasa efectora corriente abajo; por ende, solo grandes cantidades de niveles de luz serán detectadas por las células bastón. Estos movimientos de proteínas se invierten cuando la luz ambiental disminuye.

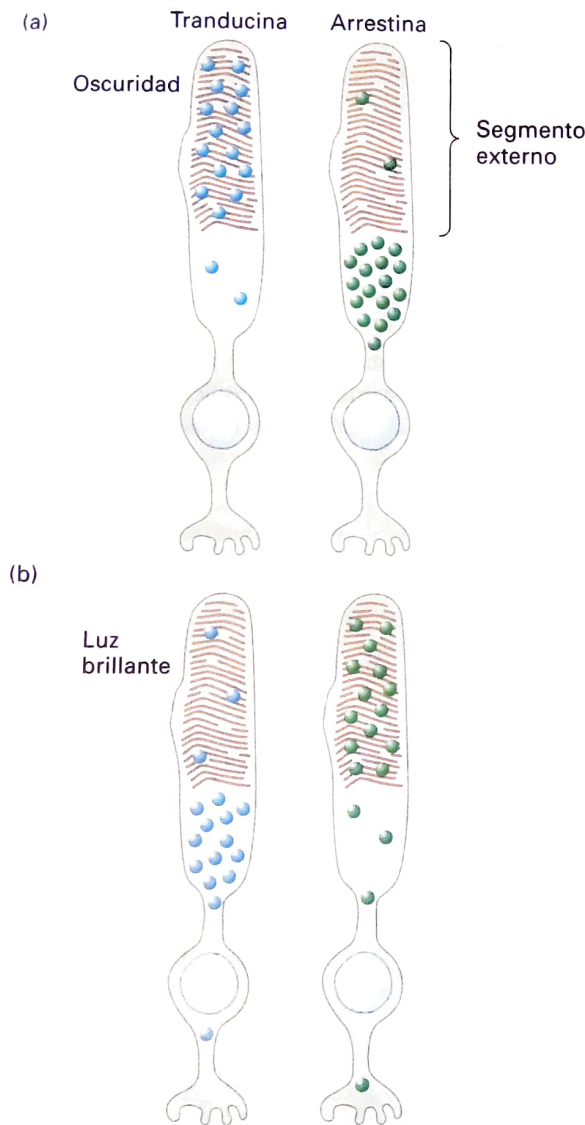


FIGURA 15-25 Ilustración esquemática de la distribución de transducina y arrestina en las células bastón adaptadas a oscuridad y adaptadas a luz. (a) En la oscuridad, la mayoría de la transducina se localiza en el segmento externo, mientras que la mayoría de la arrestina se encuentra en otras partes de la célula; en esta condición, la visión es más sensible a niveles de luz muy bajos. (b) Con luz brillante, poca transducina se encuentra en el segmento externo y abundante arrestina se encuentra allí; en esta condición, la visión es relativamente insensible a cambios pequeños en la luz.

El movimiento coordinado de estas proteínas contribuye a nuestra capacidad para percibir imágenes en un rango de 100 000 veces los niveles de luz ambiental. (De P. Calvert y cols., 2006, *Trends Cell Biol.* 16:560.)

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 15.4

Receptores acoplados a proteína G que regulan los canales iónicos

- El receptor cardíaco muscarínico de acetilcolina es un GPCR cuya proteína efectora es un canal de K^+ . La activación del receptor libera la subunidad $G_{\beta\gamma}$, que se une al canal de K^+ y lo abre (véase la Fig. 15-20). La hiperpolarización resultante de la membrana celular disminuye la velocidad de contracción del músculo cardíaco.
- La rodopsina, el GPCR fotosensible en las células bastón, compromete a la proteína opsina unida al 11-*cis*-retinal. La isomerización del resto 11-*cis*-retinal produce opsina activada, que luego activa a la proteína G trimérica acoplada transducina (G_t) al catalizar el intercambio de GTP libre por GDP unido a la subunidad G_{at} (véanse las Figs. 15-22 y 15-23).
- La proteína efectora en la vía de la rodopsina es la fosfodiesterasa cGMP, que es activada por la liberación mediada por $G_{at} \cdot GTP$ de las subunidades inhibitorias. La reducción en la concentración de cGMP por esta enzima lleva al cierre de los canales Na^+/Ca^{2+} regulados por

cGMP, hiperpolarización de la membrana y liberación disminuida de neurotransmisores (véase la Fig. 15-23).

- Varios mecanismos actúan para terminar la señalización visual: proteínas GAP inactivan $G_{\alpha} \cdot GTP$, las proteínas sensibles al Ca^{2+} activan la guanilato ciclasa y la fosforilación de la rodopsina y la unión de arrestina inhibe la activación de la transducción.

- La adaptación a un amplio espectro de niveles de luz está mediada por movimientos de transducción y de arrestina hacia adentro y hacia afuera de los segmentos externos de la célula bastón, que juntos modulan la capacidad de incrementos pequeños en los niveles de luz para activar la cGMP fosfodiesterasa efectora puesta abajo y, por lo tanto, la sensibilidad de la célula bastón a diferentes ambientes de luz.

15.5 Receptores acoplados a proteína G que activan o inhiben la adenilciclase

Las vías GPCR que utilizan **adenilciclase** como una proteína efectora y cAMP como el segundo mensajero se encuentran en la mayoría de las células de mamífero, donde regulan funciones celulares tan diversas como el metabolismo de grasas y azúcares, la síntesis y secreción de hormonas y la contracción muscular. Estas vías siguen el mecanismo GPCR general descrito en la Figura 15-17; la unión del ligando al receptor activa una proteína G trimérica acoplada que activa una proteína efectora, en este caso, la adenilciclase sintetiza el segundo mensajero difusible cAMP, partir de ATP (Fig. 15-26). A su vez, el cAMP activa una proteinquinasa dependiente de cAMP que fosforila proteínas diana específicas.

Para explorar esta vía GPCR/cAMP, nos fijamos en la primera de tales vías descubiertas: la generación de glucosa-1-fosfato estimulada por hormona a partir de **glucógeno**, un polímero de almacenamiento de glucosa. La degradación de glucógeno (*glucólisis*) se produce en las células musculares y hepáticas en respuesta a las hormonas como la adrenalina y el glucagón y es una vía principal por la cual las células disponen de glucosa para sus necesidades energéticas. Este ejemplo demuestra cómo la activación de un GPCR puede estimular la actividad de enzimas intracelulares de un huésped, todas involucradas en una tarea importante desde el punto de vista fisiológico: el metabolismo del glucógeno.

La adenilciclase es estimulada e inhibida por diferentes complejos ligando-receptor

En condiciones donde la demanda de glucosa es grande debido a baja concentración de azúcar en sangre, el **glucagón** es liberado por las células alfa en los islotes pancreáticos; en el caso de un estrés repentino, la adrenalina es liberada por las glándulas suprarrenales. Tanto el glucagón como la adrenalina señalan a las células hepáticas y musculares que despolimericen glucógeno y liberen moléculas de glucosa individuales. En el hígado, el glucagón y la adrenalina se unen a diferentes receptores acoplados a proteína G, pero ambos receptores interactúan con y activan a la misma proteína G_s estimuladora que activa la adenilciclase. Por ende, ambas hormonas inducen las mismas respuestas metabólicas. La activación de la adenilciclase,

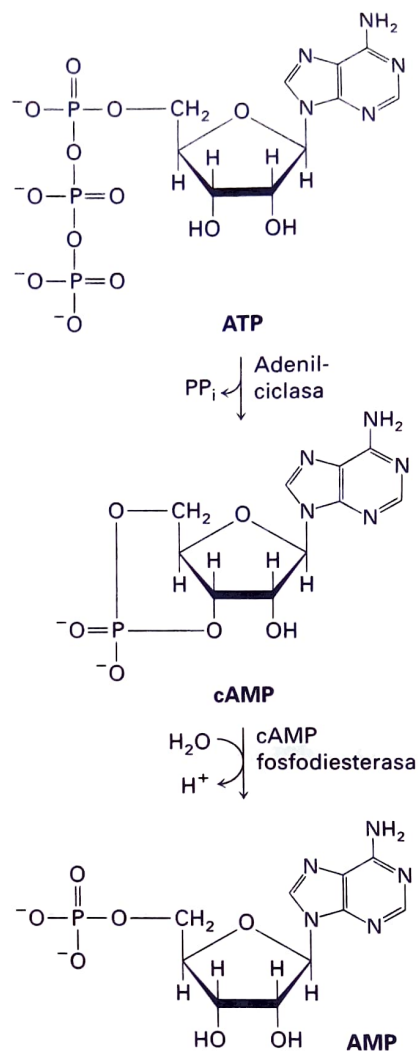


FIGURA 15-26 Síntesis e hidrólisis de cAMP por parte de la adenilciclase y la cAMP fosfodiesterasa. Reacciones similares ocurren para la producción de cGMP a partir de GTP e hidrólisis de cGMP.

y por lo tanto el nivel de cAMP, es proporcional a la concentración total de $G_{\alpha} \cdot GTP$, lo que da como resultado la unión de ambas hormonas a sus receptores respectivos.

La regulación positiva (activación) y negativa (inhibición) de la actividad de la adenilciclase se produce en muchos tipos celulares y proporciona un control minucioso de las concentraciones de cAMP y, por ende, de la respuesta celular corriente abajo (Fig. 15-27). Por ejemplo, en las células adiposas la degradación de los triacilglicérols a ácidos grasos y glicerol (*lipólisis*) es estimulada por la unión de adrenalina, glucagón o hormona adrenocorticotrópica (ACTH) para separar los receptores que activan la adenilciclase. Por el contrario, la unión de dos otras hormonas, prostaglandina E_1 (PGE_1) o adenosina, a sus respectivos receptores acoplados a proteína G inhibe la adenilciclase. Los receptores de prostaglandina y adenosina activan una proteína G_i inhibitoria que contiene las mismas subunidades β y γ que la proteína G_s estimuladora pero una subunidad α diferente ($G_{\alpha i}$). Después de que el complejo $G_{\alpha i} \cdot GTP$ activo se disocia de $G_{\beta\gamma}$ se une a la adenilciclase y la inhibe (en lugar de estimularla), lo cual da como resultado concentraciones más bajas de cAMP.

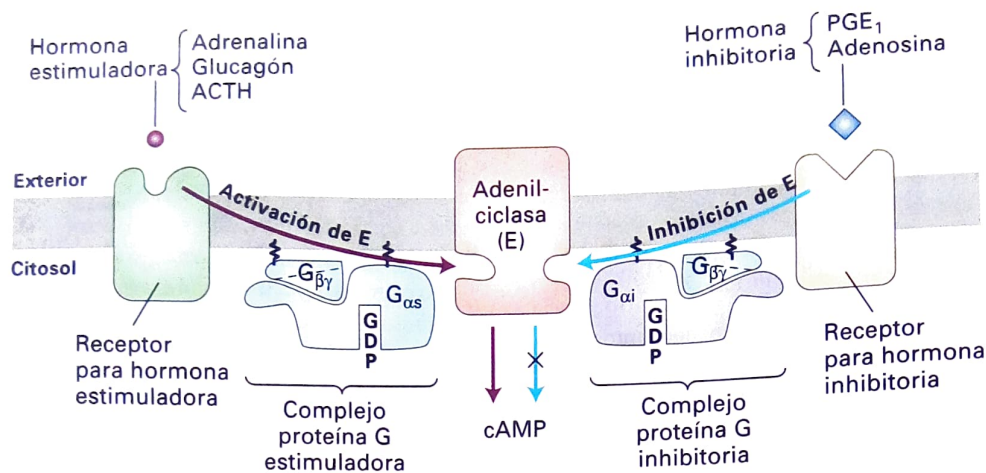


FIGURA 15-27 La activación inducida por hormona y la inhibición de la adenilciclaza en las células adiposas. La unión de ligando a los receptores acoplados a $G_{\alpha s}$ causan la activación de la adenilciclaza, mientras que la unión a los receptores acoplados a $G_{\alpha i}$ causan la inhibición de la enzima. La subunidad $G_{\beta\gamma}$ en ambas proteínas G estimuladora e inhibidora es idéntica; las subunidades G_{α} y sus receptores correspondientes difieren.

La formación estimulada por ligando de los complejos $G_{\alpha s} \cdot GTP$ activo se produce por el mismo mecanismo en ambas proteínas $G_{\alpha s}$ y $G_{\alpha i}$ (véase la Fig. 15-17). Sin embargo, $G_{\alpha s} \cdot GTP$ y $G_{\alpha i} \cdot GTP$ interactúan de forma diferente con la adenilciclaza, de manera tal que una estimula y la otra inhibe su subunidad catalítica. (Véase A. G. Gilman, 1984, *Cell* **36**:577.)

Estudios estructurales establecieron cómo $G_{\alpha s} \cdot GTP$ se une y activa la adenilciclaza

El análisis de cristalografía de rayos X ha identificado las regiones en $G_{\alpha s} \cdot GTP$ que interactúan con la adenilciclaza. Esta enzima es una proteína transmembrana que atraviesa múltiples veces la membrana con dos segmentos citoplasmáticos largos que contienen dominios catalíticos que convierten ATP a cAMP (Fig. 15-28a). Debido a que tales proteínas transmembrana son notablemente difíciles de cristalizar, los científicos prepararon dos fragmentos proteicos que comprenden dos dominios catalíticos de adenilciclaza que se asocian estrechamente entre sí en un heterodímero. Cuando se les permite a estos fragmentos catalíticos asociarse en presencia de $G_{\alpha s} \cdot GTP$ y forskolina (un químico vegetal que se une a la adenilciclaza y la activa), son estabilizados en sus conformaciones activas.

El complejo soluble en agua resultante (dos fragmentos de dominio adenilciclaza/ $G_{\alpha s} \cdot GTP$ /forskolina) tuvo una actividad enzimática de síntesis de cAMP similar a la de la adenilciclaza intacta, de longitud completa. En este complejo, dos regiones de $G_{\alpha s} \cdot GTP$ (la hélice II in-

terruptora y el lazo $\alpha 3$ - $\beta 5$) contactan los fragmentos de adenilciclaza (Fig. 15-28b). Se cree que estos contactos son responsables de la activación de la enzima por parte de $G_{\alpha s} \cdot GTP$. Recuerdese que el interruptor II es uno de los segmentos de una subunidad G_{α} cuya conformación es diferente en los estados GTP unido y GDP unido (véase la Fig. 15-7). La conformación inducida por GTP de G_{α} que favorece su disociación a partir de $G_{\alpha s}$ es precisamente la conformación esencial para la unión de $G_{\alpha s}$ a la adenilciclaza.

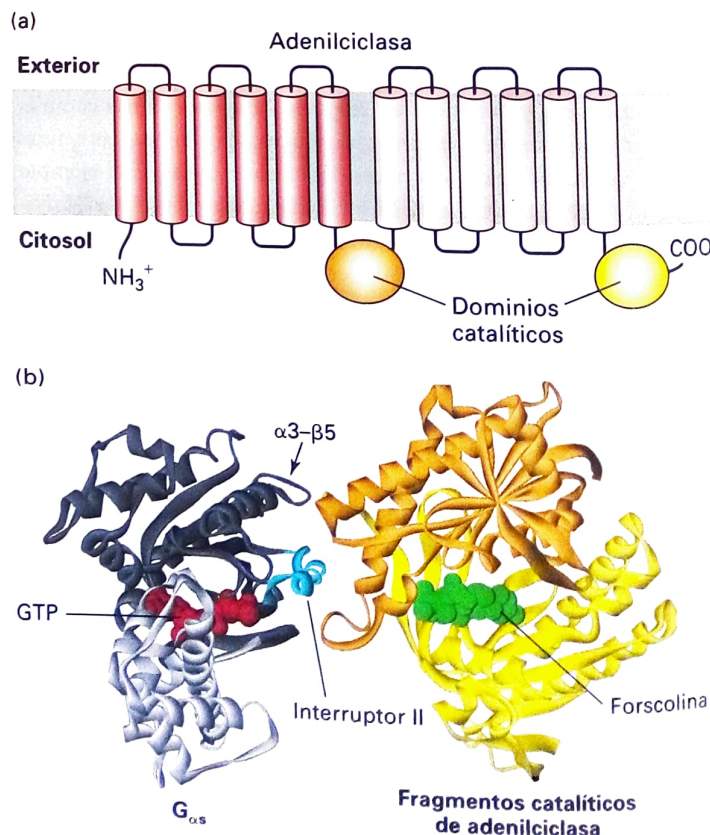


FIGURA 15-28 Estructura de la adenilciclaza y su interacción con $G_{\alpha s} \cdot GTP$.

(a) Diagrama esquemático de la adenilciclaza de mamífero. La enzima unida a membrana contiene dos dominios catalíticos similares, que convierten el ATP a cAMP, sobre una de las caras citosólicas de la membrana, y dos dominios integrales de membrana, cada uno de los cuales se cree que contiene seis hélices transmembranas. (b) Modelo de la estructura tridimensional de $G_{\alpha s} \cdot GTP$ en complejo con dos fragmentos que comprenden uno de los dominios catalíticos de la adenilciclaza determinada por cristalografía de rayos X. El lazo $\alpha 3$ - $\beta 5$ (gris) y la hélice en la región del interruptor II (azul) de $G_{\alpha s} \cdot GTP$ interactúan de manera simultánea con una región específica de la adenilciclaza. La parte coloreada de oscuro de la $G_{\alpha s}$ es el dominio de unión a GTP, que es similar en estructura a Ras (véase la Fig. 15-7); las partes más iluminadas son un dominio helicoidal. Los dos fragmentos de adenilciclaza se muestran en amarillo y anaranjado. La forskolina (verde) bloquea los fragmentos de la adenilciclaza en sus conformaciones activas. [Parte (a), véase W.-J. Tang y A. G. Gilman, 1992, *Cell* **70**:869; parte (b) adaptado de J. J. G. Tesmer y cols., 1997, *Science* **278**:1907.]

El cAMP activa la proteincinasa A mediante liberación de las subunidades inhibitorias

El segundo mensajero cAMP, sintetizado por la adenilciclase, transduce una variedad de señales fisiológicas en diferentes tipos de célula en los animales multicelulares. Virtualmente todos los diversos efectos de cAMP son mediados a través de la activación de la **proteincinasa A (PCA)**, también llamada *proteincinasa dependiente de cAMP*, que fosforila diversas proteínas diana expresadas en diferentes tipos celulares. PCA inactiva es un tetrámero que consiste en dos subunidades reguladoras (R) y dos subunidades catalíticas (C) (Fig. 15-29a). Cada subunidad R se une al sitio activo en un dominio catalítico e inhibe

la actividad de las subunidades catalíticas. A su vez, PCA inactiva es encendida por la unión de cAMP. Cada subunidad R tiene dos sitios de unión a cAMP diferentes, llamados CNB-A y CNB-B (Fig. 15-29b). La unión de cAMP a ambos sitios sobre una subunidad R causa un cambio conformacional en la subunidad R que lleva a liberar la subunidad C asociada, desenmascarar su sitio catalítico y activar así su actividad cinasa (Fig. 15-29c).

La unión de cAMP por una subunidad R de la proteincinasa A se produce de manera cooperativa; es decir, la unión de la primera molécula de cAMP a CNB-B disminuye la K_d para la unión de la segunda cAMP a CNB-A. Así, los cambios en la concentración de cAMP citosólico puede causar cambios proporcionalmente grandes en el número de subunidades C disociadas y, por ende, en la actividad cinasa. La rápida activación de las enzimas por la disociación desencadenada por hormona de un inhibidor es una característica común de muchas vías de señalización.

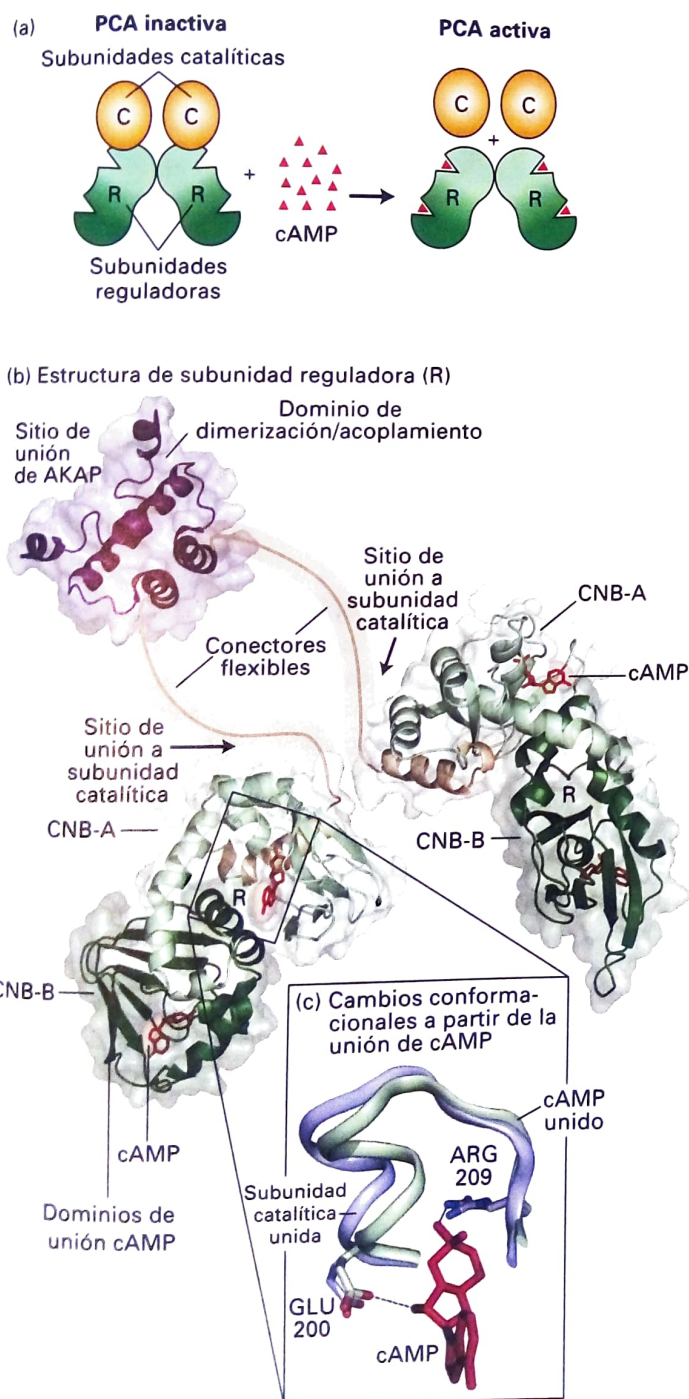
El metabolismo del glucógeno está regulado por la activación inducida por hormona de la proteincinasa A

El glucógeno, un polímero de glucosa grande, es la principal forma de almacenamiento de glucosa en los animales. Al igual que todos los biopolímeros, el glucógeno es sintetizado por un grupo de enzimas y degradado por otro (Fig. 15-30). La degradación de glucógeno, o glucogenólisis, involucra el paso de eliminación de los residuos de glucosa desde un extremo del polímero mediante una reacción de fosforólisis, catalizada por la *glucógeno fosforilasa*, que da glucosa-1-fosfato.

Tanto en las células hepáticas como musculares, la glucosa-1-fosfato producida por el glucógeno es convertida en glucosa-6-fosfato. En las células musculares, este metabolito entra en la vía glucolítica y es metabolizado para generar ATP que se utiliza para impulsar la contracción muscular (véase el Cap. 12). A diferencia de las células musculares, las hepáticas contienen una fosfatasa que hidroliza la glucosa-6-fosfato a glucosa, la cual es exportada a partir de estas células principalmente por un transportador de glucosa (GLUT2) en la membrana plasmática (véase el Cap. 11). Así, el glucógeno almacenado en el hígado es principalmente degradado a glucosa, la cual es liberada de inmediato a la sangre y transportada a otros tejidos, en particular músculos y cerebro, para nutrirlos.

FIGURA 15-29 Estructura de la proteincinasa A (PCA) y su activación por cAMP.

(a) La proteincinasa A (PCA) consiste en dos subunidades (verde) reguladoras (R) y dos subunidades catalíticas (C). Cuando el cAMP (triángulo rojo) se une a la subunidad reguladora, se libera la subunidad catalítica y se activa así la PCA. (b) Las dos subunidades reguladoras forman un dímero, unido por un dominio de dimerización/acoplamiento y un conector flexible al cual puede unirse la proteína de activación de cinasa A (AKAP; véase la Fig. 15-33). Cada subunidad R tiene dos dominios de unión a cAMP, CNB-A y CNB-B, y un sitio de unión para una subunidad catalítica (flecha). (c) La unión de cAMP al dominio CNB-A causa un cambio conformacional sutil que desplaza la subunidad catalítica desde R, y de esta forma la activa. Sin el cAMP unido, un lazo del dominio CNB-A (púrpura) está en una conformación que puede unir la subunidad catalítica (C). Un residuo de glutamato (E200) y uno de arginina (R209) participan en la unión de cAMP (rojo), lo cual causa un cambio conformacional (verde) en el lazo que evita la unión de este a la subunidad C. (Parte [b] de S. S. Taylor y cols., 2005, *Biochem Biophys Acta* 1754:25, parte [c] de C. Kim, N. H. Xuong, y S. S. Taylor, 2005, *Science* 307:690)



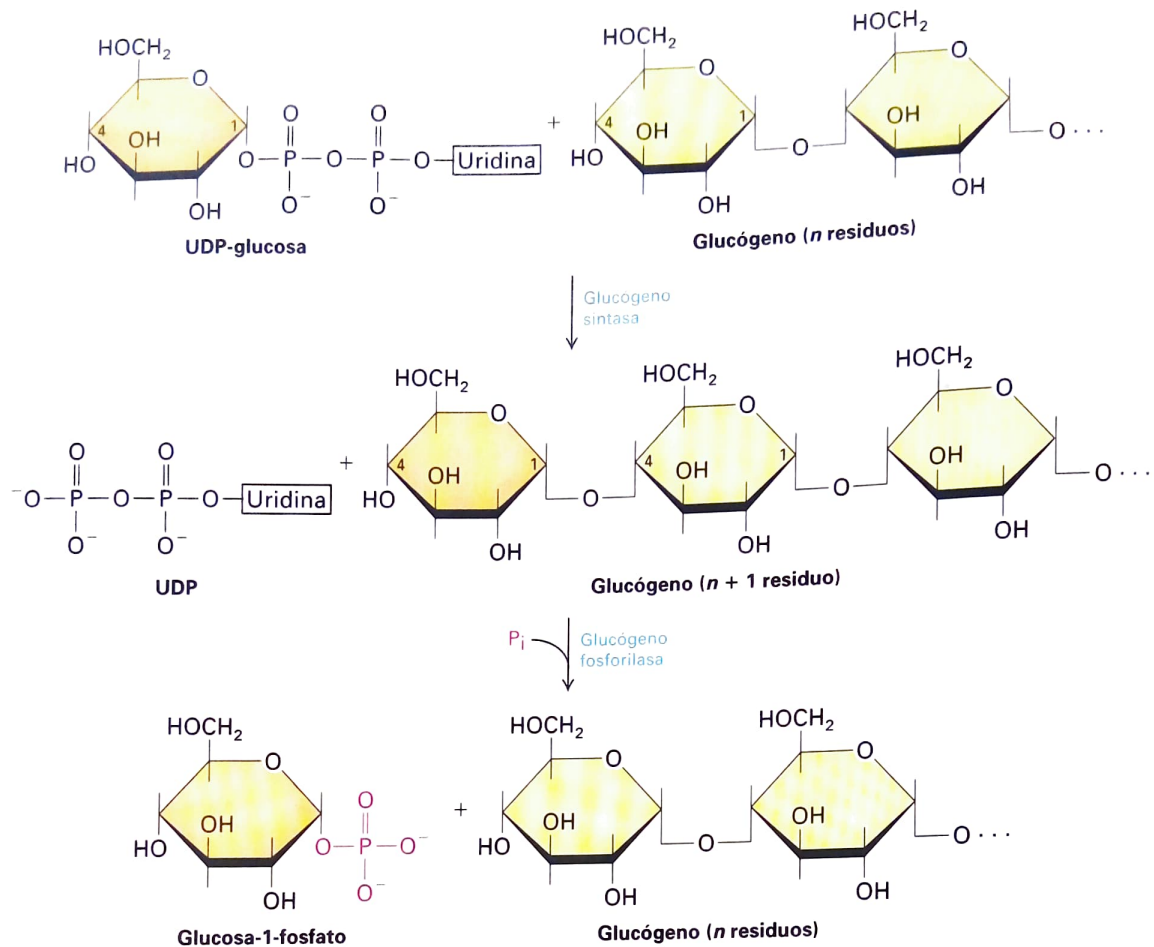


FIGURA 15-30 Síntesis y degradación del glucógeno. La incorporación de glucosa a partir de UDP-glucosa al glucógeno está catalizada por la glucógeno sintasa. La eliminación de unidades glucosa a partir de glucógeno está

catalizada por la glucógeno fosforilasa. Debido a que dos enzimas diferentes catalizan la formación y degradación del glucógeno, las dos reacciones pueden ser reguladas en forma independiente.

La activación de la adenilciclasa, estimulada por adrenalina, resulta en el incremento de cAMP, y por consiguiente, la activación de la proteincinasa A (PCA) amplifica la conversión de glucógeno a glucosa-1-fosfato en dos formas: al *inhibir* la síntesis de glucógeno y al *estimular* su degradación (Fig. 15-31a). La PCA fosforila y, al hacerlo, inactiva la glucógeno sintasa (GS), la enzima que sintetiza el glucógeno. PCA estimula la degradación de glucógeno indirectamente mediante fosforilación y, por ende, activa una cinasa intermediaria, la glucógeno fosforilasa sintasa (GPCK), que a su vez fosforila y activa la glucógeno fosforilasa (GP), la enzima que degrada glucógeno. Estas cinasas son contrarrestadas por una fosfatasa llamada fosfoproteína-fosfatasa (PP). A concentraciones elevadas de cAMP, la PCA fosforila un inhibidor de la fosfoproteína-fosfatasa (IP), el cual mantiene este fosfato en su estado inactivo (véase la Fig. 15-31a, derecha).

El proceso completo se invierte cuando se elimina la adrenalina y descende la concentración de cAMP, lo cual inactiva la proteincinasa A (PCA). Cuando la PCA está inactiva, ya no puede fosforilar el inhibidor de la fosfoproteína-fosfatasa (IP); por lo tanto, esta fosfatasa comienza a activarse (Fig. 15-31b). La fosfoproteína-fosfatasa (PP) elimina el residuo de fosfato añadido previamente por la PCA a la glucógeno sintasa (GS), la glucógeno fosforilasa cinasa (GPC) y la glucógeno fosforilasa (GP). Como consecuencia, la síntesis de glucógeno por medio de la glucógeno sintasa es amplificada y la degradación de glucógeno por parte de la glucógeno fosforilasa está inhibida.

Por lo tanto, la glucogenólisis inducida por adrenalina exhibe una regulación dual: activación de las enzimas que catalizan la degradación de glucógeno e inhibición de las enzimas que estimulan su síntesis. Tal regulación dual proporciona un mecanismo eficiente para la regulación de una respuesta celular particular y es un fenómeno común en la biología celular.

La activación mediada por cAMP de la proteincinasa A produce diversas respuestas en diferentes tipos de células

En las células adiposas, la activación inducida por adrenalina de la proteincinasa A (PCA) estimula la fosforilación y activación de la lipasa que hidroliza los triglicéridos almacenados para dar ácidos grasos libres y glicerol. Estos ácidos grasos son liberados a la sangre e incorporados como fuente de energía por las células en otros tejidos como el riñón, el corazón y los músculos (véase el Cap. 12). Por lo tanto, la activación de PCA por la adrenalina en dos tipos de células diferentes, hígado y adipocito, tiene efectos distintos. En efecto, el cAMP y la PCA median una configuración grande de respuestas celulares inducidas por hormonas en numerosos tejidos (Cuadro 15-2).

Aunque la proteincinasa A actúa sobre diferentes sustratos en diversos tipos de células, siempre fosforila un residuo de serina o de treonina que se produce dentro de la misma secuencia del motivo:

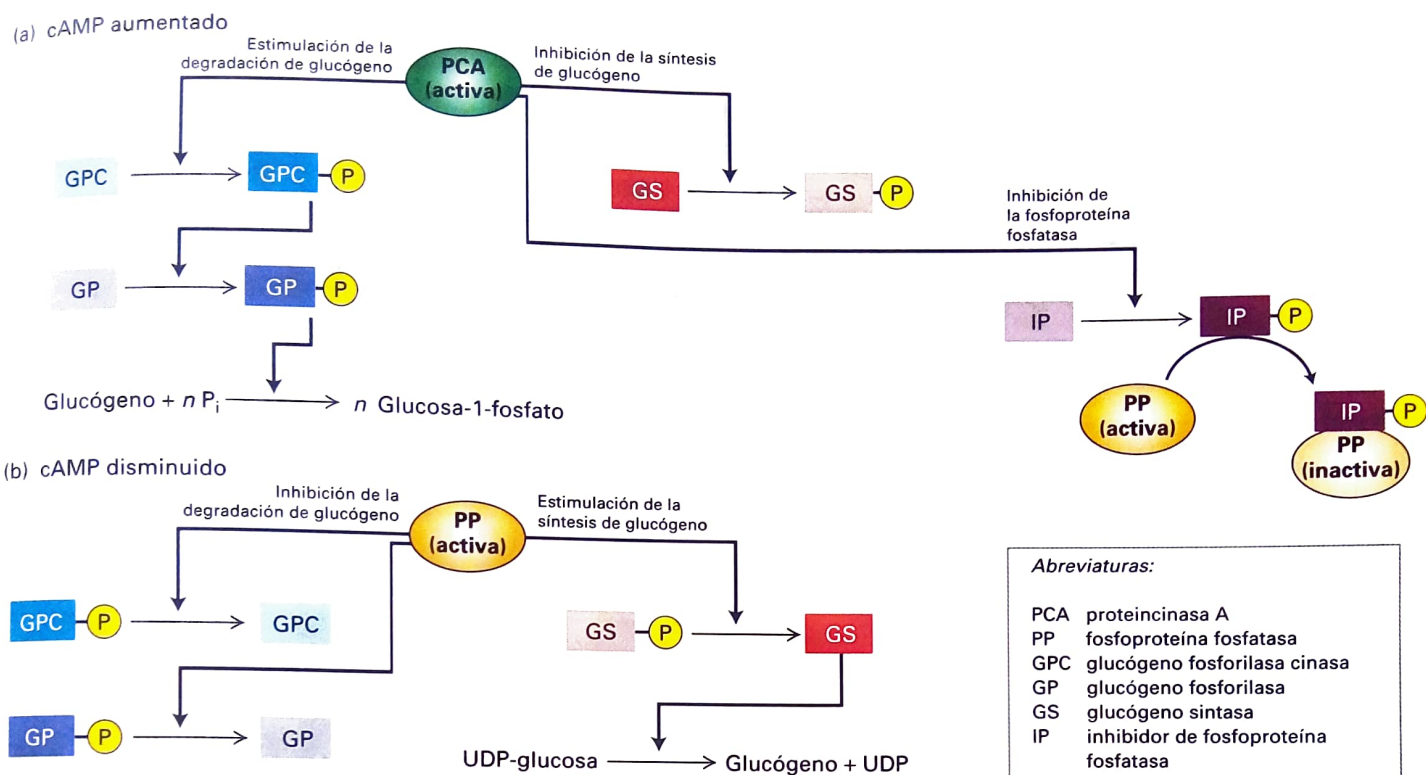


FIGURA 15-31 Regulación del metabolismo del glucógeno por cAMP y PCA. Las enzimas activas se destacan en tonos más oscuros; las formas inactivas, en tonos más claros. (a) Un aumento en el cAMP citosólico activa la proteína cinasa A (PCA), que inhibe la síntesis de glucógeno directamente y estimula la degradación a través de una cascada de proteína cinasa. A cAMP elevado, la PCA también fosforila un inhibidor de la fosfoproteína fosfatasa (PP).

La unión del inhibidor fosforilado a PP evita que esta fosfatasa desfosfore las enzimas activadas en la cascada cinasa o la glucógeno sintasa inactiva. (b) Una disminución en el cAMP inactiva la PCA y lleva a la liberación de la forma activa de la PP. La acción de esta enzima estimula la síntesis de glucógeno e inhibe su degradación.

X-Arg-(Arg/Lys)-X-(Ser/Thr)-φ, donde X denota cualquier aminoácido y φ denota un aminoácido hidrófobo. Otras serina/treonina cinasas fosforilan residuos diana dentro de otros motivos.

En la vía cAMP-proteína A se produce la amplificación de la señal

Hemos visto que los receptores como el β-adrenérgico son proteínas de baja abundancia, típicamente presentes en solo unos pocos cientos de copias por célula. Incluso las respuestas celulares inducidas por una hormona como la adrenalina pueden requerir la producción de grandes cantidades de cAMP y de moléculas de enzimas activadas por célula. A modo de ejemplo, siguiendo la activación de los receptores acoplados a $G_{\alpha s}$, la concentración intracelular de cAMP se elevará a alrededor de 10^{-6} M; en una célula típica que es un cubo ~ 15 mm de lado, esto se convierte en ~ 2 millones de moléculas de cAMP producidas por célula. Así, la amplificación sustancial de la señal es necesaria para que la hormona induzca una respuesta celular significativa. Ya hemos visto cómo se produce la amplificación de la señal a continuación de la absorción de fotones en células bastón. En el caso de los receptores acoplados a proteína G, la amplificación de la señal es posible en parte debido a que ambos receptores y proteínas G pueden difundir rápidamente en la membrana plasmática. Un único complejo adrenalina-PCR causa la conversión de hasta 100 moléculas $G_{\alpha s}$ inactivas a la forma activa antes de que la adrenalina se

disocie del receptor. A su vez, cada GGTP activa una única molécula de adenilciclase, la cual luego cataliza la síntesis de muchas moléculas de cAMP durante el tiempo que $G_{\alpha s} \cdot GTP$ está unido a él.

La amplificación que se produce en tal cascada de transducción de la señal depende del número de pasos en esta y de las concentraciones relativas de los diversos componentes. En la cascada inducida por adrenalina que se muestra en la Figura 15-9, por ejemplo, las concentraciones sanguíneas de adrenalina tan bajas como 10^{-10} pueden estimular la glucogenólisis hepática y liberar glucosa. Un estímulo de adrenalina de esta magnitud genera una concentración de cAMP de 10^{-6} , una amplificación de 10^4 veces. Debido a que tres pasos catalíticos más preceden la liberación de glucosa, puede ocurrir otra amplificación de 10^4 , lo que da como resultado una amplificación de 10^8 de la señal de adrenalina. En el músculo estriado, la amplificación es menos drástica porque las concentraciones de las tres enzimas sucesivas en la cascada glucogenolítica (proteína cinasa A, glucógeno fosforilasa cinasa y glucógeno fosforilasa) están en una proporción 1:10:240 (un potencial de 240 veces la amplificación máxima).

CREB conecta el cAMP y la proteína cinasa A a la activación de la transcripción génica

La activación de la proteína cinasa A también estimula la expresión de muchos genes y lleva a efectos a largo plazo de las células que suelen amplificar los efectos a corto plazo de la proteína cinasa A.

Cuadro 15-2 Respuestas celulares a la elevación inducida por hormona en el cAMP en diversos tejidos*

Tejido	Hormona que induce la elevación en cAMP	Respuesta celular
Adiposo	Adrenalina; ACTH; glucagón	Aumento en la hidrólisis de triglicéridos; disminuye la incorporación de aminoácidos
Hepático	Adrenalina; noradrenalina; glucagón	Incremento en la conversión de glucógeno a glucosa; inhibición de la síntesis de glucógeno; aumento en la incorporación de aminoácidos; aumento en la gluconeogénesis (síntesis de glucosa a partir de aminoácidos)
Folículo ovárico	FSH; LH	Aumento en la síntesis de estrógeno, progesterona
Corteza suprarrenal	ACTH	Aumento en la síntesis de aldosterona, cortisol
Músculo cardíaco	Adrenalina	Aumento en la velocidad de contracción
Tiroides	TSH	Secreción de tiroxina
Óseo	Hormona paratiroidea	Aumento en la reabsorción de calcio a partir de huesos
Músculo esquelético	Adrenalina	Conversión de glucógeno a glucosa-1-fosfato
Intestinal	Adrenalina	Secreción de líquido
Renal	Vasopresina	Reabsorción de agua
Plaquetas sanguíneas	Prostaglandina I	Inhibición de la agregación y la secreción

* Casi todos los efectos del cAMP son mediados a través de la proteincinasa A (PCA), la cual es activada por la unión de cAMP.

FUENTE: E. W. Sutherland, 1972, *Science* 177:401.

Por ejemplo, en las células hepáticas la proteincinasa A induce la expresión de diversas enzimas involucradas en la gluconeogénesis (la conversión de compuestos de tres carbonos como el piruvato [véase la Fig. 12-3] en glucosa) y así se incrementa la concentración de glucosa en la sangre.

Todos los genes regulados por la proteincinasa A contienen una secuencia de DNA que actúa en *cis*, el *elemento de respuesta a cAMP* (CRE), que se une a la forma fosforilada de un factor de transcripción llamado *proteína de unión a CRE* (CREB), que solo se encuentra en el núcleo. Después de la elevación de las concentraciones de cAMP y la liberación de la subunidad catalítica de la proteincinasa A activa, algunas de las subunidades catalíticas se trasladan al núcleo. Allí fosforilan la serina 133 en la proteína CREB. La proteína CREB fosforilada se une a genes diana que contienen CRE y también se unen a un *coactivador* llamado *CBP/300*. CPB/300 une CREB a la RNA polimerasa II y otros genes reguladores de proteínas, lo que estimula así la transcripción génica (Fig. 15-32).

Por lo tanto, la proteincinasa A fosforila múltiples tipos de proteínas; algunos tienen efectos sobre el metabolismo celular a relativamente corto plazo, que duran de segundos a minutos; otros sustratos como CREB, mediante activación de genes específicos, afectan el metabolismo celular durante horas y días.

Las proteínas de anclaje localizan efectos del cAMP en regiones celulares específicas

En muchos tipos de células, una elevación en la concentración de cAMP puede producir una respuesta que es necesaria en una parte de

la célula pero innecesaria, y tal vez perjudicial, en otras. Una familia de proteínas de anclaje localiza isoformas de la proteincinasa A (PCA) en ubicaciones subcelulares específicas y restringe de este modo las respuestas dependientes de cAMP a estas localizaciones. Estas proteínas, referidas como *proteínas asociadas a cinasa A* (ACAP), tienen una estructura de dos dominios, con uno que le confiere localización subcelular específica y otro que se une a la subunidad reguladora (R) de la proteincinasa A (véase la Fig. 15-29b).

Una de tales proteínas de anclaje (ACAP15) está sujeta a la cara citosólica de la membrana plasmática cerca de un canal regulado por Ca^{2+} en ciertas células musculares. En el corazón, la activación de receptores β -adrenérgicos mediante adrenalina (como parte de la respuesta de lucha o huida) lleva a la fosforilación catalizada por PCA de estos canales de Ca^{2+} y hace que se abran; el influjo resultante de Ca^{2+} aumenta la velocidad de la contracción muscular. La unión de ACAP15 a la proteincinasa A localiza la cinasa junto a estos canales y reduce así el tiempo que, de otra forma, se necesitaría para la difusión de las subunidades catalíticas a partir de los sitios de generación hasta sus sustratos de los canales de Ca^{2+} .

Una ACAP diferente en el músculo cardíaco ancla tanto la proteincinasa A como la cAMP fosfodiesterasa (PDE) (la enzima que hidroliza el cAMP a AMP [véase la Fig. 15-26]) hasta la membrana nuclear externa. Debido a la proximidad cercana de PDE a la proteincinasa A, la retroalimentación negativa proporciona un control local minucioso de la concentración de cAMP y, por ende, de la actividad local de PCA (Fig. 15-33). A medida que las concentraciones de cAMP se elevan en respuesta a la estimulación hormonal, se activa PCA. PCA activada fosforila a PDE, que a su vez se torna más activo, hidroliza cAMP y regresa

Figura 15-32 Activación del factor de transcripción CREB a continuación de la unión del ligando a los receptores acoplados a proteína G_s . La estimulación (1) lleva a la activación de la proteincinasa A (PCA) (2). Las subunidades catalíticas de la PCA se trasladan al núcleo (3) y allí fosforilan y activan el factor de transcripción CREB (4). CREB fosforilado se asocia con el coactivador CBP/300 (5) y otras proteínas para estimular la transcripción de genes diana controlados por el elemento regulador CRE. (Véase K. A. Lee y N. Masson, 1993, *Biochim. Biophys. Acta* 1174:221, y D. Parker y cols., 1996, *Mol. Cell Biol.* 16[2]:694.)

así a la PCA a su estado inactivo. La localización de la proteincinasa A cerca de la membrana nuclear facilita la entrada de sus subunidades catalíticas al núcleo, donde fosforilan y activan al factor de transcripción CREB (Fig. 15-32).

Múltiples mecanismos regulan en forma negativa la señalización de la vía GPCR/cAMP/PCA

Para que las células respondan efectivamente a cambios en sus ambientes, no solo deben activar una vía de señalización, sino que también deben regular negativamente o terminar la respuesta una vez que esta ya no es necesaria; de otro modo, las vías de transducción de señales podrían permanecer "encendidas" demasiado tiempo a niveles demasiados elevados y la célula podría tornarse sobreestimulada. La regulación anómala de las vías de señalización es muy común en las células cancerosas, donde las proteínas mutantes que estimulan la proliferación celular o evitan la muerte celular programada permanecen activas incluso cuando las señales que por lo general las activan están ausentes.

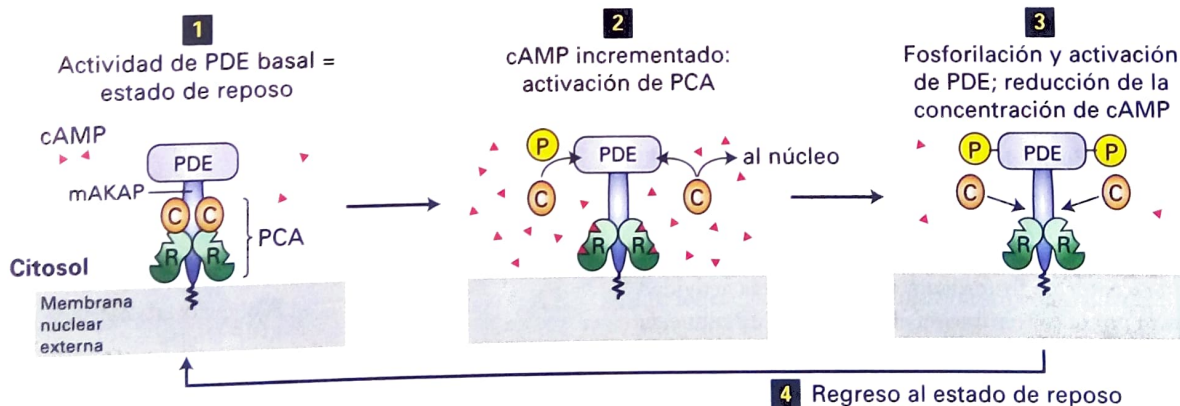
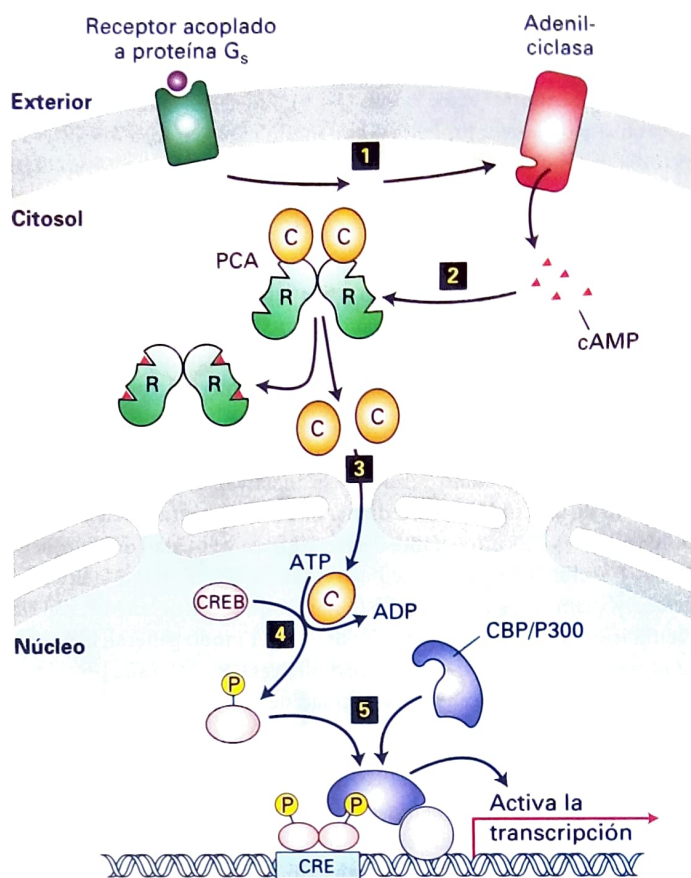


FIGURA 15-33 Localización de la proteincinasa A (PCA) en la membrana nuclear en el músculo cardíaco por una proteína asociada a cinasa A (AKAP). Este miembro de la familia AKAP, designado mAKAP, ancla tanto a la cAMP fosfodiesterasa (PDE) como a la subunidad reguladora (R, véase la Fig. 15-29b) de la PCA a la membrana nuclear, manteniéndolas en un circuito de retroalimentación negativa que proporciona control local riguroso de las concentraciones de cAMP y de la actividad PCA. Paso 1: la concentración basal de la actividad PDE en la ausencia de hormona (estado de reposo) mantiene las concentraciones de cAMP por debajo de aquellas necesarias para la activación de PCA. Pasos 2 y 3: la activación de los receptores β -adrenérgicos causa un

aumento en la concentración de cAMP superior a lo que puede ser degradado por la PDE. La unión resultante del cAMP a las subunidades reguladoras (R) de la PCA libera las subunidades catalíticas (C) activas hacia el citosol. Algunas subunidades C entran en el núcleo, donde se fosforilan y, por ende, activan ciertos factores de transcripción (véase la Fig. 15-32). Otras subunidades C fosforilan PDE y estimulan así su actividad catalítica. PDE activa hidroliza cAMP y lleva las concentraciones de cAMP de regreso a sus niveles basales y causa nuevamente la formación del complejo PCA-R inactivo. Paso 4: la posterior desfosforilación de PDE retorna el complejo al estado de reposo. (Adaptado de K. L. Doge y cols., 2001, *EMBO J.* 20:1921.)

Al comienzo vimos los múltiples mecanismos que rápidamente terminan la vía de transducción de la señal de rodopsina, incluyendo las proteínas GAP que estimulan la hidrólisis del GTP unido a las proteínas que detectan G_{α} , Ca^{2+} que activan la guanilato ciclase y la fosforilación de rodopsina activa por la rodopsina cinasa seguida por la unión de arrestina (véase la Fig. 15-24). En efecto, la mayoría de los receptores acoplados a proteína G son modulados por múltiples mecanismos que regulan negativamente sus actividades, como se ejemplifica a través de los receptores β -adrenérgicos y otros acoplados a $G_{\alpha s}$ que activan la adenilciclase.

- Primero, la afinidad del receptor por su ligando disminuye cuando el GDP unido a $G_{\alpha s}$ es reemplazado con GTP. Este incremento en la K_d del complejo hormona-receptor potencia la disociación del ligando del receptor y, por ende, limita el número de proteínas $G_{\alpha s}$ que son activadas.
- Segundo, la actividad GTPasa intrínseca de la $G_{\alpha s}$ convierte el GTP unido a GDP, y da como resultado la inactivación de $G_{\alpha s}$ y la disminución de la actividad de su diana, que se encuentra corriente abajo, adenilciclase. Es importante destacar que la velocidad de hidrólisis del GTP unido a $G_{\alpha s}$ es aumentada cuando $G_{\alpha s}$ se une a la adenilciclase y disminuye la duración de la producción de cAMP; así, la adenilciclase funciona como GAP para $G_{\alpha s}$. A modo general, la unión de la mayoría, sino de todos, los complejos $G_{\alpha} \times GTP$ a sus proteínas efectoras respectivas acelera la velocidad de hidrólisis de GTP.
- Finalmente, la *cAMP fosfodiesterasa* actúa para hidrolizar cAMP a 5'-AMP y termina la respuesta celular. Así, la presencia continua de hormona a una concentración lo suficientemente alta es necesaria para la activación continua de adenilciclase y el mantenimiento de una concentración de cAMP elevada. Una vez que la concentración de hormona desciende lo suficiente, la respuesta celular termina rápidamente.

La mayoría de los GPCR también son regulados negativamente mediante *represión por retroalimentación*, un término que describe la situación en la cual el producto final de una vía de señalización bloquea un paso temprano en la vía. Por ejemplo, cuando un receptor acoplado a proteína $G_{\alpha s}$ es expuesto a estimulación hormonal durante varias horas, varios residuos de serina y treonina en el dominio citosólico del receptor serán fosforilados por la proteína-kinasa A (PKA), el producto final de la vía de señalización $G_{\alpha s}$. El receptor fosforilado puede unir su ligando pero no puede activar eficientemente a $G_{\alpha s}$; por lo tanto, la unión del ligando al receptor fosforilado lleva a la activación reducida de la adenilciclase en comparación con un receptor no fosforilado. Debido a que la actividad PKA es aumentada por la concentración elevada de cAMP inducida por cualquier hormona que activa $G_{\alpha s}$, la exposición prolongada de una hormona, por ejemplo adrenalina, desensibiliza no solo a los receptores β -adrenérgicos, sino también a otros receptores acoplados a proteína $G_{\alpha s}$ que se unen a diferentes ligandos (p. ej., receptor glucagón en el hígado). Esta regulación cruzada se denomina *desensibilización heteróloga*.

De modo similar a la fosforilación de la rodopsina activada por la rodopsina cinasa, residuos particulares en el dominio citosólico del receptor β -adrenérgico, no aquellos fosforilados por la PKA, pueden ser fosforilados por la enzima relacionada, la *cinasa del receptor β -adrenérgico* (BARK), pero solo cuando la adrenalina o un agonista está unida al receptor y, por lo tanto, el receptor está en su conformación

activa. Este proceso se denomina *desensibilización homóloga*, debido a que sólo aquellos receptores que están en sus conformaciones activas se hallan sometidos a desactivación por fosforilación.

Mencionamos que la unión de arrestina a opsina extensamente fosforilada inhibe por completo la activación de las proteínas G acopladas por opsina activada (véase la Fig. 15-24). En efecto, una proteína llamada β -arrestina cumple un papel similar en la desensibilización de otros receptores acoplados a proteína G, incluyendo receptores β -adrenérgicos. Una función adicional de la β -arrestina en la regulación de receptores de la superficie celular fue sugerida inicialmente por la observación de que la desaparición de los receptores β -adrenérgicos de la superficie celular en respuesta a la unión de ligando es estimulada por la sobreexpresión de BARK y β -arrestina. Estudios posteriores revelaron que la β -arrestina se une no solo a los receptores fosforilados, sino también a la clatrina y a una proteína asociada llamada AP2, dos componentes clave en las vesículas cuatricasomales que están involucradas en un tipo de endocitosis a partir de la membrana plasmática (Fig. 15-34). Estas interacciones estimulan la formación de invaginaciones recubiertas y la endocitosis de los receptores asociados, y disminuyen de esta forma el número de receptores expuestos a la superficie celular. Eventualmente, algunos de los receptores internalizados son degradados de forma intracelular, y algunos son desfosforilados en endosomas. Después de la disociación de β -arrestina, se reciclan los receptores resensibilizados (desfosforilados) a la superficie celular, de manera similar al reciclamiento de los receptores LDL (véase el Cap. 14).

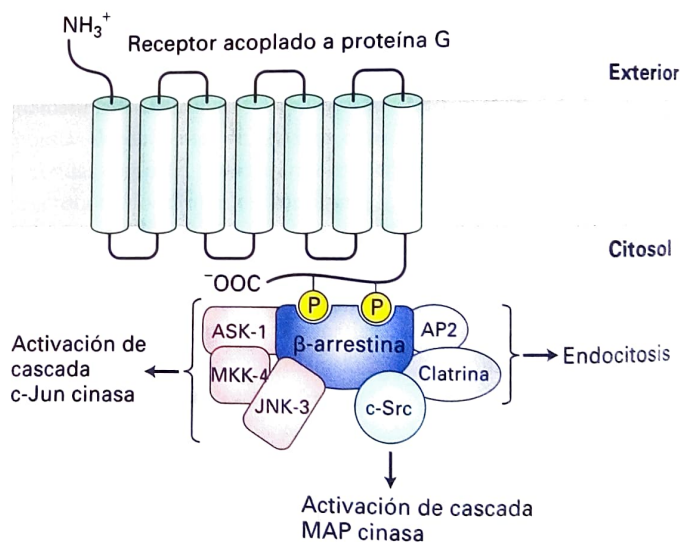


FIGURA 15-34 Papel de la β -arrestina en la desensibilización de GPCR y en la transducción de la señal. La β -arrestina se une a residuos de serina y treonina fosforilada en el segmento C-terminal de los receptores acoplados a proteína G (GPCR). Clatrina y AP2, otras dos proteínas unidas a la β -arrestina, estimulan la endocitosis del receptor. La β -arrestina también funciona en la transducción de señales a partir de receptores activados por la unión y la activación de diversas proteincinasas citosólicas. La c-Src activa la MAP cinasa (véase el Cap. 16). La interacción de la β -arrestina con otras tres proteínas, incluyendo JNK-3 (una cinasa Jun N-terminal), da como resultado la fosforilación y la activación de otro factor de transcripción, c-Jun. (Adaptado de W. Miller y R.J. Lefkowitz, 2001, *Curr. Opin. Cell Biol.* 13:139, y K. Pierce y cols., 2002, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 3:639.)

Además de su papel en la regulación de la actividad de receptor, la β -arrestina funciona como una proteína adaptadora en las señales de transducción desde los receptores acoplados a proteína G hasta el núcleo (véase el Cap. 16). El complejo GPCR arrestina actúa como una matriz para la unión y activación de varias cinasas citosólicas (véase la Fig. 15-34) que analizamos en detalle en los siguientes capítulos. Estos incluyen a c-Src, una proteína tirosina-cinasa que activa la vía MAP cinasa y otras vías que llevan a la transcripción de genes necesarios para la división celular (véase el Cap. 19). Un complejo de tres proteínas unidas a arrestina, incluyendo una Jun N-terminal cinasa (JNK-3), inicia una cascada cinasa que en última instancia activa el factor de transcripción c-Jun, que estimula la expresión de ciertas enzimas que promueven el crecimiento y otras proteínas que ayudan a la célula a responder al estrés. Por lo tanto, la vía BARK- β -arrestina, que originalmente se pensaba que solo suprimía la señalización de los GPCR, en realidad funciona como un interruptor, apagando la señalización de las proteínas G y encendiendo otras vías de señalización. Las múltiples funciones de la β -arrestina ilustran la importancia de las proteínas adaptadoras tanto en la regulación de la señalización como en la transducción de señales a partir de receptores de la superficie celular.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 15.5

Receptores acoplados a proteína G que activan o inhiben la adenilciclase

- La unión de ligando a los receptores acoplados a proteína G que activan G_{as} da como resultado la activación de la enzima adenilciclase unida a membrana, la cual convierte el ATP a un segundo mensajero AMP cíclico (cAMP; véase la Fig. 15-26). La unión de ligando a los receptores acoplados a proteína G que activan a G_{ai} produce la inhibición de la adenilciclase y disminuye las concentraciones de cAMP (véase la Fig. 15-27).
- $G_{as} \cdot GTP$ y $G_{ai} \cdot GTP$ se unen a dominios con sitios activos heterodiméricos en la adenilciclase para activar o inhibir la enzima, respectivamente (véase la Fig. 15-28).
- cAMP se une de manera cooperativa a una subunidad reguladora de la proteincinasa A (PCA) y libera la subunidad catalítica cinasa activa (véase la Fig. 15-29).
- PCA media los diversos efectos del cAMP en la mayoría de las células (véase el Cuadro 15-2). Los sustratos para PCA, y por ende la respuesta celular a la activación inducida por hormona de PCA, varía entre los tipos celulares.
- En las células hepáticas y musculares, la activación de PCA inducida por adrenalina y otras hormonas ejerce un efecto dual, inhibiendo la síntesis de glucógeno y estimulando la degradación de glucógeno a través de una cascada cinasa (véase la Fig. 15-31).
- La señal que activa la vía de señalización GPCR/adenilciclase/cAMP/PCA es increíblemente amplificada por los segundos mensajeros y las cascadas cinasas (véase la Fig. 15-9).

- La activación de PCA suele llevar a la fosforilación de la proteína nuclear CREB, la cual junto con el coactivador CBP/300 estimula la transcripción de genes e inicia de esta forma un cambio a largo plazo en la composición proteica de la célula (véase la Fig. 15-32).
- La localización de PCA en regiones específicas de la célula mediante proteínas de anclaje restringe los efectos del cAMP a localizaciones subcelulares particulares (véase la Fig. 15-33).
- La señalización a partir de receptores acoplados a G_s es regulada en forma negativa a través de múltiples mecanismos: (1) la afinidad del receptor por su ligando disminuye cuando el GDP unido a G_{as} es reemplazado con GTP; (2) la actividad GTPasa intrínseca de G_{as} se une a la adenilciclase (esto se produce cuando muchos complejos $G_{as} \cdot GTP$ se unen a sus respectivas proteínas efectoras); y (3) la *cAMP fosfodiesterasa* actúa para hidrolizar el cAMP a 5'-AMP y termina así la respuesta celular.
- La mayoría de los GPCR también son regulados negativamente a través de *represión por retroalimentación*, en la cual el producto final de una vía (p. ej., PCA) bloquea un paso temprano en la vía. Al igual que con la opsina, la unión de β -arrestina a los receptores fosforilados β -adrenérgicos inhibe completamente la activación de las proteínas G acopladas (véase la Fig. 15-24).
- Los receptores β -adrenérgicos son desactivados por cinasas β -adrenérgicas (BARK), que fosforilan residuos citosólicos del receptor en su conformación activa. La fosforilación BARK de los receptores β -adrenérgicos unidos a ligando también lleva a la unión de la β -arrestina y a la endocitosis de los receptores. La reducción consecuente en la cantidad de receptores de la superficie celular hace que la célula sea menos sensible a la hormona adicional.
- El complejo GPCR-arrestina funciona como una base que activa diversas cinasas citosólicas e inicia cascadas que llevan a la activación transcripcional de muchos genes que controlan el crecimiento celular (véase la Fig. 15-34).

15.6 Receptores acoplados a proteína G que desencadenan elevaciones en el Ca^{2+} citosólico

Los iones calcio cumplen una función esencial en la regulación de las respuestas celulares a muchas señales, y muchos GPCR y otros tipos de receptores ejercen sus efectos en las células al influenciar la concentración citosólica del Ca^{2+} . Como se describió en el Capítulo 11, la concentración de Ca^{2+} en el citosol es mantenida a nivel submicromolar ($\sim 0,2$ mM) mediante la acción de bombas de Ca^{2+} impulsadas por ATP que transportan los iones Ca^{2+} a través de la membrana plasmática hacia el exterior celular o hacia el lumen del retículo endoplasmático y otras vesículas. Mucho Ca^{2+} intracelular también es secuestrado en la mitocondria.

Un pequeño incremento en el Ca^{2+} citosólico induce una variedad de respuestas celulares, incluyendo secreción hormonal por parte de las células endocrinas, secreción de enzimas digestivas por células exocrinas pancreáticas y contracción del músculo (Cuadro 15-3). Por

Cuadro 15-3 Respuestas celulares a la elevación inducida por hormona en el Ca^{2+} citosólico en diversos tejidos*

Tejido	Hormona que induce la elevación del Ca^{2+}	Respuesta celular
Páncreas (células acinares)	Acetilcolina	Secreción de enzimas digestivas, como la amilasa y el tripsinógeno
Glándula parótida (salivales)	Acetilcolina	Secreción de amilasa
Músculo liso de estómago o vascular	Acetilcolina	Contracción
Hígado	Vasopresina	Conversión de glucógeno a glucosa
Plaquetas sanguíneas	Trombina	Agregación, cambio de forma, secreción de hormonas
Mastocitos	Antígeno	Secreción de histamina
Fibroblastos	Factores de crecimiento peptídico	Síntesis de DNA, división celular (p. ej., bombesina y PDGF)

* La estimulación hormonal lleva a la producción de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), un segundo mensajero que estimula la liberación de Ca^{2+} almacenado en el retículo endoplasmático.
FUENTE: M. J. Berridge, 1987, *Ann. Rev. Biochem.* 56:159, y M. J. Berridge y R. F. Irvine, 1984, *Nature* 312:315.

ejemplo, la estimulación de la acetilcolina a los GPCR en las células secretoras del páncreas y las glándulas parótidas (salivales) induce una elevación en el Ca^{2+} citosólico que desencadena la fusión de vesículas secretoras con la membrana plasmática y la liberación de sus contenidos proteicos al espacio extracelular. La trombina, una enzima en la cascada de coagulación de la sangre, se une a GPCR en las plaquetas y desencadena una elevación en el Ca^{2+} citosólico que, a su vez, causa un cambio conformacional en las plaquetas que lleva a sus agregaciones, un paso importante en la coagulación sanguínea para evitar pérdidas de sangre fuera de los vasos sanguíneos dañados.

En esta sección, primero analizaremos una vía de transducción de la señal importante que resulta en una elevación de los iones de Ca^{2+} citosólico: la activación estimulada por GPCR de una **fosfolipasa C** (PLC). Una fosfolipasa C (PCL) es una familia de enzimas que hidrolizan un enlace fosfodiéster en ciertos fosfolípidos y producen así dos segundos mensajeros que funcionan en la elevación de las concentraciones de Ca^{2+} citosólico y la activación de una familia de cinasas conocidas como **proteincinasas C** (PCC); a su vez, las PCC afectan muchos procesos importantes, como el crecimiento y la diferenciación. Algunos de las PLC son activadas por GPCR, como se describe aquí; otros, que se tratan en el siguiente capítulo, son activados por otros tipos de receptores. Las fosfolipasas C también producen segundos mensajeros que son importantes en la remodelación del citoesqueleto de actina (véase el **Cap. 17**) y para la unión de proteínas importantes para la endocitosis y la fusión de vesículas (véase el **Cap. 14**). Más adelante en esta sección, se verá cómo una vía PLC lleva a la síntesis de un gas, el óxido nítrico (NO), que a su vez señala las células adyacentes. En la parte final de esta sección, se verá cómo los segundos mensajeros como el Ca^{2+} se utilizan para ayudar a las células a integrar sus respuestas a más de una señal extracelular.

Las fosfolipasas C activadas generan dos segundos mensajeros claves derivados del lípido de membrana fosfatidilinositol

Una cantidad de segundos mensajeros importantes, usados en varias vías de transducción de la señal, derivan del lípido de membrana fos-

fatidilinositol (PI). El grupo inositol en este fosfolípido, el cual siempre mira hacia el citosol, puede ser fosforilado de manera reversible en una o más posiciones por la acción combinada de varias cinasas y fosfatasa analizadas en el **Capítulo 16**. Una derivada del PI, el lípido fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2), es cortado por la fosfolipasa C activada en dos segundos mensajeros importantes: **1,2-diacilglicerol (DAG)**, una molécula fosfolípida que permanece asociada con la membrana, e **inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3)**, que puede difundirse libremente en el citosol (**Fig. 15-35**). Nos referimos colectivamente a los acontecimientos corriente abajo que involucran a estos dos segundos mensajeros como la **vía IP_3/DAG** .

La fosfolipasa C es activada por proteínas G que contienen cualquiera de las subunidades $G_{\alpha o}$ o $G_{\alpha q}$. En respuesta a la activación hormonal de los GPCR, las subunidades $G_{\alpha o}$ o $G_{\alpha q}$ se unen al GTP para separarlo de $G_{\beta\gamma}$ y unirse y activar a la fosfolipasa C en la membrana (**Fig. 15-36a**, paso **1**). A su vez, la fosfolipasa C activada escinde a PIP_2 para dar DAG, que permanece asociado con la membrana, e IP_3 , que se difunde libremente en el citosol (**Fig. 15-36a**, paso **2**). Los dos segundos mensajeros desencadenan efectos separados corriente abajo.

Ca^{2+} liberado del RE desencadenado por IP_3 Los receptores acoplados a proteína G que activan la fosfolipasa C inducen una elevación en el Ca^{2+} citosólico incluso cuando los iones Ca^{2+} están ausentes en el líquido extracelular circundante. En este caso, el Ca^{2+} es liberado al citosol a partir del lumen del RE a través del funcionamiento del **canal de Ca^{2+} regulado por IP_3** en la membrana del RE, como se describen en la **Figura 15-36a** (pasos **3** y **4**). Esta proteína canal grande se halla compuesta por cuatro subunidades idénticas, cada una de las cuales contiene un sitio de unión a IP_3 en el dominio citosólico N-terminal. La unión de IP_3 induce la apertura del canal y permite al Ca^{2+} fluir a favor de su gradiente de concentración desde el RE hacia el citosol. Cuando varios inositoles fosforilados que se encuentran en las células se añaden a preparaciones de vesículas del RE, solo IP_3 causa la liberación de iones Ca^{2+} desde las vesículas. Este experimento simple demuestra la especificidad de los efectos IP_3 .

El incremento en la concentración de Ca^{2+} citosólico mediado por IP_3 es transitorio debido a que las bombas de Ca^{2+} localizadas en la

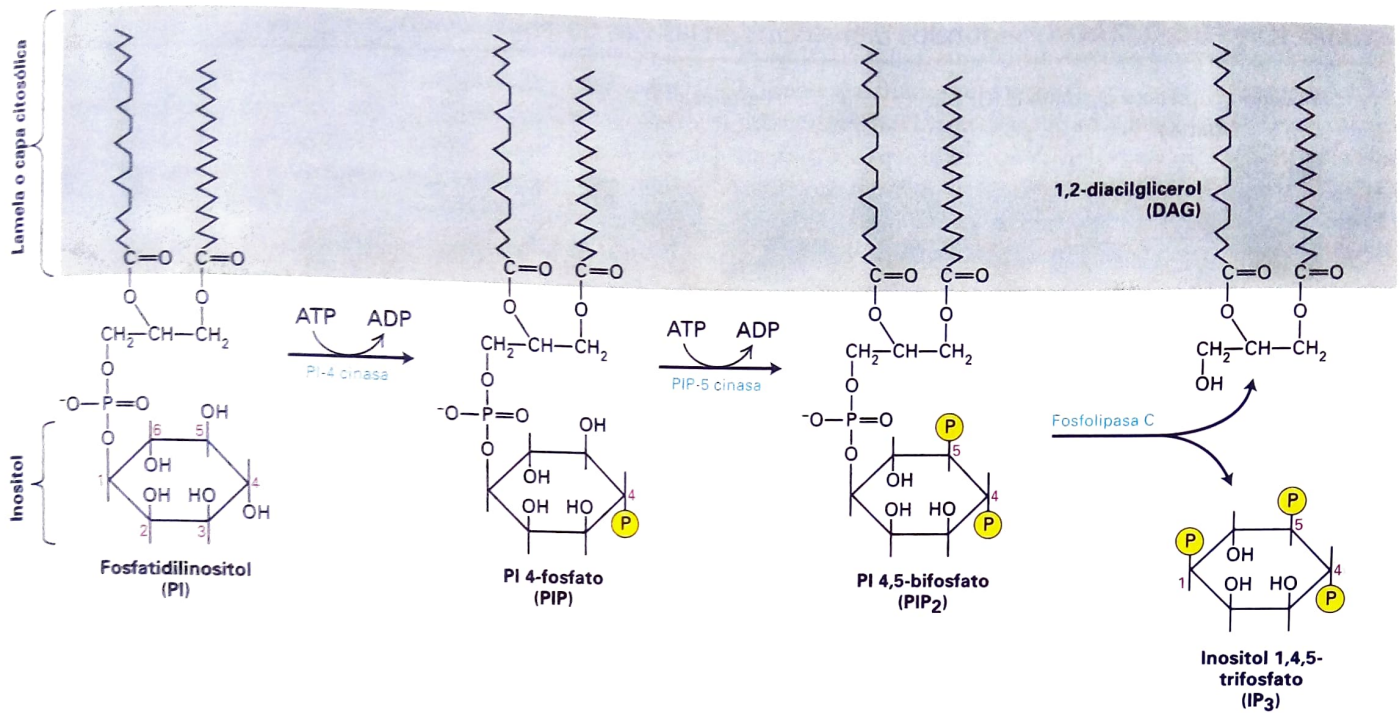


FIGURA 15-35 Síntesis de los segundos mensajeros DAG e IP₃ a partir de fosfatidilinositol (PI). Cada cinasa PI unida a membrana coloca un fosfato (círculos amarillos) sobre un grupo hidroxilo específico en el anillo inositol, lo que produce los derivados fosforilados PIP y PIP₂. La escisión

de PIP₂ mediante la fosfolipasa C produce los dos segundos mensajeros importantes DAG e IP₃. (Véase A. Tokoy y L. C. Cantley, 1997, *Nature* **387**:673, y C. L. Carpenter y L. C. Cantley, 1996, *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**:153.)

membrana plasmática y la membrana del RE transportan activamente Ca²⁺ desde el citosol hacia el exterior celular y el lumen del RE, respectivamente. Por otro lado, inmediatamente después de su generación, el fosfato unido al carbono 5 del IP₃ (véase la Fig. 15-35) es hidrolizado y produce inositol 1,4-bisfosfato. Este compuesto no puede unirse a la proteína canal de Ca²⁺ regulada por IP₃ y, por ende, no estimula la liberación de Ca²⁺ desde el RE.

Sin algunos medios para reabastecer los depósitos agotados de Ca²⁺ intracelular, una célula pronto podría ser incapaz de incrementar la concentración de Ca²⁺ citosólico en respuesta a IP₃ inducido por hormona. Los estudios de *patch-clamp* (véase la Fig. 11-22) revelaron que un canal de Ca²⁺ de la membrana plasmática, llamado *canal operado por depósitos*, se abre en respuesta al agotamiento de los depósitos de Ca²⁺ del RE. Estudios en los cuales cada proteína canal potencial fue inactivada una por vez con shRNA establecieron la identidad de esta proteína canal como Orai1. La proteína que detecta el Ca²⁺ es STIM, una proteína transmembrana en la membrana del retículo endoplasmático (Fig. 15-36b). Una mano EF, similar a la de la calmodulina (véase la Fig. 3-31), sobre el lado luminal de la membrana del RE une Ca²⁺ cuando su concentración en el lumen es alta. A medida que los depósitos de Ca²⁺ del retículo endoplasmático se agotan, las proteínas STIM pierden sus Ca²⁺ unidos, oligomerizan y, de manera desconocida, relocalizan las zonas de la membrana del RE cerca de la membrana plasmática (Fig. 5-36b, derecha). Existen dominios CAD de las STIM que se unen a Orai1 y desencadenan su apertura, lo que permite la entrada de Ca²⁺ extracelular. La sobreexpresión combinada de Orai y STIM en las células cultivadas lleva a un aumento marcado de la entrada de Ca²⁺ y establece que estas dos proteínas son componentes clave en la vía de Ca²⁺ operada por depósito.

La activación continua de ciertos receptores acoplados a proteína G inducen rápidamente picos repetidos de la concentración de Ca²⁺ citosólico. Estos estallidos en los niveles de Ca²⁺ citosólico son causados por una interacción compleja entre la concentración de Ca²⁺ citosólico y la proteína canal de Ca²⁺ regulado por IP₃. La concentración submicromolar de Ca²⁺ citosólico en el estado de reposo potencia la apertura de estos canales por IP₃ y se facilita así la elevación rápida en el Ca²⁺ citosólico después de la estimulación hormonal del receptor acoplado a proteína G en la superficie celular. Sin embargo, las altas concentraciones de Ca²⁺ alcanzadas en la punta del pico inhiben la liberación de Ca²⁺ inducida por IP₃ desde los depósitos intracelulares al disminuir la afinidad de los canales de Ca²⁺ por IP₃. Como resultado, los canales cierran, y los niveles de Ca²⁺ citosólico descienden rápidamente. Por lo tanto, el Ca²⁺ citosólico es un inhibidor por retroalimentación de la proteína, el canal de Ca²⁺ regulado por IP₃, que cuando abre desencadena el incremento de Ca²⁺ citosólico. Los picos de iones calcio se producen en las células de la glándula pituitaria que secreta hormona leutinizante (LH), la cual cumple un papel importante en el control de la ovulación y la fertilidad femenina. La secreción de LH es inducida por la unión de la hormona liberadora de hormona leutinizante (LHRH) a sus receptores acoplados a proteína G sobre estas células; la unión de LHRH induce los picos de Ca²⁺ repetidos. Cada pico de Ca²⁺ induce la exocitosis de unas pocas vesículas secretoras que contienen LH, presumiblemente aquellas cercanas a la membrana plasmática.

Activación de la proteincinasa C por DAG Después de su formación por la hidrólisis de PIP₂ catalizada por la fosfolipasa C, el DAG permanece asociado con la membrana plasmática. La función principal del

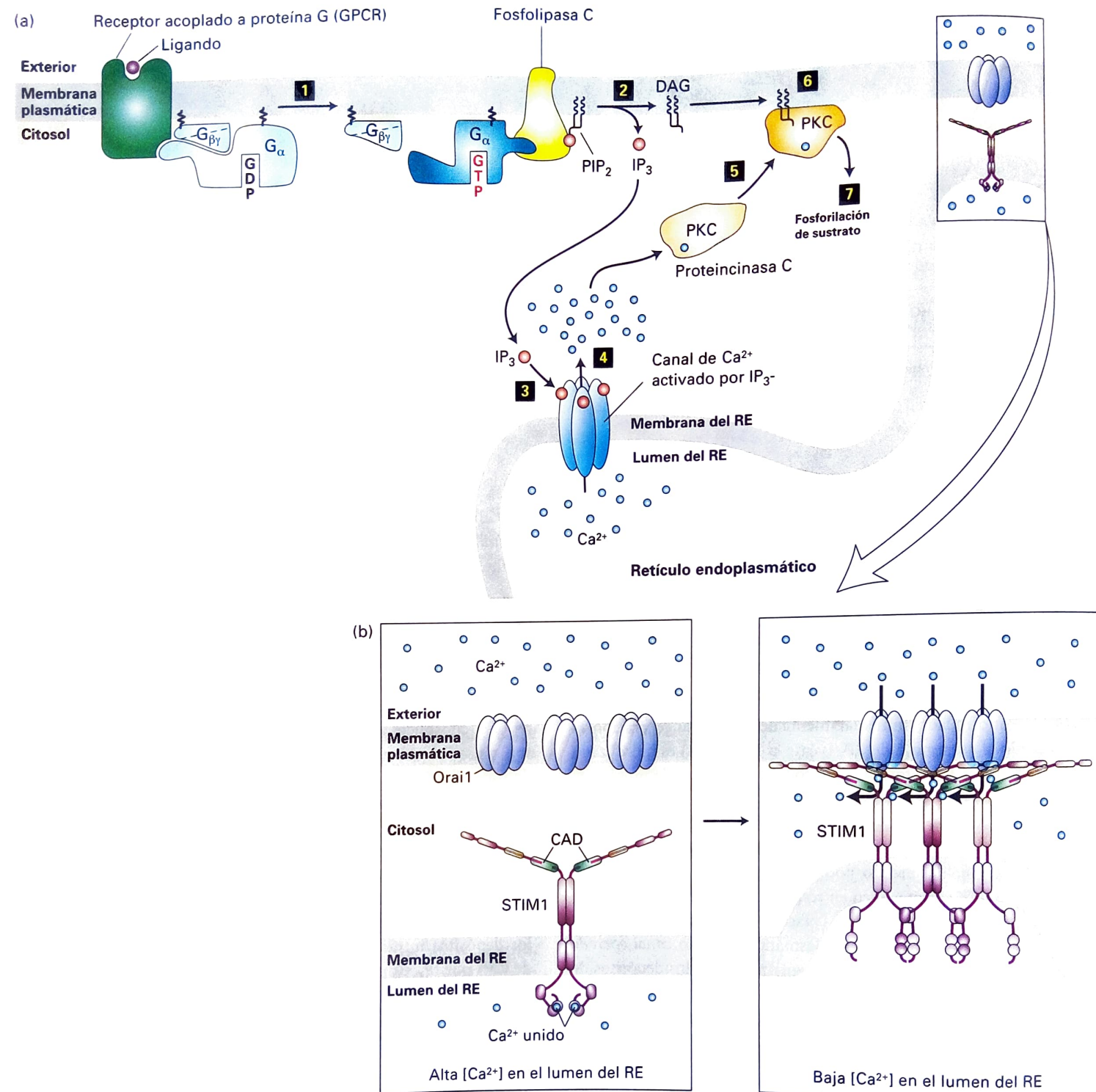


FIGURA 15-36 La vía IP₃/DAG y la elevación del Ca²⁺ citosólico. (a) Apertura de los canales de Ca²⁺ en el retículo endoplasmático. Esta vía puede ser desencadenada por la unión de ligando a los GPCR que activan cualquiera de las subunidades G_{qo} o G_{12o} y llevan a la activación de la fosfolipasa C (paso 1). La escisión de PIP₂ por la fosfolipasa C produce IP₃ y DAG (paso 2). Después de la difusión a través del citosol, IP₃ interactúa con los canales de Ca²⁺ en la membrana del retículo endoplasmático y los abre (paso 3), lo cual provoca la liberación de los iones Ca²⁺ almacenados hacia el citosol (paso 4). Una de las respuestas inducidas por una elevación en el Ca²⁺ citosólico es el reclutamiento de la proteína cinasa C (PCC) a la membrana plasmática (paso 5), donde es activada por DAG (paso 6). La cinasa activada asociada a la membrana puede fosforilar diversas enzimas celulares y receptores, y alterar de esta manera

sus actividades (paso 7). (b) Apertura de los canales de Ca²⁺ de la membrana plasmática. *Izquierda:* en la célula en reposo, las concentraciones de Ca²⁺ en el lumen del retículo endoplasmático son altas, y los iones Ca²⁺ (círculos azules) se unen a los dominios manos EF de las proteínas transmembrana STIM. *Derecha:* a medida que los almacenamientos de Ca²⁺ del retículo endoplasmático se agotan y los iones Ca²⁺ se disocian de las manos EF, las STIM sufren oligomerización y relocalización hacia zonas de la membrana del RE cerca de la membrana plasmática. Allí, los dominios de activación CRAC de la STIM (CAD, verde) se unen a Orai1 y desencadenan su apertura, los canales de Ca²⁺ regulados por Ca²⁺ extracelular. (Adaptado de J. W. Putney, 1999, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* **96**:14669; Y. Zhou, 2010, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* **107**:4896; y M. Cahalan, 2010, *Science* **330**:43.)

DAG es activar una familia de proteincinasas colectivamente llamadas **proteincinasas C (PCC)**. En ausencia de estimulación hormonal, la proteincinasa C se presenta como una proteína citosólica soluble que es catalíticamente inactiva. Una elevación en la concentración de Ca^{2+} citosólico causa que la proteincinasa C se traslade a la capa citosólica de la membrana plasmática, donde puede interactuar con el DAG asociado a la membrana (véase la Fig. 15-36a, pasos 5 y 6). De este modo, la activación de la proteincinasa C depende de un incremento tanto de los iones Ca^{2+} como del DAG, lo cual sugiere una interacción entre las dos ramificaciones de la vía IP_3/DAG .

La activación de la proteincinasa C en diferentes células da como resultado una variedad de gama de respuestas, lo cual indica que cumple una función clave en muchos aspectos del crecimiento y el metabolismo celular. En las células hepáticas, por ejemplo, la proteincinasa C ayuda a regular el metabolismo del glucógeno mediante fosforilación y, por ende, inhibe la glucógeno sintasa. La proteincinasa C también fosforila diversos factores de transcripción que, en algunas células, activan genes necesarios para la división celular.

El complejo Ca^{2+} -calmodulina media muchas respuestas celulares de las señales externas

La pequeña proteína citosólica ubicua calmodulina funciona como un interruptor multipropósito que media muchos efectos celulares de los iones Ca^{2+} . La unión de Ca^{2+} a los cuatro sitios en la calmodulina forma un complejo que interactúa con muchas enzimas y otras proteínas y modula sus actividades (véase la Fig. 3-31). Debido a que los cuatro Ca^{2+} se unen a la calmodulina de manera cooperativa, un pequeño cambio en la concentración de Ca^{2+} citosólico lleva a un gran cambio en la concentración de calmodulina activa. Una enzima bien estudiada activada por el complejo Ca^{2+} -calmodulina es la cinasa de cadena ligera de miosina, que regula la actividad de la miosina y, por lo tanto, la contracción en las células musculares (véase el Cap. 17). Otra es la cAMP fosfodiesterasa, la enzima que degrada el cAMP a 5'-AMP y termina sus efectos. Por ende, esta reacción conecta el Ca^{2+} y el cAMP, uno de los muchos ejemplos en los cuales las vías mediadas por dos segundos mensajeros interactúan para poner a punto una respuesta celular.

En muchas células, el incremento en el Ca^{2+} citosólico que sigue la vía de señalización de receptor IP_3 generada por fosfolipasa lleva a la activación de factores de transcripción específicos. En algunos casos, el Ca^{2+} -calmodulina activa la proteincinasa que, a su vez, fosforila los factores de transcripción y modifica así sus actividades y regula la expresión génica. En otros casos, el Ca^{2+} -calmodulina activa una fosfatasa que elimina grupos fosfatos a partir de un factor de transcripción, y lo activa. Un ejemplo importante de este mecanismo involucra las células T del sistema inmunitario (véase el Cap. 23).

La relajación inducida por señal del músculo liso vascular está mediada por una vía de Ca^{2+} -óxido nítrico-cGMP activada por la proteincinasa G



La nitroglicerina ha sido utilizada durante un siglo como tratamiento para el dolor de pecho intenso de la angina de pecho. Se sabía que se descomponía lentamente en el cuerpo a óxido nítrico (NO) y causaba la relajación de las células de músculo liso que rodean

los vasos sanguíneos que “alimentan” al músculo cardíaco en sí mismo; de esta forma, aumenta el diámetro de los vasos sanguíneos y el flujo de la sangre que transporta oxígeno hacia el músculo cardíaco. Uno de los descubrimientos más intrigantes en la medicina moderna es que el NO, un gas tóxico que se encuentra en los escapes de los automóviles, es de hecho una molécula de señalización natural. ■

La evidencia definitiva para el papel del NO en la inducción de la relajación de los músculos liso proviene de un conjunto de experimentos en los cuales se añadió acetilcolina a preparaciones experimentales de células de músculo liso que rodean los vasos sanguíneos. La aplicación directa de acetilcolina a estas células provoca que ellas se contraigan, el efecto esperado de la acetilcolina sobre estas células musculares. Pero la adición de acetilcolina al lumen de pequeños vasos sanguíneos aislados causó la relajación y no la contracción de los músculos lisos subyacentes. Estudios posteriores demostraron que, en respuesta a la acetilcolina, las células endoteliales que revisten el lumen de los vasos sanguíneos liberan alguna sustancia que resultó ser NO.

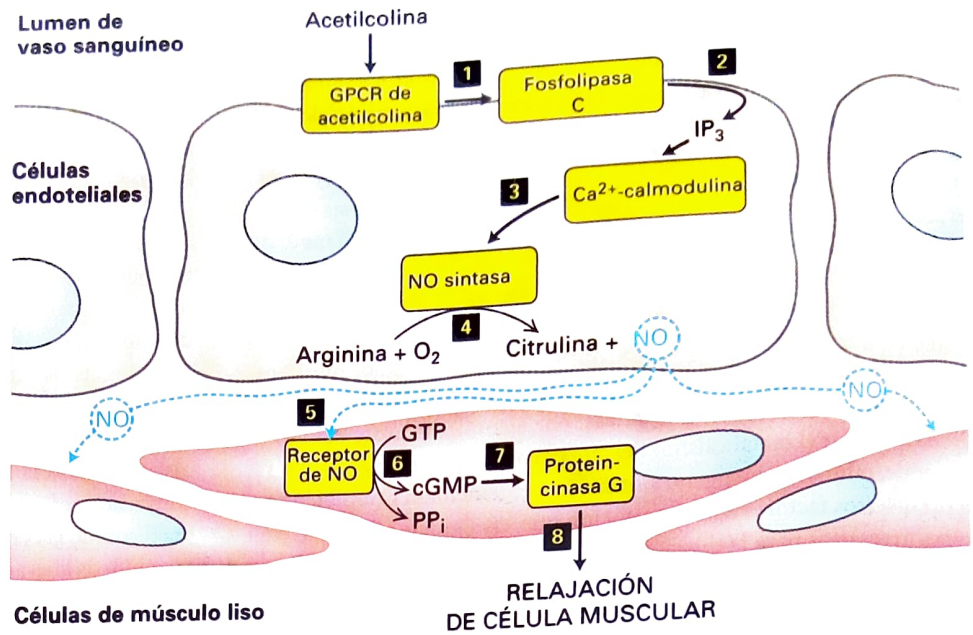
En la actualidad, se sabe que las células endoteliales contienen un receptor acoplado a proteína G_o que une acetilcolina y activa la fosfolipasa C, lo que lleva a un incremento en la concentración de Ca^{2+} citosólico. Después de que el Ca^{2+} se une a la calmodulina, el complejo resultante estimula la actividad de NO sintasa, una enzima que cataliza la formación de NO a partir de O_2 y el aminoácido arginina. Debido a que el NO tiene un tiempo de vida corto (2-30 segundos), puede difundir solo localmente en los tejidos a partir de su sitio de síntesis. En particular, el NO difunde desde la célula endotelial hasta las células de músculo liso vecinas, donde se desencadena la relajación muscular (Fig. 15-37).

El efecto del NO sobre el músculo liso es mediado por el segundo mensajero cGMP, formado por un receptor NO intracelular expresado por las células de músculo liso. La unión de NO al grupo hemo en este receptor lleva al cambio conformacional que incrementa su actividad guanilciclase intrínseca, con la consecuente elevación en la concentración de cGMP citosólico. La mayoría de los efectos del cGMP están mediados por una proteincinasa dependiente de cGMP, también conocida como **proteincinasa G (PCG)**. En el músculo liso vascular, la proteincinasa G activa una vía de señalización que produce la inhibición del complejo actina-miosina, la relajación de la célula y, por lo tanto, la dilatación del vaso sanguíneo. En este caso, cGMP actúa indirectamente a través de la proteincinasa G, mientras que en las células bastón el cGMP actúa directamente mediante la unión y la apertura de los canales de catión en la membrana plasmática (véase la Fig. 15-23).

La integración de los segundos mensajeros Ca^{2+} y cAMP regula la glucogenólisis

Así como ninguna célula vive en aislamiento, ninguna vía de señalización intracelular funciona sola. Todas las células reciben constantemente múltiples señales de sus ambientes, incluyendo cambios en las concentraciones de hormonas, metabolitos, y gases como NO y oxígeno; estas señales deben integrarse. La degradación de glucógeno a glucosa (glucogenólisis) proporciona un ejemplo excelente de cómo las células pueden integrar sus respuestas a más de una señal. Como se analizó en la Sección 15.5, la estimulación por adrenalina de las células musculares y hepáticas lleva a un aumento del segundo mensa-

FIGURA 15-37 La vía de Ca^{2+} /óxido nítrico (NO)/cGMP y la relajación del músculo liso arterial. El óxido nítrico es sintetizado en las células endoteliales en respuesta a la activación de los GPCR de acetilcolina, fosfolipasa C y el posterior aumento en el Ca^{2+} citosólico (pasos 1-4). El NO difunde localmente a través de tejidos y activa un receptor de NO intracelular con actividad guanilciclase en las células de músculo liso cercanas (5). El incremento resultante en cGMP (6) activa la proteína cinasa G (7) y lleva a la relajación del músculo y, por lo tanto, a la vasodilatación (8). PP_i = pirofosfato. (Véase C. S. Lowenstein y cols., 1994, *Ann. Intern. Med.* 120:227.)



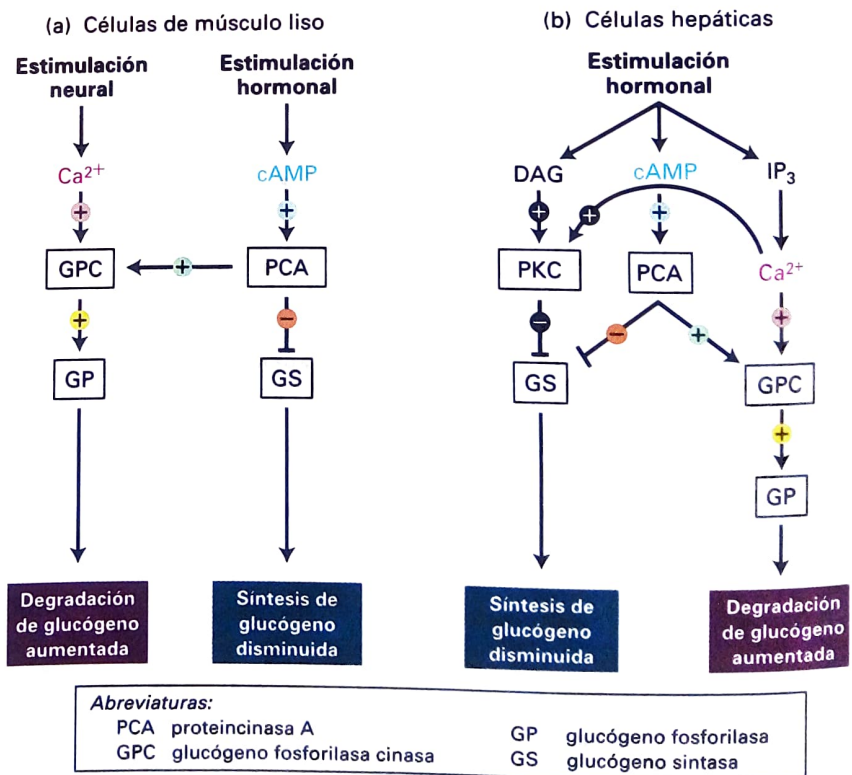
jero cAMP, el cual estimula la degradación de glucógeno (véase la Fig. 15-31a). Tanto en las células musculares como en las hepáticas, otros segundos mensajeros también producen la misma respuesta celular.

En las células musculares, la estimulación de los impulsos nerviosos causa la liberación de iones Ca^{2+} desde el retículo sarcoplasmático y un incremento en la concentración de Ca^{2+} citosólico, el cual desencadena la contracción muscular. La elevación en el Ca^{2+} citosólico también activa la glucógeno fosforilasa cinasa (GPC), y estimula así la degradación de glucógeno a glucosa-1-fosfato, que

promueve la contracción prolongada. Recuerdese que la fosforilación por la proteína cinasa A dependiente de cAMP también activa la glucógeno fosforilasa cinasa (véase la Fig. 15-31). Por lo tanto, esta enzima reguladora clave en la glucogenólisis está sujeta tanto a regulación neural como hormonal en el músculo (Fig. 15-38a).

En las células hepáticas, la activación inducida por hormona de la proteína efectora fosfolipasa C también regula la degradación de glucógeno mediante la generación de segundos mensajeros DAG e IP_3 . Como aprendimos, IP_3 induce un incremento en el Ca^{2+} citosólico, el

FIGURA 15-38 Regulación integrada de la glucogenólisis por las vías del Ca^{2+} y del cAMP/PCA. (a) La estimulación hormonal de las células de músculo estriado o la unión de adrenalina a los receptores β -adrenérgicos sobre sus superficies lleva al incremento de la concentración citosólica del segundo mensajero Ca^{2+} o de cAMP, respectivamente. La enzima reguladora clave glucógeno fosforilasa cinasa (GPC) es activada por la unión de iones Ca^{2+} y por la fosforilación por proteína cinasa A (PCA) dependiente de cAMP. (b) En las células hepáticas, la estimulación hormonal de los receptores β -adrenérgicos lleva al incremento citosólico de las concentraciones del cAMP y dos otros segundos mensajeros, el diacilglicerol(DAG) y el inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3). Las enzimas se marcan con recuadros blancos. (+) = activación de la actividad enzimática; (-) = inhibición.



cual activa la glucógeno fosforilasa cinasa como en las células musculares, lo que ocasiona la degradación de glucógeno. Más aún, el efecto combinado de DAG y Ca^{2+} incrementado activa la proteincinasa C (véase la Fig. 15-36). Esta cinasa puede fosforilar la glucógeno sintasa, inhibir así la enzima y reducir la velocidad de síntesis del glucógeno. En este caso, se activan múltiples vías de transducción de la señal intracelular mediante la misma señal (Fig. 15-38b).

La regulación dual de la glucógeno fosforilasa cinasa por el Ca^{2+} y la proteincinasa A en células hepáticas y musculares resulta a partir de su estructura de subunidad multimérica $(\alpha\beta\gamma\delta)_4$. La subunidad γ es la enzima catalítica; las subunidades reguladoras α y β , que son similares en estructura, son fosforiladas por la proteincinasa A; y la subunidad δ es la calmodulina sensora de calcio. La glucógeno fosforilasa cinasa tiene actividad máxima cuando los iones Ca^{2+} están unidos a la subunidad calmodulina y la subunidad ha sido fosforilada por proteincinasa A. En efecto, la unión de Ca^{2+} a la subunidad calmodulina puede ser esencial para la actividad enzimática de la glucógeno fosforilasa cinasa. La fosforilación de las subunidades α y también β por parte de la proteincinasa A incrementa la afinidad de la subunidad calmodulina por el Ca^{2+} , lo que permite a los iones Ca^{2+} unirse a la enzima en las concentraciones submicromolares de Ca^{2+} que se encuentran en las células no contráctiles. Por lo tanto, el aumento en la concentración citosólica de Ca^{2+} o de cAMP (o ambos) induce aumentos incrementales en la actividad de la glucógeno fosforilasa cinasa. Como resultado de la concentración elevada de Ca^{2+} citosólico después de la estimulación de las células musculares, la glucógeno fosforilasa cinasa se activará incluso si no está fosforilada; por ende, el glucógeno puede ser hidrolizado para alimentar la contracción muscular continuada incluso en ausencia de estimulación hormonal.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 15.6

Receptores acoplados a proteína G que desencadenan elevaciones en el Ca^{2+} citosólico

- Una pequeña elevación en el Ca^{2+} citosólico induce una variedad de respuestas en diferentes células, incluyendo la secreción hormonal, la contracción muscular y la agregación plaquetaria (véase el Cuadro 15-3).
- Muchas hormonas se unen a los GPCR acoplados a las proteínas G que contienen una subunidad $G_{\alpha o}$ o $G_{\alpha q}$. La proteína efectora activada por $G_{\alpha o}$ o $G_{\alpha q}$ unido a GTP es una enzima fosfolipasa C.
- La fosfolipasa C escinde un fosfolípido conocido como PIP_2 y genera dos segundos mensajeros: IP_3 que difunde y DAG unido a membrana (véase la Fig. 15-35).
- IP_3 desencadena la apertura de canales de Ca^{2+} regulados por IP_3 en el retículo endoplasmático y la elevación de Ca^{2+} citosólico libre. En respuesta al Ca^{2+} citosólico incrementado, la proteincinasa C es reclutada en la membrana plasmática, donde es activada por el DAG (Fig. 15-36a).
- El agotamiento de los depósitos de Ca^{2+} del RE lleva a la apertura de los canales regulados por depósitos de la membrana plasmática y a una entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular (véase la Fig. 15-36b).
- El complejo Ca^{2+} -calmodulina regula la actividad de muchas proteínas diferentes, incluyendo la cAMP fosfodiesterasa y protein-

cinasas y fosfatasa que controlan la actividad de varios factores de transcripción.

- La estimulación de los receptores acoplados a proteína G por la acetilcolina sobre las células endoteliales induce un incremento en el Ca^{2+} citosólico y la posterior síntesis de NO. Después de la difusión en las células de músculo liso circundantes, el NO activa una guanilato ciclasa intracelular para sintetizar cGMP. El incremento resultante en cGMP lleva a la activación de la proteincinasa G, la cual desencadena una vía resultante en la relajación muscular y la vasodilatación (véase la Fig. 15-37).
- La degradación del glucógeno y la síntesis está regulada de forma coordinada por los segundos mensajeros Ca^{2+} y cAMP, cuyas concentraciones están reguladas por estimulación neural y hormonal (véase la Fig. 15-38).

Perspectivas para el futuro

En este capítulo, nos hemos fijado principalmente en las vías de transducción de la señal activadas por receptores individuales acoplados a proteína G. Sin embargo, incluso estas vías relativamente simples presagian situaciones más complejas dentro de las células vivas. Muchos receptores acoplados a proteína G forman homodímeros o heterodímeros con otros receptores acoplados a proteína G que unen ligandos con diferentes especificidades y afinidades. Existe mucha investigación actual que está dedicada a determinar funciones de estos receptores dímicos en el cuerpo.

Con ~ 900 miembros en total, los receptores acoplados a proteína G representan la familia de proteínas más grande en el genoma humano. Se cree que aproximadamente la mitad de estos genes codifican receptores sensitivos; de estos, la mayoría está en el sistema olfatorio y unen odorantes. De los restantes receptores de proteína G, el ligando natural no ha sido identificado para muchos de los llamados GPCR huérfano (es decir, GPCR putativos sin ligandos afines conocidos). Es probable que muchos de estos receptores huérfanos se unan a moléculas de señalización no identificadas hasta el momento, incluyendo nuevas hormonas peptídicas. Los receptores acoplados a proteína G ya abarcan las dianas de más del 30% de todos los fármacos terapéuticos aprobados; por lo tanto, los GPCR huérfanos representan un recurso fructífero para el descubrimiento de fármacos por parte de la industria farmacéutica.

Un abordaje técnico que ha probado ser fructífero en la identificación de ligandos de los GPCR huérfanos involucra la expresión de los genes de receptores en células transfectadas y su uso como sistemas informadores para detectar sustancias en extractos tisulares que activan vías de transducción de la señal en estas células. Este enfoque ya ha dado lugar a conocimientos impresionantes acerca del comportamiento humano. Un ejemplo es que dos péptidos nuevos llamados orexina-A y orexina-B (del griego *orexis*, que significa "apetito") fueron identificados como los ligandos para dos GPCR huérfanos. Investigación posterior demostró que el gen *orexina* solo se expresa en el hipotálamo, la parte del cerebro que regula la alimentación. La inyección de orexina a los ventrículos cerebrales causó que los animales se alimentaran más, y la expresión del gen *orexina* se incrementó marcadamente durante el ayuno. Ambos hallazgos son consistentes

con la función de la orexina en incrementar el apetito. Estrictamente, ratones deficientes para las orexinas sufren de narcolepsia, un trastorno caracterizado por la excesiva somnolencia diurna en los seres humanos (para los ratones, somnolencia nocturna). Más aún, informes muy recientes sugieren que el sistema orexina es disfuncional en una mayoría de los pacientes narcolépticos humanos: los péptidos orexina no pueden ser detectados en sus líquidos cefalorraquídeos (aunque no existe evidencia de mutación en sus genes orexina). Estos hallazgos conectan firmemente los neuropéptidos orexina y sus receptores tanto con el comportamiento de la alimentación como con el sueño en animales y en seres humanos.

Más recientemente un neuropéptido nuevo, el neuropéptido S, se identificó como el ligando para otro GPCR huérfano anterior. Luego, los investigadores demostraron que este neuropéptido modula una cantidad de funciones biológicas, incluyendo la ansiedad, la excitación, la locomoción y la memoria. Cabe preguntarse qué otros péptidos y pequeñas moléculas de hormonas permanecen por ser descubiertas y las ideas que el estudio de estos proporcionará a nuestro entendimiento del metabolismo, el crecimiento y el desarrollo humano.

Palabras clave

adenilciclase 692
adrenalina 688
agonista 682
AMP cíclico (cAMP) 679
amplificación de la señal 674
antagonista 682
arrestina 697
autocrino 676
calmodulina 679
cinasa 677
desensibilización 684
endocrino 675
ensayos de competición 682
fosfatasa 677
fosfolipasa C (PLC) 708
glucagón 699
glucogenólisis 699
hormona 673

óxido nítrico 711
paracrino 675
proteínas G triméricas 679
proteincinasa A (PCA) 701
proteincinasa C (PCC) 708
proteincinasa G (PCG) 711
receptores
 β -adrenérgicos 687
receptores acoplados
 a proteína G (GPCR) 674
receptores muscarínico
 de acetilcolina 693
rodopsina 694
segundos mensajeros 674
superfamilia de GTPasa 678
transducción de la señal 674
transducina 694
vía IP_3 /DAG 708

Revisión de los conceptos

1. ¿Qué características comunes son compartidas por la mayoría de los sistemas de señalización celular?
2. La señalización por moléculas extracelulares solubles puede ser clasificada como endocrina, paracrina o autocrina. Describa cómo difieren estos tres tipos de señalizaciones celulares. La hormona de crecimiento es secretada por la pituitaria, la cual se localiza en la base del cerebro y actúa a través de los receptores de hormona del crecimiento sobre el hígado. ¿Es este un ejemplo de señalización endocrina, paracrina o autocrina? ¿Por qué?

3. Un ligando se une a dos receptores diferentes con un valor de K_d de 10^{-7} M para el receptor 1 y un valor de K_d de 10^{-9} para el receptor 2. ¿Para qué receptor el ligando muestra la mayor afinidad? Calcular la fracción de receptores que tiene un ligando unido ($[RL]/R_t$) en el caso del receptor 1 y el receptor 2 si la concentración de ligando libre es 10^{-8} M.

4. Para comprender cómo funciona la vía de señalización, a menudo es útil aislar el receptor de superficie celular y medir la actividad de las proteínas efectoras corriente abajo en diferentes condiciones. ¿Cómo podría utilizar la cromatografía de afinidad para aislar un receptor de superficie celular? ¿Con qué técnica podría medir la cantidad de proteína G activada (la forma unida a GTP) en las células estimuladas por ligando? Describa el enfoque que aplicaría.

5. ¿Cómo hacen los siete dominios transmembranas de los receptores acoplados a proteína G para transmitir la señal a través de la membrana plasmática? En su respuesta, incluya los cambios conformacionales que se producen en el receptor en respuesta a la unión del ligando.

6. Las proteínas G triméricas que transducen la señal consisten en tres subunidades designadas α , β y γ . La subunidad G_α es una proteína interruptora GTPasa que alterna entre los estados activos e inactivos dependiendo de si está unido el GTP o el GDP. Revise los pasos para la activación inducida por ligando de las proteínas efectoras mediada por las proteínas G triméricas. Suponga que usted ha aislado una subunidad G_α mutante que ha incrementado la actividad GTPasa, ¿qué efectos tendría esta mutación en la proteína G y en la proteína efectora?

7. Explique cómo FRET podría utilizarse para seguir la asociación de $G_{\alpha s}$ y la adenilciclase después de la activación del receptor de adrenalina.

8. ¿Cuáles de los siguientes pasos amplifican la respuesta de la señal de la adrenalina en las células: la activación de la proteína G del receptor, activación de la proteína G de la adenilciclase (AC), activación cAMP de PCA o fosforilación de PCA de la glucógeno fosforilasa cinasas (GPC)? ¿Qué cambios tendrán mayores efectos sobre la amplificación de la señal: un aumento en el número de receptores de adrenalina o un aumento en el número de proteínas $G_{\alpha s}$?

9. La toxina del cólera, producida por la bacteria *Vibrio cholera*, causa diarrea en los individuos infectados. ¿Cuál es la base molecular para este efecto de la toxina?

10. Tanto la rodopsina en la visión como el sistema de receptor muscarínico de acetilcolina en el músculo cardíaco están acoplados a los canales iónicos a través de proteínas G. Describa las similitudes y las diferencias entre estos dos sistemas.

11. La adrenalina se une tanto a los receptores β -adrenérgicos como a los α -adrenérgicos. Describa las acciones opuestas sobre la proteína efectora, adenilciclase, suscitadas por la unión de adrenalina a estos dos tipos de receptores. Describa el efecto de la adición de un agonista o un antagonista a un receptor β -adrenérgico sobre la actividad de la adenilciclase.

12. En el hígado y el músculo, la estimulación por adrenalina de la vía cAMP activa la degradación de glucógeno e inhibe su síntesis,

mientras que en el tejido adiposo la adrenalina activa la hidrólisis de triglicéridos y en las otras células causa una diversidad de respuestas. ¿Qué pasos en las vías de señalización del cAMP en estas células especifican la respuesta celular?

13. La exposición continua de un receptor acoplado a proteína $G_{\alpha s}$ a su ligando lleva a un fenómeno conocido como desensibilización. ¿Cómo puede un receptor volver a su estado sensibilizado original? ¿Qué efectos tendría un receptor mutante que carece de sitios de fosforilación de serina o treonina sobre una célula?

14. ¿Cuál es el propósito de las proteínas asociadas a cinasa A (ACAP)? Describa cómo funcionan las ACAP en las células de músculo cardíaco.

15. El inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y el diacilglicerol (DAG) son moléculas de segundos mensajeros derivadas de la escisión del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) mediante la fosfolipasa C activada. Describa el papel del IP_3 en la elevación de la concentración de Ca^{2+} citosólico. ¿De qué forma restauran las células las concentraciones de Ca^{2+} citosólico? ¿Cuál es la principal función del DAG?

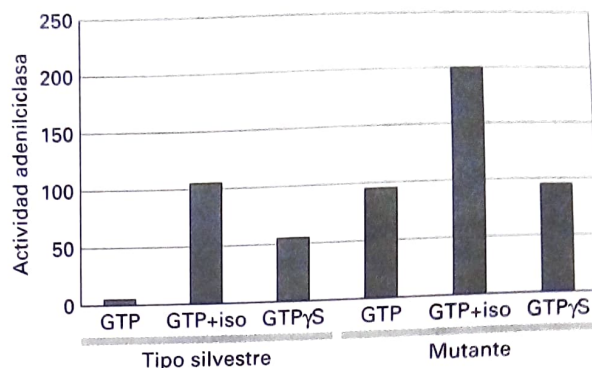
16. En el Capítulo 3, la K_d de las manos EF de la calmodulina para unir Ca^{2+} es de 10^{-6} M. Cantidad de proteínas tienen afinidades mucho más altas para sus respectivos ligandos. ¿Por qué es importante la afinidad específica de la calmodulina para los procesos de señalización del Ca^{2+} como los iniciados por la producción IP_3 ?

17. La mayoría de las respuestas fisiológicas de las células al cAMP son mediadas por activación de la PCA. El cGMP es otro segundo mensajero común. ¿Cuáles son las dianas del cGMP en las células del músculo liso y las células bastón?

Análisis de los datos

1. Las mutaciones en las proteínas G triméricas pueden causar muchas enfermedades en los seres humanos. Los pacientes con acromegalia suelen tener tumores pituitarios que secretan en exceso hormona de crecimiento (GH). La hormona liberadora de GH (GHRH) estimula la liberación de GH de la pituitaria mediante la unión de los receptores GHRH y estimula la adenilciclase. Los investigadores querían conocer si mutaciones en $G_{\alpha s}$ cumplían un papel en este trastorno. La clonación y la secuenciación del gen $G_{\alpha s}$ de tipo silvestre y del mutante de individuos normales y pacientes con tumores pituitarios revelaron una mutación con sentido erróneo en la secuencia génica $G_{\alpha s}$.

a. Para investigar el efecto de la mutación en la actividad $G_{\alpha s}$, los cDNA de $G_{\alpha s}$ mutante y de tipo silvestre se transfectaron a las células que carecen el gen $G_{\alpha s}$. Estas células expresan un receptor β -adrenérgico que puede ser activado por isoproterenol, un agonista del receptor β_2 -adrenérgico. Las membranas se aislaron a partir de células transfectadas y se ensayaron para la actividad de adenilciclase en presencia de GTP o el análogo de GTP resistente a hidrólisis, GTP γ S. A partir de la siguiente figura, ¿qué concluiría acerca del efecto de la mutación sobre la actividad $G_{\alpha s}$ en presencia de GTP solo en comparación con GTP γ S solo o GTP más isoproterenol (iso)?



b. En las células transfectadas descritas en la parte (a), ¿cuáles serían las concentraciones de cAMP en la célula transfectada con la $G_{\alpha s}$ de tipo silvestre y con la $G_{\alpha s}$ mutante? ¿Qué efectos podría tener esto en las células?

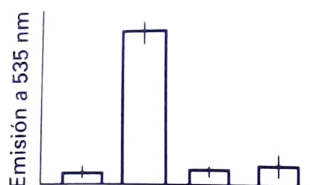
c. Para caracterizar aún más los defectos moleculares causados por esta mutación, se midió la actividad GTPasa intrínseca presente en ambos $G_{\alpha s}$, mutante y de tipo silvestre. Los ensayos para la actividad GTPasa mostraron que la mutación redujo la $k_{cat-GTP}$ (constante de velocidad de catálisis para la hidrólisis de GTP) desde un valor de tipo silvestre de $4,1 \text{ min}^{-1}$ a un valor mutante de $0,1 \text{ min}^{-1}$. ¿Qué concluiría acerca de los efectos de la mutación sobre la actividad GTPasa presente en la subunidad mutante G? ¿Cómo explican estos resultados de la GTPasa los resultados de la adenilciclase mostrados en la parte (a)?

2. La fosforilación de una proteína puede influir en su capacidad para interactuar con otras proteínas. Estas interacciones proteína-proteína cumplen un papel fundamental en las vías de transducción de la señal, y estas interacciones pueden ser identificadas usando numerosas técnicas, incluyendo transferencia de energía fluorescente (véase la Fig. 15-18). La proteína cinasa A (PCA) tiene muchos sustratos, uno de los cuales es la glucógeno fosforilasa cinasa, que tiene una estructura multimérica $(\alpha\beta\gamma\delta)_4$ que contiene dos subunidades reguladoras (α y β), la subunidad catalítica γ y la subunidad δ sensora de calcio.

a. Usted está utilizando transferencia de energía fluorescente para investigar las interacciones de PCA con la glucógeno fosforilasa cinasa y ha clonado una construcción de fusión de cDNA para tres de las cuatro subunidades diferentes (γ , β , δ), todas las cuales contienen una marca fluorescente que, cuando se expresa, se excita a 480 nm y emite fluorescencia a 535 nm. Usted también tiene cDNA que codifica el dominio catalítico de PCA fusionado a una marca que, cuando se expresa, se excita a 440 nm y emite a 480 nm. En el ensayo, si la proteína de fusión PCA interactúa con uno o más de los sustratos glucógeno fosforilasa cinasa marcados, la transferencia de energía desde la marca PCA excita la marca sobre el sustrato y provoca que este emita fluorescencia a 535 nm, y esto puede ser detectado.

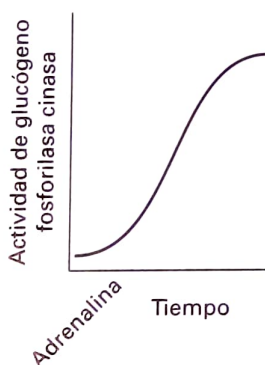
Las células hepáticas son transfectadas con la construcción de fusión PCA sola (control) o con la construcción de fusión PCA más una de las construcciones de glucógeno fosforilasa cinasa etiquetada y más tarde tratada con adrenalina. Las emisiones de fluorescencia a 535 nm, resultantes de los cuatro experimentos de transfección diferentes, repetidos tres veces, se muestran en el siguiente gráfico. Las marcas de las cuatro barras en el gráfico muestran la emisión de PCA por sí misma, PCA + la subunidad γ , PCA + la subunidad β , y PCA +

la subunidad δ . Explique por qué solo hay un pico principal y por qué los valores representados por las otras tres barras no son significativamente distintos entre sí.



b. ¿Qué combinación anterior produciría emisión a 535 nm si el experimento se repitiera pero en lugar de adrenalina se utilizara dibutiril-cAMP, el cual cruza libremente la membrana plasmática?

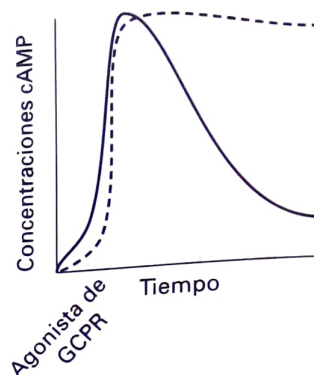
c. Como se describió anteriormente, existen tres subunidades reguladoras de glucógeno fosforilasa cinasa, ambas sujetas a modificaciones postraduccionales. Si el gen que codifica la subunidad α contiene mutaciones con sentido erróneo por lo cual durante la traducción todos los residuos de serinas, treoninas y tirosinas fueron convertidos a algún otro aminoácido, ¿cómo podría esto afectar la subunidad sensora de calcio de la glucógeno fosforilasa cinasa? La actividad de la glucógeno fosforilasa cinasa en las células tratadas con adrenalina se muestra en el siguiente gráfico.



Dibuje qué actividad se vería así en comparación con las células tratadas con adrenalina que expresan la subunidad α que contiene las mutaciones con sentido erróneo descritas anteriormente.

3. El cAMP es un segundo mensajero que regula diversas funciones. En el lumen intestinal, el cAMP es responsable del mantenimiento del equilibrio electrolítico e hídrico. Ciertas toxinas bacterianas, incluyendo la producida por *Vibrio cholera*, pueden perturbar las concentraciones de cAMP y llevar a deshidratación mortal.

a. Dado lo que usted conoce acerca del mecanismo de la toxina de *Vibrio cholera*, marque el siguiente gráfico y muestre la concentración de cAMP en (1) células epiteliales intestinales normales tratadas con un agonista de GPCR para activar $G_{\alpha s}$ y (2) células tratadas con toxina del cólera estimuladas con el mismo agonista de GPCR. Explique cómo llegó a estas conclusiones.



b. ¿Es de esperar concentraciones de PCA más altas o más bajas en células tratadas con la toxina del cólera?

Referencias

Transducción de la señal: desde la señal extracelular hasta la respuesta celular

- Cabrera-Vera, T. M., et al. 2003. Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocr. Rev.* 24:765-781.
- Grecco, H., M. Schmick, and P. Bastiaens. 2011. Signaling from the living plasma membrane. *Cell* 144:897-909.
- Kornev, A., and S. S. Taylor. 2010. Defining the conserved internal architecture of a protein kinase. *Biochim. Biophys. Acta* 1804:440-444.
- Manning, G., et al. 2002. Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. *Trends Biochem. Sci.* 27:514-520.
- Manning, G., et al. 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298:1912-1934.
- Taylor, S. S., and A. Kornev. 2011. Protein kinases: evolution of dynamic regulatory proteins. *Trends Biochem. Sci.* 36:65-77.
- Vetter, I. R., and A. Wittinghofer. 2001. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 294:1299-1304.

Estudio de los receptores de la superficie celular y proteínas que transducen las señales

- Gross, A., and H. F. Lodish. 2006. Cellular trafficking and degradation of erythropoietin and NESF. *J. Biol. Chem.* 281: 2024-2032.
- Lauffenburger, D., and J. Linderman. 1993. Receptors: models for binding, trafficking, and signaling. New York: Oxford University Press.
- Selinger, Z. 2008. Discovery of G protein signaling. *Ann. Rev. Biochem.* 77:1-13.
- Tarrant, M., and P. Cole. 2009. The chemical biology of protein phosphorylation. *Ann. Rev. Biochem.* 78:797-825.

Receptores acoplados a proteína G: estructura y mecanismo

- Birnbaumer, L. 2007. The discovery of signal transduction by G proteins: a personal account and an overview of the initial findings and contributions that led to our present understanding. *Biochim. Biophys. Acta* 1768:756-771.
- Oldham, W. M., and H. E. Hamm. 2008. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9:60-71.
- Rosenbaum, D., S. Rasmussen, and B. Koblika. 2008. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* 459:356-363.

- Schwartz, T., and W. Hubbell. 2008. Structural biology: a moving story of receptors. *Nature* **454**:473.
- Sprang, S. 2011. Cell signaling: binding the receptor at both ends. *Nature* **469**:172-173.
- Tesmer, J. 2010. The quest to understand heterotrimeric G protein signalling. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**:650-652.
- Warne, T., et al. 2008. Structure of a (β 1)-adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* **454**: 486-491.

Receptores acoplados a proteína G que regulan los canales iónicos

- Burns, M., and V. Arshavsky. 2005. Beyond counting photons: trials and trends in vertebrate visual transduction. *Neuron* **48**:387-401.
- Calvert, P., et al. 2006. Light-driven translocation of signaling proteins in vertebrate photoreceptors. *Trends Cell Biol.* **16**:560-568.
- Hofmann, K. P., et al. 2009. A G protein-coupled receptor at work: the rhodopsin model. *Trends Biochem. Sci.* **34**:540-552.
- Smith, S. O. 2010. Structure and activation of the visual pigment rhodopsin. *Ann. Rev. Biophys.* **39**:309-328.

Receptores acoplados a proteína G que activan o inhiben la adenilciclase

- Agius, L. 2010. Physiological control of liver glycogen metabolism: lessons from novel glycogen phosphorylase inhibitors. *Mini-Rev. Med. Chem.* **10**:1175-1187.
- Carnegie, G., C. Means, and J. Scott. 2009. A-kinase anchoring proteins: from protein complexes to physiology and disease. *IUBMB Life* **61**(4):394-406.
- Dessauer, C. 2009. Adenylyl cyclase-A-kinase anchoring protein complexes: the next dimension in cAMP signaling. *Mol. Pharmacol.* **76**:935-941.
- DeWire, S., et al. 2007. (β -Arrestins and cell signaling. *Ann. Rev. Physiol.* **69**:483-510.

- Johnson, L. N. 1992. Glycogen phosphorylase: control by phosphorylation and allosteric effectors. *FASEB J.* **6**:2274-2282.

- Lefkowitz, R. J., and S. K. Shenoy. 2005. Transduction of receptor signals by β -arrestins. *Science* **308**:512-517.

- Rajagopal, S., K. Rajagopal, and R. J. Lefkowitz. 2010. Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**:373-386.

- Somsak, L., et al. 2008. New inhibitors of glycogen phosphorylase as potential antidiabetic agents. *Curr. Med. Chem.* **15**:2933-2983.

- Taylor, S. S., et al. 2005. Dynamics of signaling by PKA. *Biochim. Biophys. Acta* **1754**:25-37.

- Taylor, S. S., et al. 2008. Signaling through cAMP and cAMP-dependent protein kinase: diverse strategies for drug design. *Biochim. Biophys. Acta* **1784**:16-26.

Receptores acoplados a proteína G que desencadenan elevaciones en el Ca^{2+} citosólico

- Cahalan, M. 2010. How to STIMulate calcium channels. *Science* **130**:43.
- Chin, D., and A. R. Means. 2000. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol.* **10**:322-328.
- Duda, T. 2009. Atrial natriuretic factor-receptor guanylate cyclase signal transduction mechanism. *Mol. Cell Biochem.* **334**:37-51.
- Hoeflich, K. P., and M. Ikura. 2002. Calmodulin in action: diversity in target recognition and activation mechanisms. *Cell* **108**:739-742.
- Hogan, P. G., R. S. Lewis, and A. Rao. 2010. Molecular basis of calcium signaling in lymphocytes: STIM and ORAL. *Ann. Rev. Immunol.* **28**:491-533.
- Parekh, A. 2011. Decoding cytosolic Ca^{2+} oscillations. *Trends Biochem. Sci.* **36**:78-87.
- Zhou, Y., et al. 2010. Pore architecture of the ORAI1 store-operated calcium channel. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* **107**:4896-4901.

La infancia de la transducción de señales: estimulación GTP de la síntesis de cAMP

M. Rodbell y cols., 1971, *J. Biol. Chem.* **246**:1877

A finales de la década de 1960, el estudio de la acción de las hormonas había crecido como consecuencia del descubrimiento de que el adenosina monofosfato cíclico (cAMP) funcionaba como un segundo mensajero, uniendo la activación mediada por hormona de un receptor a la respuesta celular. Diseñando un sistema experimental para investigar la síntesis de cAMP inducida por hormona, Martin Rodbell descubrió una nueva entidad importante en la señalización intracelular: el guanosina trifosfato (GTP).

Antecedentes

El descubrimiento del papel del GTP en regular la transducción de señales comenzó con los estudios acerca de cómo el glucagón y otras hormonas enviaban señales a lo largo de la membrana plasmática que finalmente provocaban respuestas celulares. Al principio de los trabajos de Rodbell, se sabía que la unión del glucagón a un receptor proteico específico embebido en la membrana estimulaba la producción de cAMP. La formación de cAMP a partir de ATP es catalizada por una enzima unida a membrana denominada adenilciclase. Se había propuesto que la acción del glucagón y de otras hormonas estimuladoras del cAMP se basaba en otros componentes moleculares que acoplaban la activación del receptor para la producción de cAMP. Sin embargo, en estudios con membranas celulares aisladas conocidas como "fantasmas", Rodbell y sus colegas no lograron proveer más claves acerca de cómo la unión del glucagón llevaba a un aumento en la producción de cAMP. Rodbell comenzó una serie de estudios en un nuevo sistema desarrollado fuera de la célula, purificado a partir de membranas de hígado de rata, que retenía la unión a la membrana y las proteínas asociadas a ésta. Finalmente, dichos experimentos condujeron al descubrimiento de que el GTP era requerido para la estimulación de la adenilciclase a partir del glucagón.

El experimento

Una de las primeras metas de Rodbell fue caracterizar la unión del glucagón a su receptor en el sistema sin células de membrana de hígado de rata. Primero, las membranas purificadas de hígado de rata fueron incubadas con glucagón marcado con el isótopo radiactivo del yodo [^{125}I]. Luego, las membranas fueron separadas del glucagón [^{125}I] no unido a ellas por centrifugación. Una vez que se estableció que el glucagón marcado se uniría, en efecto, con las membranas purificadas de células de hígado de rata, el estudio continuó para determinar si esta unión conducía directamente a la activación de la adenilciclase y a la producción de cAMP en las membranas purificadas de células de hígado de rata.

La producción de cAMP en un sistema libre de célula requiere de la adición de ATP, el sustrato de la adenilciclase, Mg^{2+} , y un sistema regenerador de ATP que consiste en creatina cinasa y fosfocreatina.

Sorprendentemente, cuando el experimento de unión de glucagón fue repetido en presencia de estos factores adicionales, Rodbell observó un 50% de disminución en la unión del glucagón. La unión completa podía ser restaurada solo cuando se omitía el ATP de la reacción. Esta observación inspiró una investigación acerca del efecto de los nucleósidos trifosfatos sobre la unión del glucagón a su receptor. Demostró que a concentraciones relativamente altas (es decir, milimolar) no solamente el ATP sino también la uridina trifosfato (UTP) y la citidina trifosfato (CTP) reducían la unión del glucagón marcado. En contraste, la reducción de la unión del glucagón en presencia de GTP ocurrió en concentraciones mucho menores (micromolar). Además, se encontró que bajas concentraciones de GTP estimulaban la disociación del glucagón unido al receptor. Tomando todos estos resultados en conjunto, los estudios sugerían que el GTP alteraba al receptor de glucagón de modo que disminuía su afinidad por el

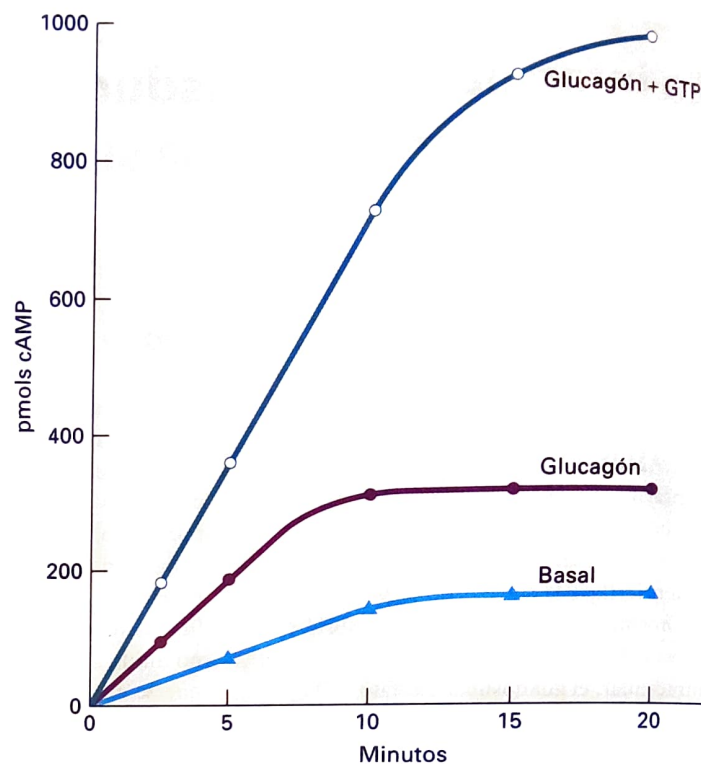
glucagón. Esta reducción de la afinidad afectaba la habilidad del glucagón de unirse al receptor y fomentaba la disociación de las uniones de glucagón.

La observación de que el GTP se encontraba involucrado en la acción del glucagón condujo a una segunda pregunta clave: ¿puede el GTP ejercer también un efecto sobre la adenilciclase? Responder esta respuesta experimentalmente requería de la adición de ATP, como sustrato para la adenilciclase, y GTP, el factor por analizar, a las membranas purificadas de hígado de ratas. Sin embargo, un estudio previo había mostrado que la concentración de ATP requerida como sustrato de la adenilciclase podría afectar la unión del glucagón. ¿Podría también estimular a la adenilciclase? La concentración de ATP utilizado en el experimento no podía ser reducida dado que el ATP se encontraba ya hidrolizado por las ATPasas presentes en la membrana de hígado de rata. Para salir del dilema, Rodbell sustituyó ATP con el análogo AMP, 5'adenil imidodifosfato (AMP-PNP), que puede ser convertido en cAMP por la adenilciclase, pero es resistente a la hidrólisis de las ATPasas de membrana. Ahora podía realizarse el experimento crítico. Las membranas purificadas de hígado de rata fueron tratadas con glucagón en presencia y en ausencia de GTP, y se midió la producción de cAMP a partir de AMP-PNP. La adición de GTP claramente estimuló la producción de cAMP en comparación con el glucagón solo (Fig. 1), lo que indicó que el GTP afecta no solo la unión del glucagón a su receptor, sino que también estimula la activación de la adenilciclase.

Análisis

Dos factores clave condujeron a Rodbell y sus colaboradores a detectar el papel del GTP en la transducción de señales, mientras que estudios previos habían fallado. Primero, cambiar de una célula grasa fantasma al sistema de membrana de hígado de rata le permitió a Rodbell y a sus colegas evitar la

FIGURA 1 Efecto del GTP en la producción de cAMP estimulado por glucagón a partir de AMP-PNP purificado de membranas de hígado de ratón. En ausencia de GTP, el glucagón estimula la formación de cAMP dos veces sobre el nivel basal en ausencia de la hormona agregada. Cuando se agrega también GTP, la producción de cAMP se incrementa hasta 5 veces. (Adaptado de M. Rodbell y cols., 1971, *J. Biol. Chem.* **246**:1877.)

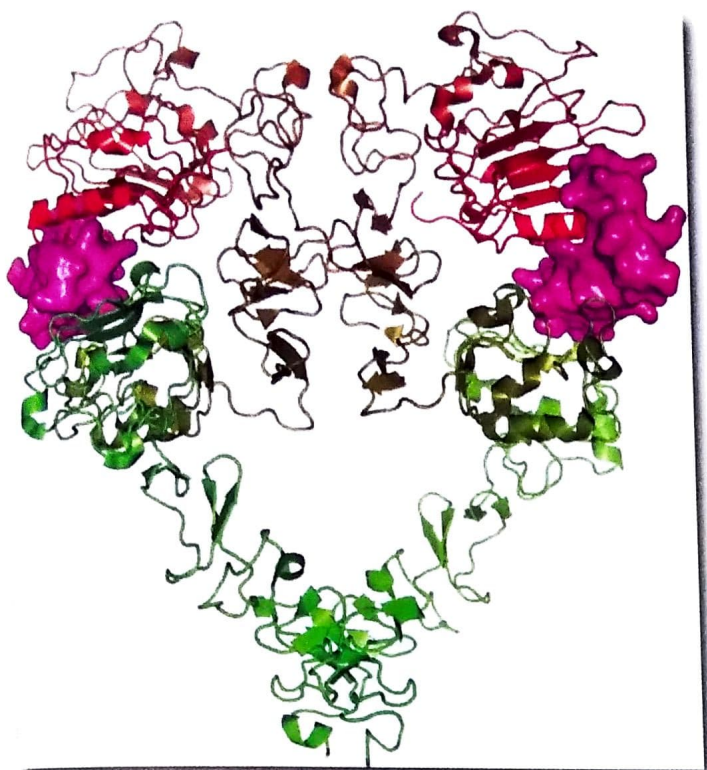


contaminación de su sistema libre de células con GTP, un problema asociado al procedimiento del aislamiento de fantasmas. Dicha contaminación enmascararía los efectos de GTP en la unión del glucagón y la activación de la adenilciclase. Segundo, cuando se mostró por primera vez que el ATP influenciaba la unión del glucagón, Rodbell simplemente no aceptó la explicación plausible de que el ATP, el sustrato de la adenilciclase, también afectaba la unión del glucagón. En cambio, eligió poner a prueba los efectos de la unión de otros nucleósidos trifosfatos comunes. Luego notó que sabía que las preparaciones comerciales de ATP se encontraban muchas veces contaminadas con bajas concentracio-

nes de otros nucleósidos trifosfatos. La posibilidad de una contaminación le sugirió que pequeñas concentraciones de GTP podrían ejercer grandes efectos en la unión del glucagón y la estimulación de la adenilciclase.

Esta serie crítica de experimentos estimuló un gran número de estudios en el papel de GTP en la acción hormonal, lo que eventualmente condujo al descubrimiento de las proteínas G, las proteínas de unión al GTP que se unen a ciertos receptores a la adenilciclase. Seguidamente, una enorme familia de receptores que requieren proteínas G para transducción de sus señales fueron identificadas en eucariotas, desde la levadura hasta seres humanos. Estos receptores acoplados

a proteínas G están involucrados en la acción de muchas hormonas, como también en otras actividades biológicas, incluyendo neurotransmisión y respuesta inmunitaria. Se sabe que la unión de los ligandos a su receptor afin acoplado a proteína G estimula la asociación de proteínas G asociadas a unirse a GTP. Esta unión causa la transducción de señales que luego estimula a la adenilciclase a producir cAMP y también a la desensibilización del receptor, que después libera el ligando. Ambos efectos fueron observados en los experimentos de Rodbell en la acción del glucagón. Por estas observaciones pioneras, Rodbell recibió el premio Nobel en Fisiología y Medicina en 1994.



Vías de señalización que controlan la expresión génica

Una tarjeta de San Valentín molecular: un dominio extracelular dimerizado del receptor del factor de crecimiento epidérmico (rojo, amarillo y verde) unido a dos moléculas de factor de crecimiento epidérmico (magenta).

(Cortesía de Jiahai Shi.)

Las señales extracelulares pueden tener efectos tanto a corto como a largo plazo sobre las células. Los efectos a corto plazo habitualmente son desencadenados por la modificación de proteínas o de enzimas existentes, como vimos en el Capítulo 15. Muchas señales extracelulares también afectan la expresión génica y así inducen cambios a largo plazo en la función celular. Los cambios a largo plazo incluyen alteraciones en la división y la diferenciación celular, tal como ocurre durante el desarrollo y la determinación del destino celular. La producción corporal de los eritrocitos, los linfocitos y las plaquetas en respuesta a las *citocinas* es un buen ejemplo de cambios inducidos por señales en la expresión génica que influyen en la proliferación y la diferenciación celular. Los cambios en la expresión génica también permiten que las células diferenciadas respondan a su ambiente, cambiando su forma, su metabolismo o su movimiento. En las células del sistema inmunitario, por ejemplo, varias hormonas activan un tipo de factor de transcripción (NF- κ B) que finalmente impacta sobre la expresión de más de 150 genes implicados en la respuesta inmunitaria a la infec-

ción. Dado el extenso papel de la transcripción génica en la mediación de aspectos críticos del desarrollo, el metabolismo y el movimiento, no resulta sorprendente que las mutaciones en este tipo de vías de señalización provoquen muchas enfermedades humanas, incluyendo el cáncer, la diabetes y enfermedades inmunitarias.

La transcripción de genes se ve afectada por la estructura de la cromatina, modificaciones epigenéticas en las histonas y otras proteínas nucleares y el complemento celular de factores de transcripción y de otras proteínas (véase el Cap. 7). Estas propiedades determinan qué genes de la célula pueden potencialmente transcribirse en cualquier momento dado; pensamos en estas propiedades de las células como su “memoria”, determinada por su historia y la respuesta a señales previas. Resulta importante que muchos factores de transcripción centrales se mantengan en un estado inactivo en el citosol o el núcleo y se activen solamente en respuesta a señales externas, lo que de este modo induce la expresión de un conjunto de genes que son específicos para este tipo celular.

CONTENIDO

16.1	Receptores que activan las tirosincinasas proteicas	723	16.5	Vías de señalización controladas por ubiquitinación: Wnt, Hedgehog y NF-κB	752
16.2	La vía de la Ras/MAP cinasa	734	16.6	Vías de señalización controladas por la escisión proteica: Notch/Delta, SREBP	760
16.3	Las vías de señalización de los fosfoinosítidos	745	16.7	Integración de las respuestas celulares a múltiples vías de señalización	765
16.4	Las serina-cinasas receptoras que activan Smad	748			

En este capítulo, exploramos las principales vías de señalización que emplean las células para afectar la expresión de los genes. En los eucariontes, hay aproximadamente una docena de receptores muy conservados de la superficie celular, y estos activan varios tipos de vías de transducción de las señales intracelulares muy conservadas. Muchas de estas vías consisten en múltiples proteínas, pequeñas moléculas intracelulares e iones, tales como el Ca^{2+} , que, juntos, forman una cascada compleja. Dada esta complejidad, la señalización celular puede parecer un tema abrumador para aprender por primera vez; los múltiples nombres y la abreviatura de las moléculas que aparezcan en cada vía pueden, de hecho, constituir un desafío. El tema requiere un estudio cuidadoso; sin embargo, cuando uno se familiariza con estas vías, comprende en profundidad el modo en que los mecanismos de regulación controlan una gran diversidad de procesos biológicos.

Por simplicidad, las vías de transducción de las señales pueden ser agrupadas en varios tipos básicos, de acuerdo con la secuencia de eventos intracelulares. En un tipo de vía de transducción de las señales muy común (Fig. 16-1a), la unión de ligandos a un receptor desencadena la activación de una cinasa asociada a este. Esta cinasa puede ser una parte intrínseca de la proteína receptora o estar estrechamente unida al receptor. Con frecuencia, estas cinasas directamente fosfori-

lan y activan una diversidad de proteínas de transducción de la señal, que incluyen factores de transcripción localizados en el citosol (Fig. 16-1a, **1**). Algunas cinasas receptoras también activan pequeñas proteínas “interruptoras” que se unen al GTP, tales como la Ras (Fig. 16-1a, **2**). Otros receptores, principalmente los siete receptores que se expanden presentados en el Capítulo 15, activan las proteínas G_{α} de mayor tamaño que se unen a GTP (Fig. 16-1b). Ambos tipos de proteínas que se unen a GTP pueden activar proteínas cinasas que a su vez fosforilan múltiples proteínas diana, que incluyen los factores de transcripción. Muchas vías de transducción de las señales, tales como las activadas por Ras, implican a varias cinasas en las cuales una cinasa fosforila y, de este modo, activa (u ocasionalmente inhibe) la actividad de otra cinasa.

En otras vías de señalización adicionales, en las cuales la unión de un ligando a un receptor desencadena el desensamblaje de un complejo multiproteico en el citosol, libera un factor de transcripción que luego se transloca al núcleo (Fig. 16-1c). Finalmente, en el último tipo común, la escisión proteolítica de un inhibidor o el propio receptor libera un factor de transcripción activo, que luego viaja al núcleo (Fig. 16-1d). Mientras que cada vía de señalización tiene sus propias sutilezas y distinciones, cada una de ellas puede ser agrupada en uno de estos tipos básicos.

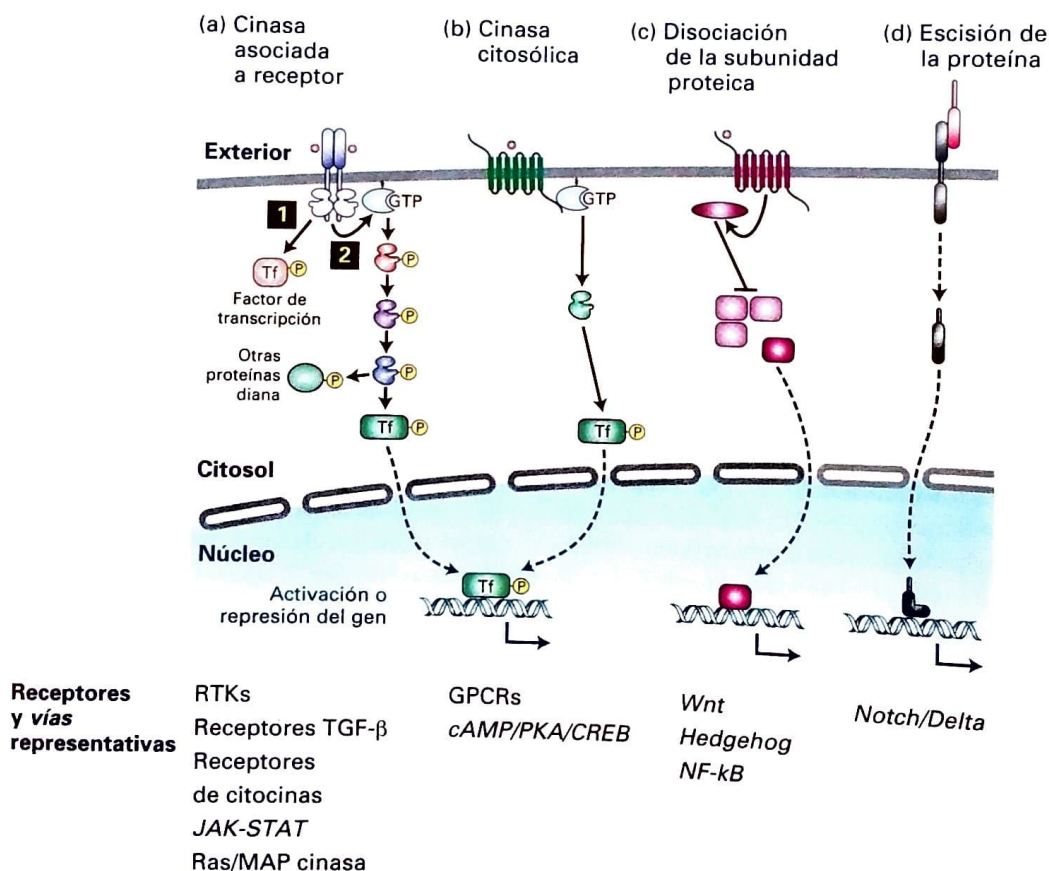


FIGURA 16-1 Varios receptores comunes de la superficie celular y en vías de transducción de las señales. (a) Los dominios citosólicos de muchos receptores contienen dominios de proteincinasas o están estrechamente asociados con una cinasa citosólica; por lo general, las cinasas son activadas por la unión de un ligando seguido de la dimerización del receptor. Algunas de estas cinasas directamente fosforilan y activan factores de transcripción (**1**) u otras proteínas de señalización. Muchos de estos receptores también activan pequeñas proteínas “interruptores” que unen GTP, tales como la Ras (**2**). Muchas vías de transducción de las señales, como aquellas activadas por la Ras, involucran a varias cinasas en las cuales una fosforila y de este modo activa (u ocasional-

mente inhibe) la actividad de otra cinasa. Muchas de las cinasas de estas vías fosforilan múltiples dianas proteicas que pueden ser diferentes en distintas células, incluyendo los factores de transcripción. (b) Otros receptores, principalmente los siete que se extienden en la membrana, activan las proteínas G_{α} , u otras proteínas de señalización. (c) Varias vías de señalización involucran el desensamblaje de un complejo multiproteico en el citosol y liberan un factor de transcripción que luego se transloca al interior del núcleo. (d) Algunas vías de señalización son irreversibles; en muchos casos, la escisión proteolítica de un receptor libera un factor de transcripción activo.

Las vías que analizaremos en este capítulo se han conservado durante la evolución y operan casi del mismo modo en las moscas, los gusanos y los seres humanos. La homología básica que se exhibe entre las proteínas en estas vías le permitió a los investigadores estudiarlas en una variedad de sistemas experimentales. Por ejemplo, la proteína de señalización secretada Hedgehog (Hh) y su receptor se identificaron inicialmente en los mutantes de *Drosophila*. Con posterioridad, se clonaron homólogos de estas proteínas en seres humanos y ratones, y mostraron participar en un número de eventos de señalización importantes durante la diferenciación y dieron como resultado el descubrimiento de que la activación anormal de las vías de Hh aparece en varios tumores humanos. Estos descubrimientos ilustran la importancia de estudiar las vías de señalización tanto genética (en moscas, ratones, gusanos, levaduras y otros organismos) como bioquímicamente.

Ninguna vía de señalización actúa de modo aislado. Muchas células responden a múltiples tipos de hormonas y otras moléculas de señalización; algunas células de mamífero expresan ~ 100 tipos diferentes de receptores de la superficie celular, cada uno de los cuales se une a un ligando distinto. Dado que muchos genes están regulados por múltiples factores de transcripción que a su vez se activan o están reprimidos por diferentes vías de señalización intracelulares, la expresión de cualquiera de estos genes puede estar regulada por múltiples señales extracelulares. En especial durante etapas tempranas del desarrollo, esta "conversación cruzada" entre las vías de señalización y las alteraciones secuenciales resultantes en el patrón de expresión génica finalmente pueden ser tan extensas que la célula adquiere un destino de desarrollo distinto. En este capítulo, veremos de qué manera múltiples vías de señalización interactúan para regular aspectos cruciales del metabolismo, tales como el nivel de glucosa en sangre y la formación de células adiposas.

16.1 Receptores que activan las tirosincinasas proteicas

Comenzamos con un análisis de las dos grandes clases de receptores que activan las tirosincinasas proteicas. Las tirosincinasas proteicas, de las cuales hay aproximadamente 90 en el genoma humano, fosforilan

residuos específicos de tirosina en las proteínas diana, por lo general en el contexto de una secuencia lineal específica de aminoácidos en la cual está inserta la tirosina. Luego, las proteínas diana fosforiladas pueden activar una o más vías de señalización. Esas vías son valiosas porque regulan la mayoría de los aspectos de la proliferación, la diferenciación, la supervivencia y el metabolismo celular.

Hay dos amplias categorías de receptores que activan las tirosincinasas: (1) aquellas en las cuales la enzima tirosincinasa es parte intrínseca de la cadena polipeptídica del receptor (codificada por el mismo gen), llamados **receptores tirosincinasa (RTK)**, y (2) aquellos, como los **receptores de citocinas**, en los cuales el receptor y la cinasa son codificados por genes diferentes, si bien unidos fuertemente entre sí. Para los receptores de citocinas, la cinasa fuertemente unida se conoce como *JAK cinasa*. Ambas clases de receptores activan vías de transducción de la señal intracelulares semejantes y, por lo tanto, los consideraremos juntos en esta sección (Fig. 16-2).

Exploraremos cada una de estas importantes vías en las secciones siguientes de este capítulo. En esta sección, nos fijaremos en los receptores en sí, y mostraremos de qué manera la unión de los ligandos lleva a la activación de la cinasa. Comenzaremos con los RTK y luego nos centraremos en los receptores de citosina. Después de analizar de qué manera ambos tipos de receptores son activados, exploraremos parte de las moléculas corriente abajo que están vinculadas en la activación. En la última parte de la sección, analizaremos cómo la señalización derivada de los RTK y los receptores de citosina se reprimen.

Numerosos factores que regulan la división celular y el metabolismo son ligandos para los receptores tirosincinasas

Las moléculas de señalización que activan los RTK son péptidos solubles o unidos a membrana u hormonas proteicas, incluyendo muchas que inicialmente identificamos como factores de crecimiento para tipos celulares específicos. Estos ligandos de RTK incluyen muchos, como el factor de crecimiento neural (NGF), el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF), que esti-

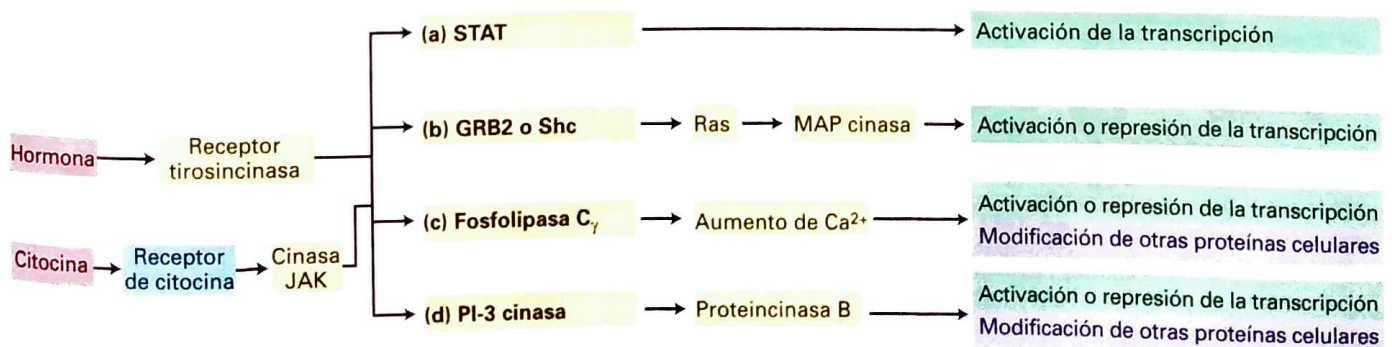


Figura 16-2 Panorama general de las vías de transducción de las señales desencadenadas por receptores que activan tirosincinasas proteicas. Ambos, los RTK y los receptores de citocinas, activan múltiples vías de transducción de las señales que por último regulan la transcripción de los genes. (a) En la vía más directa, empleada principalmente por los receptores de las citocinas, un factor de transcripción STAT se une al receptor activado, se fosforila, se mueve al núcleo y activa directamente la transcripción (véase

la Sección 16.1). (b) La unión de un tipo de proteína adaptadora (GRB2 o Shc) a un receptor activado conduce a la activación de la vía de la Ras/cinasa MAP (véase la Sección 16.2). (c, d) Dos vías de fosfoinosítidos son desencadenadas por el reclutamiento de la fosfolipasa C_γ y la cinasa PI-3 a la membrana (véase la Sección 16.3). Los niveles elevados de Ca^{2+} y de proteincinasa B activada modulan la actividad de los factores de transcripción como así de las proteínas citosólicas implicadas en las vías metabólicas o el movimiento o forma celular.

mulan la proliferación y la diferenciación de tipos celulares específicos. Otros, como la insulina, regulan la expresión de múltiples genes que controlan el metabolismo de azúcares y lípidos en el hígado, el músculo y las células adiposas (grasas). Muchos RTK y sus ligandos fueron identificados en estudios de cánceres humanos asociados con formas mutantes de receptores de factores de crecimiento que estimulan la proliferación aun en ausencia del factor de crecimiento. La mutación “engaña” al receptor para que se comporte como si el ligando estuviese presente en todas las ocasiones y, de este modo, el receptor se encuentra constantemente en estado activo (activo *constitutivamente*). Otros RTK han sido descubiertos durante el análisis de mutaciones del desarrollo que conducen a bloqueos en la diferenciación de ciertos tipos de *C. elegans*, *Drosophila* y ratones.

La unión del ligando promueve la dimerización de un RTK y conduce a la activación de su cinasa intrínseca

Todos los RTK tienen tres componentes esenciales: un dominio extracelular que contiene un sitio de unión al ligando, una hélice α hidrofóbica única que atraviesa la membrana y un segmento citosólico que incluye un dominio con actividad de tirosincinasa proteica (Fig. 16-3). La mayoría de los RTK son monoméricos, y un ligando que se une al dominio extracelular induce la formación de dímeros del receptor. La formación de dímeros funcionales es un paso necesario para la activación de todos los RTK. Llamamos a este proceso de dos (o más) receptores que se unen “activación por oligomerización del receptor”. Como veremos, esta oligomerización de los receptores de la superficie celular es un mecanismo común para la activación de múltiples tipos de receptores.

La activación de los RTK puede ser resumida del siguiente modo: en reposo, estado no estimulado (sin ligando unido), la actividad de cinasa intrínseca de un RTK es muy baja (véase la Fig. 16-3, paso 1). Al igual que la mayoría de otras cinasas, los RTK contienen un dominio flexible denominado el *labio de activación*. En estado de reposo, el labio de activación no está fosforilado y asume una conformación que bloquea la actividad de cinasa. En algunos receptores (p. ej., el receptor de insulina), evita la unión del ATP. En otros (p. ej., el receptor de FGF) evita la unión al sustrato. La unión al ligando causa un cambio de conformación que promueve la dimerización de los dominios extracelulares de los RTK, lo cual hace que sus segmentos transmembrana (y, por lo tanto, sus dominios citosólicos) se acerquen. Entonces, la cinasa de una subunidad fosforila un residuo de tirosina particular en el labio de activación de la otra subunidad (Fig. 16-3, paso 2). Esta fosforilación lleva a un cambio de conformación en el labio de activación que desbloquea, y de este modo activa, la actividad de la cinasa mediante la reducción K_m para que el ATP o el sustrato se fosforilen. La actividad de cinasa aumentada resultante puede entonces fosforilar residuos de tirosina adicionales en el dominio citosólico del receptor (Fig. 16-3, paso 3), como así también fosforilar otras proteínas diana, lo que lleva a la señalización intracelular.

Aunque la dimerización es un paso necesario en la activación de todos los RTK, pueden formarse dímeros funcionales de muchos modos. Por ejemplo, la unión de un EGF a su RTK desencadena un cambio de conformación en el dominio extracelular del receptor de modo que “pinza” el ligando. Esta acción empuja un bucle localizado entre los dos dominios de unión al EGF, y las interacciones entre los dos segmentos extendidos (“activados”) de los bucles permiten la formación de un dímero funcional del receptor (Fig. 16-4). En otros casos, como el del receptor del factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF), cada uno de

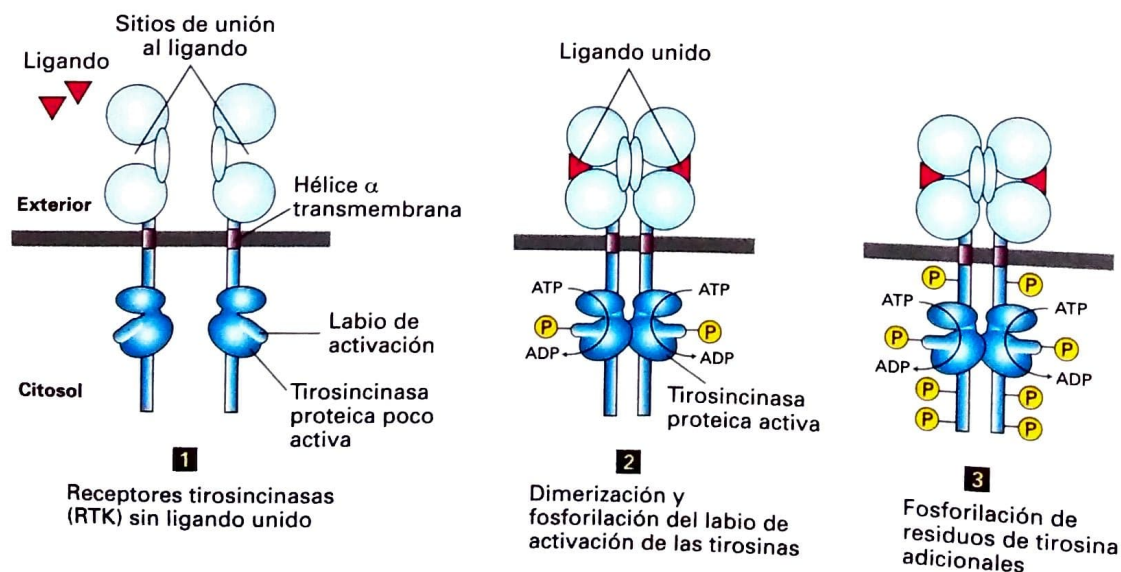


FIGURA 16-3 Estructura general y activación de los receptores tirosincinasas (RTK). El dominio citosólico de los RTK contiene un sitio catalítico intrínseco de la proteintirosincinasa. En ausencia de ligando (1), los RTK en general existen como monómeros con cinasas de baja actividad. La unión de los ligandos provoca un cambio de conformación que promueve la formación de un receptor dímérico funcional, que une dos cinasas de baja actividad y entonces se fosforilan entre sí en un residuo de tirosina en el

labio de activación (2). La fosforilación hace que este labio se mueva hacia el exterior del sitio catalítico de la cinasa e incrementa de este modo la capacidad del ATP y del sustrato proteico para unirse. Entonces, la cinasa activada fosforila varios residuos de tirosina en el dominio citosólico del receptor (3). Las de transducción de la señal.

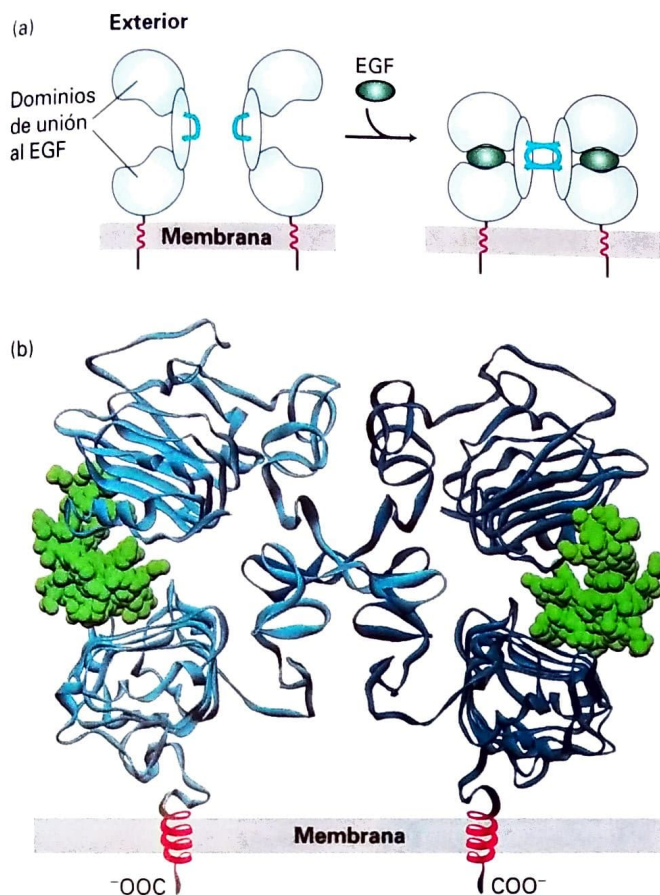
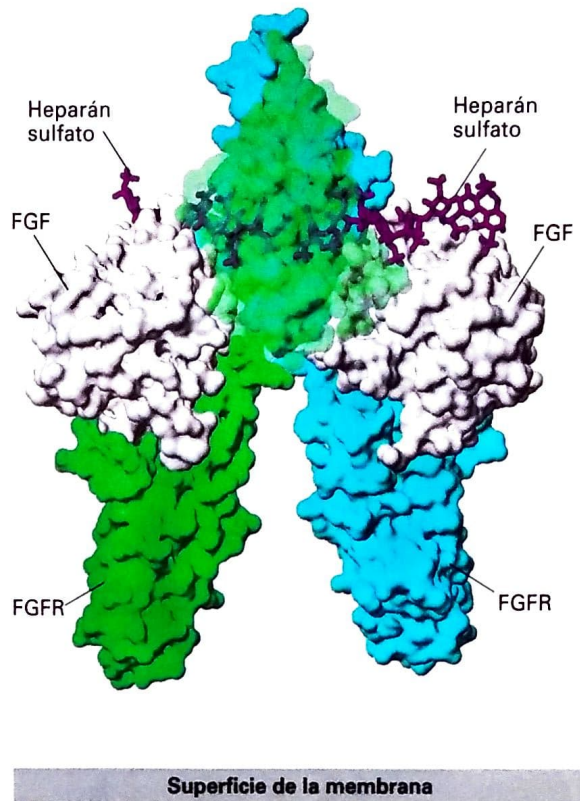


FIGURA 16-4 Dimerización inducida por ligando del HER1, un receptor humano para el factor de crecimiento epidérmico (EGF). (a) Dibujo esquemático de los dominios extracelular y transmembrana del HER1, que es un receptor tirosincinasa. Al unir una molécula de EGF a un receptor monomérico, se provoca una alteración en la estructura de un bucle entre los dos dominios de unión al EGF. La dimerización de los dos monómeros de receptor unidos al ligando idéntico en el plano de la membrana ocurre primariamente a través de las interacciones entre los dos segmentos del bucle "activados". (b) Estructura de la proteína HER1 dimerizada unida a un factor de crecimiento transformante α (TGF- α), un miembro de la familia EGF. Los dominios extracelulares del receptor se muestran en azul; el dominio que atraviesa la membrana se muestra en rojo como una hélice alfa, pero su estructura no se conoce en detalle. Las dos moléculas TGF- α más pequeñas están coloreadas en verde. Nótese la interacción entre los segmentos bucles "activados" en los dos monómeros receptores.

(Parte [a] adaptada de J. Schlessinger, 2002, *Cell* 110:669, parte [b] tomada de T. Garret y cols., 2002, *Cell* 110:763.)

los dos ligandos se une simultáneamente a los dominios extracelulares de las dos subunidades del receptor. El FGF también se une estrechamente al heparán sulfato, un componente polisacárido con carga negativa de algunas proteínas de la superficie celular y de la matriz extracelular (véase el Cap. 20); esta asociación incrementa la unión al ligando y la formación de un complejo dimérico receptor-ligando (Fig. 16-5). La participación del heparán sulfato es esencial para la activación eficiente del receptor. Los ligandos para algunos RTK son diméricos y su unión reúne dos monómeros del receptor en forma directa. Otros RTK, como el receptor de insulina, forman dímeros unidos por disulfuros aun en ausencia de la hormona; la unión del ligando a este tipo de RTK altera su conformación de modo tal que la cinasa del receptor se activa. Este último ejemplo destaca que simplemente tener dos monómeros

(a) Vista lateral



(b) Vista desde arriba hacia abajo

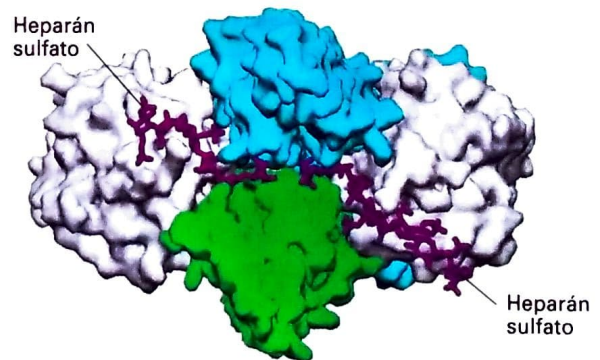


FIGURA 16-5 Estructura del receptor del factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF), estabilizado por el heparán sulfato.

Se muestran aquí las vistas lateral y desde arriba del complejo que comprende los dominios extracelulares de dos monómeros de receptores de FGF (FGFR) (en verde y azul), dos moléculas de FGF unidas (blanco) y dos cadenas de heparán sulfato cortas (púrpura), que se unen estrechamente al FGF. (a) En la vista lateral, el dominio superior de un monómero receptor (azul) se ve ubicada detrás del otro (verde); el plano de la membrana plasmática se encuentra en la parte inferior. Un pequeño segmento del dominio extracelular cuya estructura no se conoce se conecta al segmento helicoidal α que se extiende en la membrana de cada uno de los dos receptores monoméricos (que no se muestra) que sobresalen hacia abajo en la membrana. (b) En la vista superior, las cadenas de heparán sulfato se ven entrelazándose y formando numerosos contactos con los dominios superiores de ambos monómeros del receptor. Estas interacciones promueven la unión del ligando al receptor y la dimerización de este. (Adaptado de J. Schlessinger y cols., 2000, *Mol Cell* 6:743.)

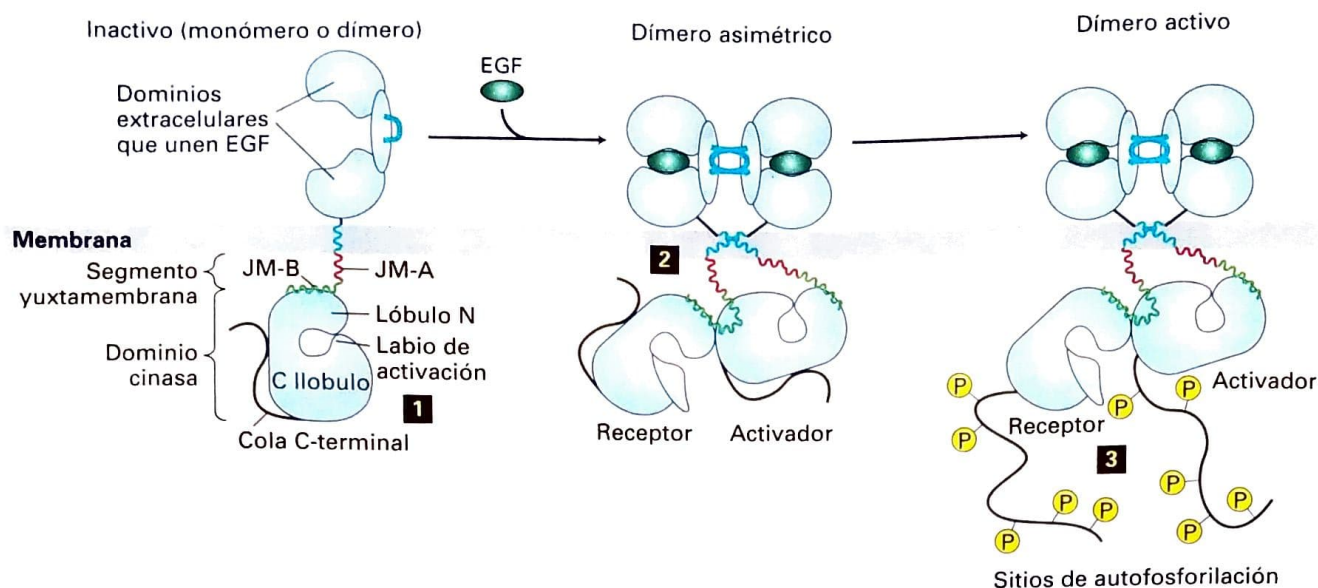


FIGURA 16-6 Activación del receptor de EGF por unión del EGF que resulta en la formación de un dímero de un dominio de cinasa asimétrico. En el estado monomérico inactivo (1), el segmento no estructurado del dominio yuxtamembrana (JM-B; en verde) se une al lóbulo superior, o N, del dominio de la cinasa, lo que provoca un cambio de conformación que ubica el labio de activación en el sitio activo de la cinasa e inhibe de este modo la activación de la enzima. La dimerización del receptor

genera un dímero de cinasa asimétrico (2) de modo tal que el activador de cinasa se une al segmento yuxtamembrana del receptor de cinasa, lo cual provoca un cambio de conformación que elimina el labio de activación del sitio de la cinasa en la cinasa receptora y activa su actividad enzimática. (3) La cinasa activa fosforila entonces los residuos de tirosina (círculos amarillos) en los segmentos C-terminales del dominio citosólico del receptor. (Tomado de N. Jura y cols., 2009, *Cell* 137:1293)

de receptor en contacto cercano no resulta suficiente para su activación (debe haber cambios conformacionales adecuados que acompañen la dimerización del receptor para conducir a la activación de la tirosincinasa). Una vez que un RTK está fijado en un estado dimérico funcional, su tirosincinasa asociada se activa.

Solo para los miembros de la familia de los receptores EGF se comprende la forma exacta en que la dimerización conduce a la activación de la cinasa, y esto fue descubierto mediante estudios estructurales de los dominios citosólicos del receptor en los estados activo e inactivo. Los dominios de la cinasa se separan del segmento transmembrana por un segmento denominado yuxtamembrana, cuyas dos partes se ven coloreadas en rojo y verde en la Figura 16-6. En estado inactivo, monomérico, una parte del segmento yuxtamembrana se une al lóbulo superior, o N, del dominio de cinasa adyacente de la misma molécula. Esto provoca un cambio de conformación tal que el labio de activación está localizado en el sitio activo de la cinasa y bloquea su actividad. De este modo, las cinasas se mantienen en estado “apagado” (Fig. 16-6, paso 1). La dimerización del receptor genera un dímero de cinasa asimétrico (Fig. 16-6, paso 2) tal que un dominio de la cinasa (denominado el activador) se une al segmento yuxtamembrana del segundo dominio de la membrana (el receptor). Esto cambia la conformación del lóbulo N del receptor y provoca así que el labio de activación se mueva hacia afuera del sitio activo de la cinasa y permite que esta funcione (paso 3). En un sentido, un RTK puede pensarse como una enzima alostérica cuyo sitio activo se encuentra dentro de la célula y cuyo efector alostérico (el ligando) se une a un sitio regulador extracelular de la enzima. La evolución ha producido muchas variaciones del tema de este simple mecanismo ligando-RTK, como está ejemplificado por las familias de ligandos EGF y sus receptores, que se analizan más adelante.

Los homo-oligómeros y hetero-oligómeros de los receptores del factor de crecimiento epidérmico unen miembros de la superfamilia del factor de crecimiento epidérmico

Cuatro receptores tirosincinasa (RTK) participan en la señalización de los numerosos miembros de la familia de moléculas de señalización del **factor de crecimiento epidérmico (EGF)**. En los seres humanos, los cuatro miembros de la **familia HER** (*human epidermal growth factor receptor*) se denotan como HER1, 2, 3 y 4. HER1 une directamente tres miembros de la familia de los EGF: EGF, el EGF que une heparina (HB-EGF) y el factor de crecimiento alfa derivado de los tumores (TGF- α). La unión de cualquiera de estos ligandos al dominio de un monómero HER1 lleva a la homodimerización del dominio extracelular de HER1 (Fig. 16-7).

Otros dos miembros de la familia de EGF, las neuregulinas 1 y 2 (NRG1 y NRG2), se unen tanto a HER3 como a HER4; HB-EGF se une también a HER4. Es importante destacar que HER2 no se une directamente a un ligando, sino que existe en la membrana en una conformación preactivada con un segmento en bucle que sobresale hacia el exterior y los dominios que unen ligandos cercanos (Fig. 16-7a). Sin embargo, HER2 no puede formar homodímeros. Solo puede señalizar formando heterocomplejos al unirse a los ligandos HER1, HER3 o HER4. De este modo, facilita la señalización mediante los miembros de la familia EGF (Fig. 16-7b); un aumento de HER2 en la superficie celular vuelve a la célula más sensible a la señalización por muchos miembros de la familia EGF porque la tasa a la cual los heterodímeros de señalización se forman después de la unión del ligando se verá incrementada. Aun cuando HER3 carece de un dominio de cinasa funcional, puede participar en la señalización; después de unir

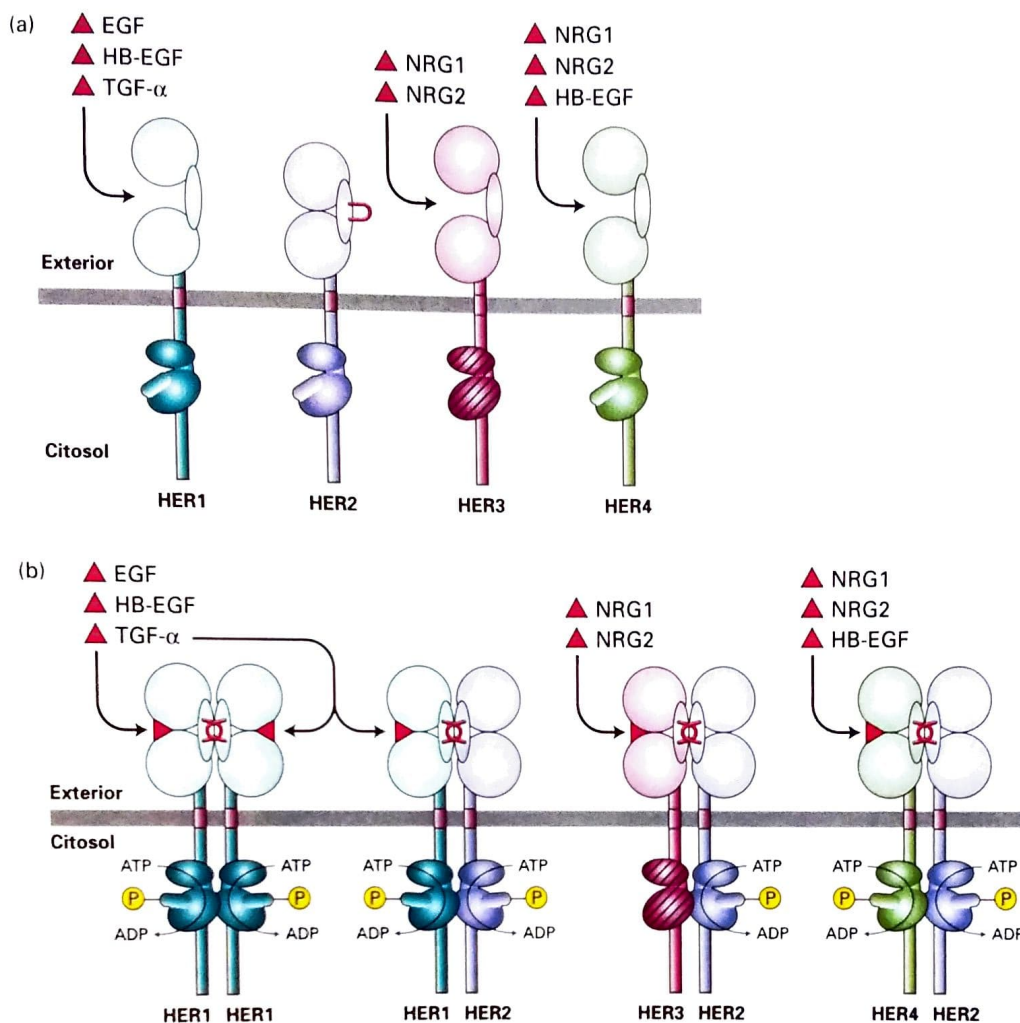


FIGURA 16-7 La familia HER de receptores y sus ligandos. Los seres humanos expresan cuatro receptores tirosincinasas (HER1, 2, 3 y 4) que unen el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y otros miembros de la familia del EGF. (a) Como se muestra, las proteínas HER unen de modo diferencial EGF, EGF que une heparina (HB-EGF), factor de crecimiento alfa derivado de los tumores (TGF- α) y neuregulinas 1 y 2 (NRG1 y NRG2). Nótese que HER2, que no une directamente un ligando, existe en la membrana plasmática de superficie en estado preactivado, según indica una horquilla roja. (b) El HER1

unido al ligando puede formar homodímeros activados unidos entre sí por segmentos del bucle (horquillas rojas), según se detalla en la Figura 16-4. Her2 forma heterodímeros con HER1, HER3 y HER4 unidos al ligando y facilita la señalización por todos los miembros de la familia de EGF. HER3 tiene un dominio de cinasa con actividad muy escasa y puede señalizar tan solo cuando forma complejos con HER2. (Tomado de N. E. Hynes y H. A. Lane, 2005, *Nature Rev. Cancer* 5:341. Revisado en *Nature Rev. Cancer* 5:580 y A. R. Singh y R. J. Harris, 2005, *Cell* 121[Oct.]:1183.)

un ligando, se dimeriza con HER2 y se fosforila por la cinasa HER2. Esto activa vías de transducción de las señales corriente abajo como se indica más adelante.

La comprensión de los HER ha ayudado a explicar por qué una forma particular de cáncer de mama es tan peligrosa y ha conducido a una importante quimioterapia. El cáncer de mama puede implicar el crecimiento anormal de células epiteliales de la mama. Las células epiteliales normales expresan una pequeña cantidad de la proteína HER2 sobre sus membranas plasmáticas en un patrón específico del tejido y no crecen inapropiadamente. En las células tumorales, con frecuencia errores en la replicación del DNA resultan en la formación de múltiples copias de un gen dado en un cromosoma único, una alteración conocida como amplificación génica (véase el Cap. 24). La amplificación del gen *HER2* ocurre en aproximadamente el

25% de los cánceres de mama, lo cual da como resultado la sobreexpresión de la proteína HER2 en las células tumorales. Las pacientes con cáncer de mama con sobreexpresión de HER2 tienen el peor pronóstico, incluyendo una supervivencia acortada con relación a las pacientes sin esta anomalía. Como enfatiza la Figura 16-7, la sobreexpresión de HER2 hace que las células tumorales sean sensibles a la estimulación del crecimiento por bajos niveles de cualquier miembro de la familia de factores de crecimiento EGF, niveles que no estimularían la proliferación de las células con niveles normales de HER2. El descubrimiento del papel de la sobreexpresión de HER2 en ciertos cánceres de mama condujo a los investigadores a desarrollar anticuerpos monoclonales específicos para la proteína HER2. Estos han probado ser terapias efectivas para aquellos pacientes con cánceres de mama en las cuales está sobreexpresado el HER2, y esto ha reducido la recurrencia en dichos pacientes en aproximadamente un 50%.

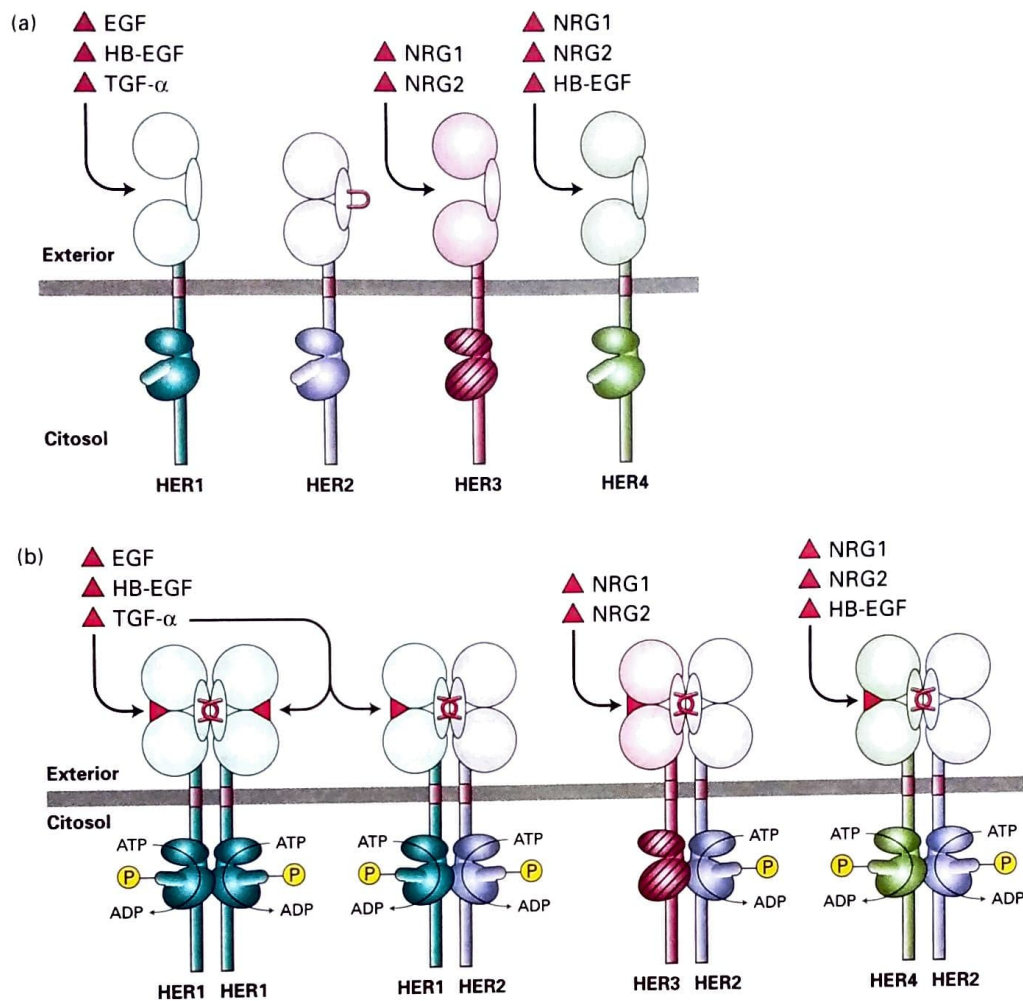


FIGURA 16-7 La familia HER de receptores y sus ligandos. Los seres humanos expresan cuatro receptores tirosincinasas (HER1, 2, 3 y 4) que unen el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y otros miembros de la familia del EGF. (a) Como se muestra, las proteínas HER unen de modo diferencial EGF, EGF que une heparina (HB-EGF), factor de crecimiento alfa derivado de los tumores (TGF- α) y neurregulinas 1 y 2 (NRG1 y NRG2). Nótese que HER2, que no une directamente un ligando, existe en la membrana plasmática de superficie en estado preactivado, según indica una horquilla roja. (b) El HER1

unido al ligando puede formar homodímeros activados unidos entre sí por segmentos del bucle (horquillas rojas), según se detalla en la Figura 16-4. Her2 forma heterodímeros con HER1, HER3 y HER4 unidos al ligando y facilita la señalización por todos los miembros de la familia de EGF. HER3 tiene un dominio de cinasa con actividad muy escasa y puede señalizar tan solo cuando forma complejos con HER2. (Tomado de N. E. Hynes y H. A. Lane, 2005, *Nature Rev. Cancer* 5:341 [errata en *Nature Rev. Cancer* 5:580] y A. B. Singh y R. C. Harris, 2005, *Cell Signal* 17[Oct.]:1183.)

un ligando, se dimeriza con HER2 y se fosforila por la cinasa HER2. Esto activa vías de transducción de las señales corriente abajo como se indica más adelante.

La comprensión de los HER ha ayudado a explicar por qué una forma particular de cáncer de mama es tan peligrosa y ha conlucido a una importante quimioterapia. El cáncer de mama puede implicar el crecimiento anormal de células epiteliales de la mama. Las células epiteliales normales expresan una pequeña cantidad de la proteína HER2 sobre sus membranas plasmáticas en un patrón específico del tejido y no crecen inapropiadamente. En las células tumorales, con frecuencia errores en la replicación del DNA resultan en la formación de múltiples copias de un gen dado en un cromosoma único, una alteración conocida como amplificación génica (véase el Cap. 24). La amplificación del gen *HER2* ocurre en aproximadamente el

25% de los cánceres de mama, lo cual da como resultado la sobreexpresión de la proteína HER2 en las células tumorales. Las pacientes con cáncer de mama con sobreexpresión de HER2 tienen el peor pronóstico, incluyendo una supervivencia acortada con relación a las pacientes sin esta anomalía. Como enfatiza la Figura 16-7, la sobreexpresión de HER2 hace que las células tumorales sean sensibles a la estimulación del crecimiento por bajos niveles de cualquier miembro de la familia de factores de crecimiento EGF, niveles que no estimularían la proliferación de las células con niveles normales de HER2. El descubrimiento del papel de la sobreexpresión de HER2 en ciertos cánceres de mama condujo a los investigadores a desarrollar anticuerpos monoclonales específicos para la proteína HER2. Estos han probado ser terapias efectivas para aquellos pacientes con cánceres de mama en las cuales está sobreexpresado el HER2, y esto ha reducido la recurrencia en dichos pacientes en aproximadamente un 50%.

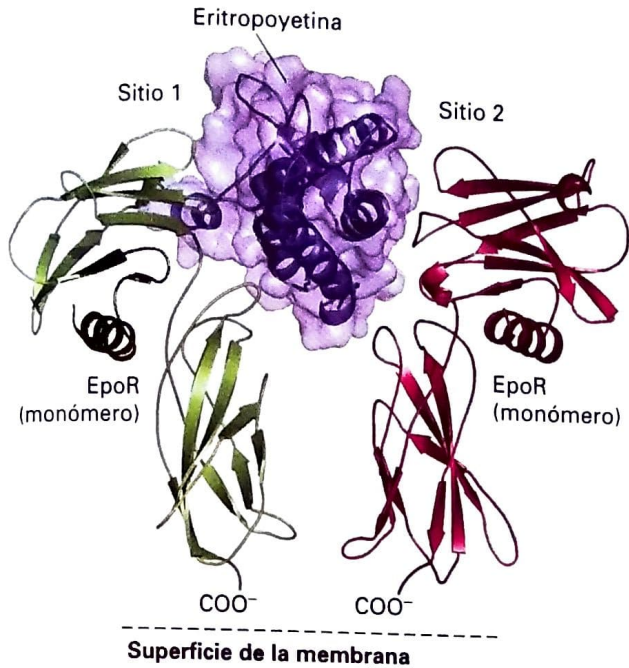


FIGURA 16-9 Estructura de la eritropoyetina unida a un receptor de eritropoyetina. La eritropoyetina (Epo) contiene cuatro hélices α largas, conservadas, plegadas en una disposición particular. El receptor de eritropoyetina activado (EpoR) es un dímero de subunidades idénticas; el dominio extracelular de cada monómero está construido por dos subdominios, cada uno de los cuales contiene siete hebras β conservadas, plegadas de un modo característico. Las cadenas laterales de los residuos en dos de las hélices α de la Epo, llamadas sitio 1, contactan bucles en un monómero de EpoR, mientras que los residuos en las otras dos hélices α Epo, sitio 2, se unen a los mismos segmentos del bucle en un segundo monómero receptor, y así estabilizan al receptor dímérico en una conformación específica. Las estructuras de otras citocinas y sus receptores son similares a la Epo y a la EpoR. (Cortesía de Lucy Zhang; adaptado de R. S. Syed y cols., 1998, *Nature* **395**:511, y L. Zhang y cols., 2009, *Mol. Cell* **33**:266-274.)

citoplasmático de todos los receptores de citocina (Fig. 16-10). Los cuatro miembros de la familia JAK de las cinasas contienen un dominio N-terminal que se une al receptor, un dominio de cinasa C-terminal, que normalmente es poco activo desde el punto de vista catalítico, y un dominio medio que regula la actividad de cinasa por un mecanismo desconocido. (Las JAK se llaman de este modo porque, cuando fueron clonadas y caracterizadas, su función se desconocía, y se llamaron así por su denominación en inglés *just another kinase*, lo que en español significa "simplemente otra cinasa"). Como ocurre con los RTK, esta cinasa se activa después de la unión al ligando y la dimerización del receptor (Fig. 16-10, paso 1).

Como resultado de la dimerización del receptor, las JAK asociadas se acercan lo suficiente, de modo tal que una puede fosforilar a la otra en un labio de activación de tirosina crítico (Fig. 16-10, paso 2). Como ocurre con muchas otras cinasas, la fosforilación del labio de activación conduce a un cambio de conformación que incrementa la afinidad por el ATP del sustrato que será fosforilado, lo que incrementa así la actividad de la cinasa (Fig. 16-10, paso 3). Parte de la evidencia de este mecanismo de activación proviene del estudio de un mutante JAK2 en la cual la tirosina crítica es mutada a fenilalanina. El mutante JAK2 se une normalmente a EpoR, pero no puede ser fosforilada y es catalíticamente inactiva. En las células eritroides, la expresión de este mutante JAK2 en cantidades mayores que las normales bloquea por completo la señalización EpoR porque el mutante JAK2 se une a la mayoría de los receptores de citocina, evitando la unión y el funcionamiento de la proteína JAK2 de tipo silvestre. Este tipo de mutación, conocida como **dominante-negativa**, causa la pérdida de la función aún en las células que llevan copias del gen silvestre, porque la proteína mutante evita que la proteína normal funcione (véase el Cap. 5).

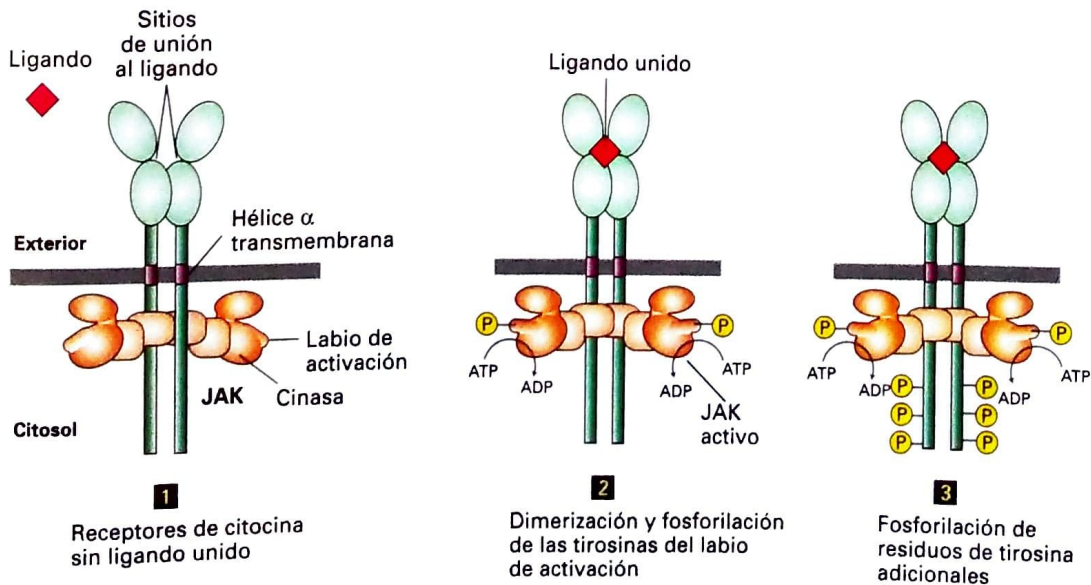


FIGURA 16-10 Estructura general y activación de los receptores de citocinas. El dominio citoplasmático de los receptores de las citocinas se une en forma estrecha e irreversible a una tirosincinasa proteica/JAK. En ausencia de ligando (1), los receptores forman un homodímero, pero las cinasas JAK tienen escasa actividad. La unión de los ligandos provoca un cambio de conformación

que mantiene juntos a los dominios de la cinasa JAK asociados, que entonces se fosforilan entre sí sobre un residuo de tirosina en el labio de activación (2). Procede así la señalización corriente abajo (3) de forma similar a lo que ocurre con los receptores de tirosincinasas.

Los residuos de fosfotirosina son superficies de unión para proteínas múltiples con dominios conservados

Una vez que las cinasas RTK o las cinasas JAK se han activado, fosforilan en primer lugar varios residuos de tirosina en el dominio citosólico del receptor (véanse las Figs. 16-3 y 16-10). Varios de estos residuos de fosfotirosina sirven luego como sitios de unión para las proteínas que han conservado los dominios de unión a la fosfotirosina. Uno de estos dominios de unión a la fosfotirosina se denomina *dominio SH2*. El dominio SH2 deriva su nombre completo, dominio de homología Src, de su homología con una región de tirosincinasa citosólica Src prototípica codificada por el gen *src*. (*Src* es un acrónimo por *sarcoma*, y una forma mutante del gen celular *src*, encontrado en gallinas con sarcomas, como se detalla en el Cap. 24.) Las estructuras tridimensionales de los dominios SH2 en diferentes proteínas son muy similares, pero cada una se une a una secuencia distinta de aminoácidos que rodean el residuo de fosfotirosina. La secuencia única de aminoácidos de cada dominio SH2 determina los residuos específicos de fosfotirosina a los cuales se une (Fig. 16-11). Las variaciones del enchufe hidrofóbico en los dominios SH2 de diferentes proteínas de transducción de la señal le permite unirse a fosfotirosinas adyacentes a distintas secuencias, lo que da cuenta de diferencias en sus socios de unión. El dominio SH2 de la tirosincinasa Src, por ejemplo, se une fuertemente a cualquier péptido que contenga una secuencia núcleo crítica de cuatro residuos: fosfotirosina-ácido glutámico-ácido glutámico-isoleucina (Fig. 16-11). Estos cuatro aminoácidos hacen íntimo contacto con el sitio de unión a los péptidos en el dominio Src SH2. La unión se asemeja a la inserción de un “enchufe” de dos ranuras

(las cadenas laterales de fosfotirosina e isoleucina del péptido) en una “clavija” de dos patas en el dominio SH2. Los dos ácidos glutámicos se insertan ajustadamente en la superficie del dominio SH2 entre el enchufe de fosfotirosina y el enchufe hidrofóbico que acepta el residuo de isoleucina. Esta especificidad desempeña un papel importante en la determinación de qué proteínas de transducción de la señal se unen a qué receptores y qué vías se activan de este modo.

Hay otros dominios de proteínas pequeñas, además de SH2, que pueden reconocer y unirse a los péptidos que contienen fosfotirosina. Un dominio de este tipo se llama *dominio PTB* (*de unión a fosfotirosina*). Con frecuencia, los dominios PTB se encuentran en las llamadas proteínas *multianclaje*, que sirven como sitios de fijación para otras proteínas de transducción de las señales. Por ejemplo, cuando varios RTK (p. ej., el receptor de insulina) y los receptores de citocinas (p. ej., el receptor de IL-4) son activados y fosforilados por tirosina, unen una proteína de multianclaje llamada IRS-1 (descubierta porque es un sustrato del receptor de la insulina) (Fig. 16-12). El receptor activado fosforila entonces a la proteína de anclaje unida y forma muchas fosfotirosinas que a su vez sirven como sitios de anclaje para proteínas de señalización que contienen SH2. Al mismo tiempo, algunas de estas proteínas pueden también ser fosforiladas por el receptor activado y, así, estas proteínas de multianclaje expanden el número de vías de señalización intracelular que pueden ser activadas por el receptor.

Dominios SH2 en acción: las cinasas JAK activan factores de transcripción STAT

Para ilustrar de qué modo la unión de los dominios SH2 a residuos de fosfotirosina específicos induce vías de señalización específicas, aquí

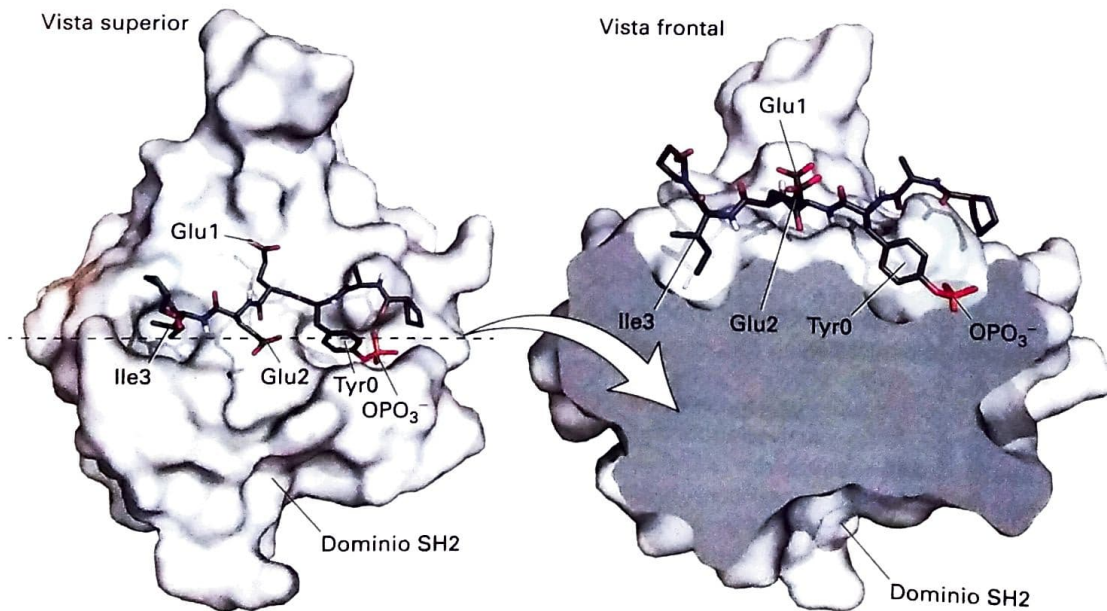


FIGURA 16-11 Modelo de superficie para un dominio SH2 unido a un péptido que contiene fosfotirosina. El péptido unido por este dominio SH2 de la tirosina cinasa Src (esqueleto azul con átomos de oxígeno rojos) se muestra en forma de palillos. El dominio SH2 se une fuertemente a los péptidos *short-target* que contienen una secuencia central de cuatro residuos: fosfotirosina (Tyr0 y OPO_3^-)-ácido glutámico (Glu1)-ácido glutámico

(Glu2)-isoleucina (Ile3). La unión se asemeja a la inserción de dos “tapones” abisagrados (las cadenas laterales de fosfotirosina e isoleucina en el péptido) en un “enchufe” de dos entradas en el dominio SH2. Los dos residuos de glutamato se encuentran unidos a sitios en la superficie del dominio SH2 entre los dos enchufes. (Véase G. Waksman y cols., 1993, *Cell* **72**:779.)

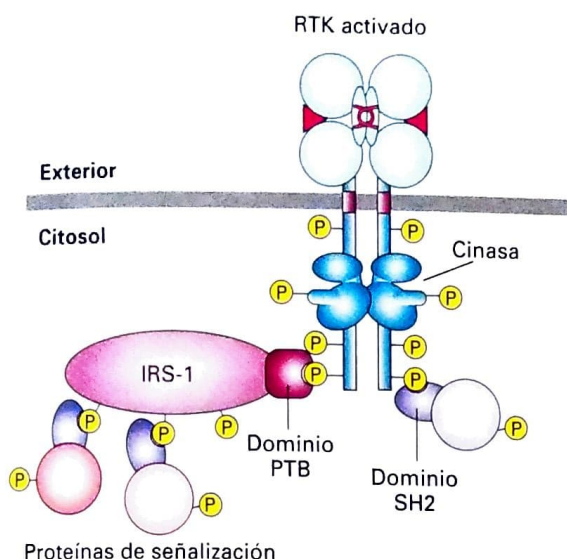


FIGURA 16-12 Reclutamiento de proteínas de transducción de la señal intracelular a la membrana celular por la unión de residuos de fosfotirosina de los receptores o de proteínas asociadas a los receptores. Las proteínas citosólicas con dominios SH2 (púrpura) o PTB (morado) pueden unirse a residuos de fosfotirosina específicos en los RTK activados (que se muestran aquí) o a los receptores de citocinas. En algunos casos, estas proteínas de transducción de la señal se fosforilan entonces por tirosincinasas proteicas intrínsecas o asociadas a los receptores, lo cual incrementa su actividad. Ciertos RTK y receptores de citocina emplean proteínas de múltiple anclaje como las IRS-1 para aumentar el número de proteínas de señalización que son reclutadas y activadas. La fosforilación ulterior de una IRS-1 unida al receptor por la cinasa receptora crea sitios de anclaje adicionales para las proteínas de señalización que contienen SH2.

analizaremos mecanismos directos por los cuales las cinasas JAK y algunos RTK activan de modo directo miembros de los factores de transcripción de la familia STAT. Todas las proteínas STAT contienen un dominio de unión N-terminal al DNA, un dominio SH2 que une una o más fosfotirosinas específicas en un dominio citosólico del receptor de citocina y un dominio C-terminal con un dominio de tirosina crítico. Una vez que una STAT monomérica se ha unido al receptor a través de su dominio SH2, la tirosina C-terminal es fosforilada por una cinasa asociada a JAK (Fig. 16-13a). Esta conformación asegura que, en una célula en particular, solo aquellas proteínas STAT con un dominio SH2 que pueda unirse a una proteína receptora particular se activarán y solo cuando ese receptor esté activado. Por ejemplo, el receptor de eritropoyetina activa STAT5, pero no los STAT1, 2, 3 o 4; estos son activados por otros receptores. Un STAT fosforilado se disocia espontáneamente del receptor, y dos proteínas STAT fosforiladas forman un dímero en el cual el dominio SH2 de cada uno se une a la fosfotirosina del otro. Dado que la dimerización implica cambios de conformación que exponen la señal de localización nuclear (SLN), los dímeros STAT se mueven al núcleo, donde se unen a **potenciadores** (secuencias reguladoras del DNA) específicos que controlan genes diana (Fig. 16-13b) y, así, alteran la expresión génica.

Un STAT dado puede activar diferentes genes en diferentes células dependiendo de la “memoria celular”, analizada en la introducción del capítulo. Dado que distintos tipos de genes tienen componentes únicos de factores de transcripción y modificaciones epigenéticas

únicas en su cromatina, los genes que están disponibles para ser activados por cualquier STAT también son diferentes. Por ejemplo, en las células de las glándulas mamarias, STAT5, el mismo STAT activado por el receptor Epo de las células eritroides, se activa después de la unión de la prolactina al receptor de prolactina e induce la transcripción de los genes que codifican ciertas proteínas de la leche. Por el contrario, cuando STAT5 se activa en las células progenitoras eritroides luego de unir Epo por el receptor de Epo, induce la transcripción del gen Bcl-X_L. El Bcl-X_L evita la muerte celular programada, o **apoptosis**, de estos progenitores, permitiéndoles proliferar y diferenciarse a eritrocitos. Aquí tenemos un caso de diferentes receptores de citocina en diferentes células que activan la misma molécula de señalización intermediaria, STAT5, aunque conducen a la activación de genes distintos. La diversidad combinatoria permite que un número relativamente limitado de vías de señalización controle un amplio grupo de actividades celulares.

Múltiples mecanismos reprimen la señalización de los RTK y los receptores de citocinas

En el capítulo anterior vimos varios modos en los cuales la señalización de los receptores acoplados a la proteína G se termina. Por ejemplo, la fosforilación de los receptores y las proteínas de señalización corriente abajo suprime la señalización y esta supresión puede ser revertida por la acción controlada de las fosfatasas. Aquí analizamos varios mecanismos por los cuales está regulada la señalización de los receptores de las citocinas y los RTK.

Endocitosis mediada por receptores Con frecuencia, el tratamiento prolongado de las células con ligandos reduce el número de receptores disponibles en la superficie celular, de modo tal que las células tienen una respuesta menos intensa a la exposición de una concentración dada de ligando de la que tuvieron antes del tratamiento. Esta respuesta de desensibilización ayuda a evitar una actividad de receptor inadecuadamente prolongada. En ausencia del factor de crecimiento epidérmico (EGF), por ejemplo, los receptores de la superficie celular HER1 para este ligando tienen una vida promedio relativamente prolongada, de entre 10 y 15 horas. Los receptores no unidos se internalizan mediante invaginaciones recubiertas de clatrina en endosomas a una velocidad relativamente lenta, con un promedio de uno cada 30 minutos, y, con frecuencia, vuelven con rapidez a la membrana plasmática de modo tal que hay una reducción pequeña en el número total de receptores de la superficie. Después de la unión de un ligando al EGF, la velocidad de endocitosis de HER1 se incrementa ~ 10 veces, y solo una fracción de los receptores internalizados regresa a la membrana plasmática; el resto se degrada en los lisosomas. Cada vez que un complejo HER1-EGF se internaliza mediante el proceso llamado **endocitosis mediada por receptor** (véase la Fig. 14-29), el receptor tiene una oportunidad de 20 a 80% de ser degradado, dependiendo del tipo celular. La exposición de un fibroblasto a altos niveles de EGF durante varias horas induce varios ciclos de endocitosis, lo que da como resultado la degradación de la mayoría de las moléculas de receptores de la superficie celular y, así, una reducción de la sensibilidad de la célula al EGF. De este modo, el tratamiento prolongado con una concentración dada de EGF desensibiliza a la célula a ese nivel de hormona aunque la célula pueda responder si el nivel de EGF se incrementa.

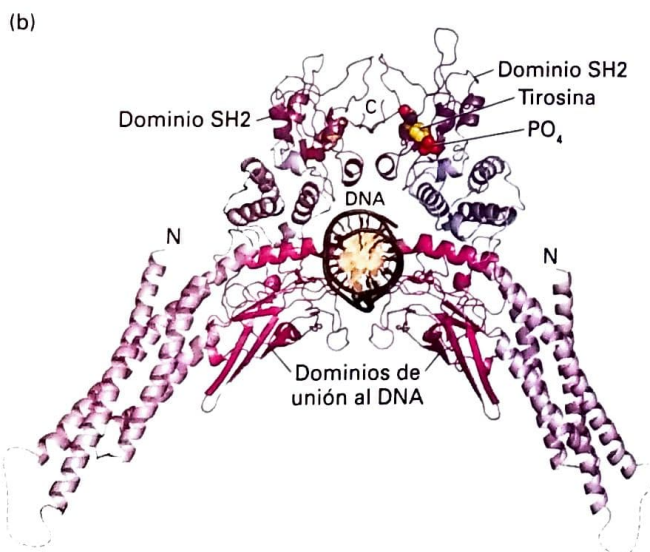
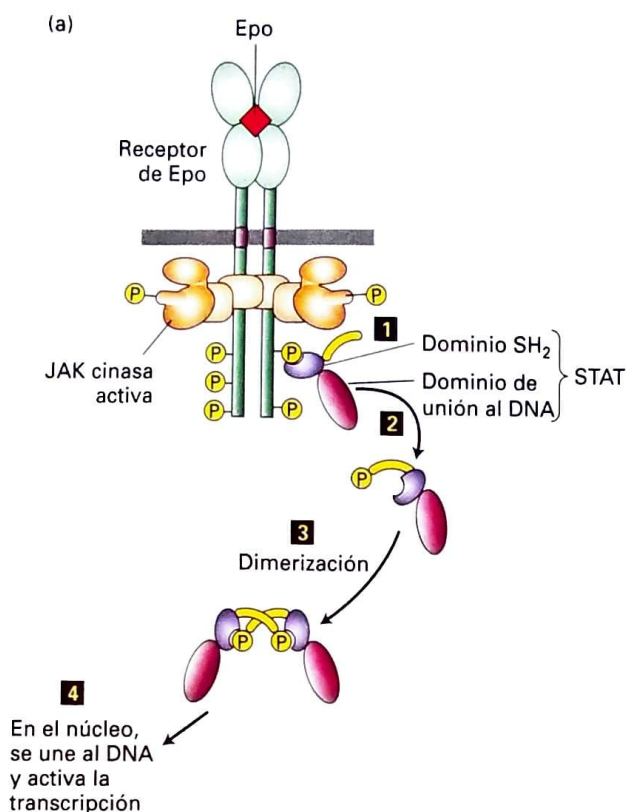


FIGURA 16-13 Activación y estructura de las proteínas STAT. (a) Fosforilación y dimerización de las proteínas STAT. Paso **1**: después de la activación de un receptor de citocina (véase la Fig. 16-10), un factor de transcripción STAT monomérico e inactivo se une a una fosfotirosina en el receptor. El JAK fosforila entonces la tirosina C-terminal en el STAT. Pasos **2** y **3**: los STAT fosforilados se disocian de modo espontáneo del receptor y espontáneamente se dimerizan. Dado que el homodímero STAT tiene dos interacciones fosfotirosina-dominio SH₂, mientras que el complejo receptor-STAT es estabilizado por solo una interacción de este tipo, los STAT fosforilados tienden a no volver a unirse al receptor. Paso **4**: el dímero STAT se mueve al núcleo, donde puede unirse a las secuencias promotoras y activar la transcripción de los genes diana. (b) Diagrama de cintas de la unión del dímero STAT1 al DNA (negro). El dímero STAT1 forma una pinza con forma de C alrededor del DNA estabilizada por interacciones recíprocas y muy específicas entre el dominio SH₂ (púrpura) de un monómero y el residuo de tirosina fosforilado (amarillo con oxígenos rojos) en el segmento C-terminal del otro. Este sitio de unión a fosfotirosina del dominio SH₂ de cada monómero está estructuralmente acoplado al dominio de unión al DNA (magenta), lo que sugiere un papel potencial para la interacción SH₂-fosfotirosina en la estabilización de los elementos de interacción del DNA. (Parte [b] tomado de X. Chen y cols., 1998, *Cell* **93** 827.)

Las mutantes HER1 que carecen de actividad de cinasa no sufren la endocitosis acelerada en presencia del ligando. Es probable que la activación inducida por el ligando de la actividad de la cinasa en la HER1 normal induzca un cambio de conformación en la cola citosólica y exponga un motivo de selección que facilite el reclutamiento del receptor en las invaginaciones cubiertas de clatrina después de la internalización del complejo ligando-receptor. A pesar del extenso estudio de los dominios citosólicos de la mutante HER1, la identidad de estos "motivos de selección" es controvertida, y muy probablemente múltiples motivos funcionen para aumentar la endocitosis. Resulta interesante que los receptores internalizados puedan con-

tinuar señalizando desde los endosomas u otros compartimientos intracelulares antes de su degradación, como lo evidenció su unión a las proteínas de señalización, tales como Grb-2 y Sos, que se analizarán en la sección siguiente.

Degradación lisosómica Después de la internalización, algunos receptores de la superficie celular (p. ej., el receptor de LDL) se reciclan de modo eficiente a la superficie (véase la Fig. 14-29). Como se mencionó más arriba, la fracción de los receptores HER1 activados que son seleccionados a los lisosomas pueden variar de 20 a 80% en diferentes tipos celulares. Hay varios procesos potenciales que pueden influenciar

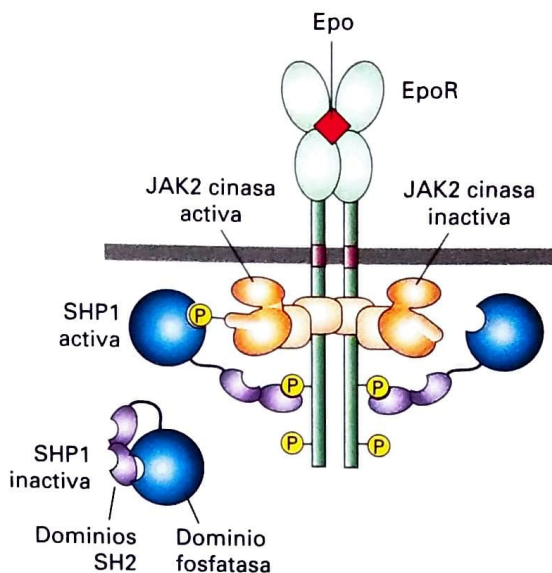
el reciclado versus el destino de la degradación en los lisosomas de los receptores de superficie. Uno es la modificación covalente por la pequeña proteína ubiquitina (véase el Cap. 3). Hay una fuerte correlación entre la monoubiquitinación (la adición de una única ubiquitina a una lisina dada de una proteína) del dominio citosólico de la HER1 y la degradación de la HER1. La monoubiquitinación está mediada por la enzima c-Cbl. Una E3 ubiquitina-ligasa (véase la Fig. 3-29), la c-Cbl, contiene un dominio de unión EGFR, que se une directamente a los receptores EGF fosforilados, y un dominio de dedo RING, que recluta enzimas que unen la ubiquitina y media la transferencia al receptor de ubiquitina. La ubiquitina funciona como una "marca" sobre el receptor que estimula su incorporación desde los endosomas a cuerpos multivesiculados (véase la Fig. 14-33) que finalmente son degradados dentro de los lisosomas. Estudios genéticos hechos en *C. elegans* hicieron pensar en un papel para la c-Cbl en el tránsito de los receptores de EGF, que establecieron que el c-Cbl regula de modo negativo la función del receptor de EGF en el nemátodo (Let-23), probablemente induciendo su degradación. De modo semejante, ratones con genes desactivados (*knockout*) que carecen de c-Cbl muestran hiperproliferación del epitelio de glándula mamaria, compatible con un papel de c-Cbl como un regulador negativo de la señalización de EGF.

Experimentos realizados con líneas celulares mutantes demuestran que la internalización de los RTK desempeña un papel importante en la regulación de las respuestas celulares a EGF y otros factores de crecimiento. Por ejemplo, una mutación en el receptor de EGF (HER1) que evita que sea incorporado a las invaginaciones recubiertas lo torna resistente a la endocitosis mediada por receptor (inducida por ligando). Como resultado, esta mutación conduce a números notablemente superiores a lo normal de receptores de EGF en las células y, así, a una sensibilidad incrementada de las células a EGF como una señal mitogénica. Células mutantes de este tipo son propensas a la **transformación** inducida por EGF a células tumorales (véase el Cap. 24). De modo interesante, los otros receptores de la familia de EGF (HER2, HER3 y HER4) no sufren internalización inducida por ligando, una observación que enfatiza de qué modo cada receptor evolucionó a ser regulado en su propio modo.

Fosfotirosina-fosfatasa Estas enzimas desfosforilantes hidrolizan de modo específico enlaces fosfotirosina en proteínas diana específicas. Un ejemplo excelente de cómo las enzimas fosfotirosina-fosfatasa operan para suprimir la actividad de la proteincinasa de tirosina es provisto por la SHP1, la fosfatasa que regula de modo negativo la señalización a partir de varios tipos de receptores de citocina. En un inicio, su papel fue identificado a partir del análisis de ratones que carecían de esta proteína; estos animales morían por el exceso de producción de eritrocitos y otros varios tipos de células de la sangre.

La SHP1 disminuye la señalización de las citocinas al unirse al receptor de citocinas e inactivar la proteína JAK asociada, como se muestra en la Figura 16-14a. Además de un dominio catalítico de fosfatasa, la SHP1 tiene dos dominios SH2. Cuando las células están en estado de reposo no estimulado por una citocina, uno de los dominios SH2 en SHP1 se une físicamente al sitio catalítico en el dominio de la fosfatasa y lo inactiva. Sin embargo, en el estado estimulado este bloqueo del dominio SH2 se une a un residuo específico de fosfotirosina en el receptor activado. El cambio de conformación que acompaña esta unión desenmascara el sitio catalítico de SHP1 y que también lo sitúa adyacente al residuo de fosfotirosina en el labio de activación del JAK asociado con su receptor. Al eliminar este fosfato,

(a) Regulación a corto plazo: desactivación de JAK2 por la fosfatasa SHP1



(b) Regulación a largo plazo: bloqueo de las señales y degradación proteica por las proteínas SOCS

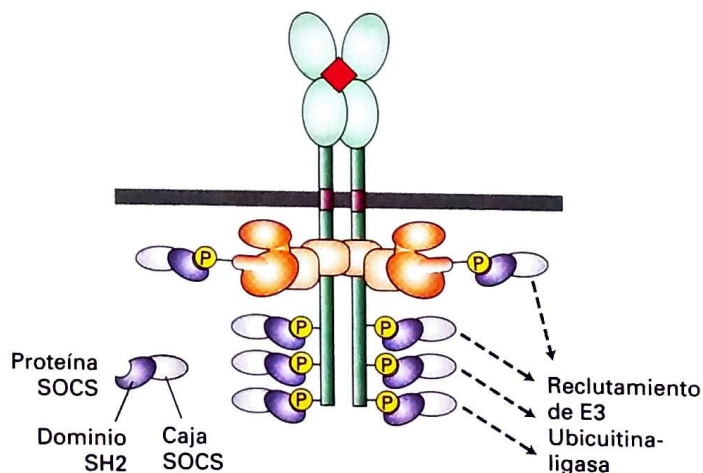


FIGURA 16-14 Dos mecanismos para terminar la transducción de la señal desde el receptor de eritropoyetina (EpoR).

(a) Regulación a corto plazo: SHP1, una fosfotirosina fosfatasa, está presente en forma inactiva en las células no estimuladas. La unión de un dominio SH2 en SHP1 a una fosfotirosina particular en el receptor activado desenmascara su sitio catalítico en la fosfatasa y la ubica cerca de la tirosina fosforilada en la región del labio de JAK2. La eliminación del fosfato desde esta tirosina inactiva la JAK cinasa. (b) Regulación a largo plazo: las proteínas SOCS, cuya expresión es inducida por las proteínas STAT en las células eritroides estimuladas por eritropoyetina, inhiben o terminan permanentemente la señalización en períodos prolongados. La unión de las SOCS a los residuos de fosfotirosina en EpoR o JAK2 bloquea la unión de otras proteínas de señalización (izquierda). La caja SOCS también puede marcar proteínas como JAK2 para la degradación por la vía ubiquitina-proteasoma (derecha). Mecanismos similares regulan la señalización desde otros receptores de citocinas. (Parte [a] adaptada de S. Constantinescu y cols., 1999, *Trends Endocrin. Metabol.* 10:18, parte [b] adaptada de B. T. Kile y W. S. Alexander, 2001, *Cell. Mol. Life Sci.* 50:1.)

el SHP1 inactiva el JAK, de modo tal que ya no puede fosforilar al receptor o a otros sustratos (p. ej., STAT) a menos que moléculas de citocina adicionales se unan a los receptores de la superficie celular y se inicie así una nueva ronda de señalización.

Proteínas SOCS En un ejemplo clásico de retroalimentación negativa, entre los genes cuya transcripción es inducida por proteínas STAT están aquellos que codifican una clase de proteínas pequeñas llamadas *proteínas SOCS*, que terminan la señalización de los receptores de citocinas. Estos reguladores negativos actúan de dos modos (Fig. 16-14b). En primer lugar, el dominio SH2 de varias proteínas SOCS se une a la fosfotirosinas del receptor activado y evita la unión de otras proteínas de señalización que contienen SH2 (p. ej., las STAT); así, inhibe de modo competitivo la señalización del receptor. Una proteína SOCS, la SOCS-1, también se une a una fosfotirosina crítica en el labio de activación de la JAK2 cinasa, e inhibe de este modo su actividad catalítica. En segundo lugar, todas las proteínas SOCS contienen un dominio, llamado la caja SOCS, que recluta los componentes de las ligasas de ubiquitina E3 (véase la Fig. 3-29). Como resultado de la unión de SOCS-1, por ejemplo, la JAK2 se poliubiquitina (un polímero de ubiquitina unido de modo covalente a la cadena lateral de una lisina) y luego se degrada en los **proteasomas**; de este modo, apaga permanentemente todas las vías de señalización mediadas por JAK2 hasta que nuevas proteínas JAK2 puedan sintetizarse. La observación de que los inhibidores de los proteasomas prolongan la transducción de la señal JAK2 da apoyo a este mecanismo.

Estudios con células de mamífero en cultivo han mostrado que el receptor para la hormona de crecimiento, que pertenece a la superfamilia de los receptores de las citocinas, está reprimido por otra proteína SOCS, la SOCS-2. De modo sorprendente, los ratones deficientes en SOCS-2 crecen mucho más que sus contrapartidas silvestres y tienen longitudes óseas mayores y un crecimiento proporcional superior de la mayor parte de sus órganos. De este modo, las proteínas SOCS desempeñan un papel negativo esencial en la regulación intracelular de la iniciación de señales a partir de receptores para la eritropoyetina, la hormona de crecimiento y otras citocinas.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 16.1

Receptores que activan las tirosincinasas proteicas

- Dos amplias clases de receptores activan las tirosincinasas proteicas: (1) los receptores tirosincinasas (RTK), en los cuales la cinasa es una parte intrínseca del receptor, y (2) los receptores de citocinas, en los cuales la cinasa está unida fuertemente al dominio citosólico del receptor. La señalización de los receptores tirosincinasa y de los receptores de tirosina activan vías de señalización similares corriente abajo (véase la Fig. 16-2).
- Los receptores tirosincinasas, que se unen a péptidos y a proteínas de señalización tales como los factores de crecimiento y la insulina, pueden existir como dímeros preformados o dimerizarse durante la unión a los ligandos. La unión a los ligandos desencadena la formación de receptores dimericos funcionales, un paso necesario en la activación de la cinasa asociada al receptor.

- La activación de un RTK conduce a la fosforilación del labio de activación en las proteínas tirosincinasas que son parte intrínseca de sus dominios citoplasmáticos, lo que incrementa su actividad catalítica (véase la Fig. 16-3). La cinasa activada fosforila entonces residuos de tirosina en el dominio citosólico del receptor y otros sustratos proteicos.

- Los seres humanos expresan muchos RTK, cuatro de los cuales (HER1-4) definen la familia de receptores del factor de crecimiento epidérmico que media la señalización desde diferentes miembros de la familia del factor de crecimiento epidérmico de moléculas de señalización (véase la Fig. 16-7). Uno de estos receptores, HER2, no une ligandos; forma heterodímeros activos con monómeros que se unen a ligandos de las otras tres proteínas HER. La sobreexpresión de HER2 está implicada en aproximadamente 25% de los cánceres de mama.

- Las citocinas desempeñan numerosos papeles en el desarrollo. La eritropoyetina, una citocina secretada por las células del riñón, promueve la proliferación y diferenciación de las células progenitoras eritroides en la médula ósea (véase la Fig. 16-8) para incrementar el número de glóbulos rojos maduros en la sangre.

- Todos los receptores de citocina tienen estructuras similares, y sus dominios citosólicos están estrechamente unidos a la proteína tirosincinasa JAK, que se activa después de la unión de la citocina y la dimerización del receptor (véase la Fig. 16-10).

- Tanto en las RTK como en los receptores de citocinas, las secuencias de aminoácidos cortas que contienen un residuo de fosfotirosina están unidas por proteínas con dominios SH2 o PTB conservados, que se encuentran en muchas proteínas de transducción de las señales. Las secuencias de aminoácidos que rodean la tirosina fosforilada determinan qué dominio se unirá a ella. Estas interacciones proteína-proteína son importantes en muchas vías de señalización (véanse las Figs. 16-11 y 16-12).

- La vía JAK/STAT opera corriente abajo desde todos los receptores de citocina y algunos RTK. Los monómeros STAT unidos a las fosfotirosinas en los receptores están fosforilados por JAK asociadas a receptores, luego se dimerizan y se mueven hacia el núcleo, donde activan la transcripción (véase la Fig. 16-13).

- La endocitosis de los complejos hormona-receptor y su degradación en los lisosomas es una vía principal para reducir el número de tirosincinasas receptoras y de receptores de citocina sobre la superficie celular, lo que disminuye así la sensibilidad de las células a las numerosas hormonas peptídicas.

- La señalización desde los receptores de citocinas es terminada por la fosfotirosina fosfatasa SHP1 y varias proteínas SOCS (véase la Fig. 16-14).

16.2 La vía de la Ras/MAP cinasa

Casi todos los receptores de tirosincinasas y los receptores de citocinas activan la *vía de la Ras/MAP cinasa* (véase la Fig. 16-2b). La **proteína Ras**, una proteína G monomérica (pequeña), pertenece a la **superfamilia de la GTPasa** de proteínas interruptoras intracelulares (véase la Fig. 15-7). La Ras activada promueve la formación, en la

membrana, de complejos de transducción de la señal que contienen tres proteincinasas que actúan secuencialmente. Esta *cascada de cinasas* culmina en la activación de ciertos miembros de la familia de la **MAP cinasa**, que pueden translocarse al núcleo y fosforilar muchas proteínas distintas. Entre las proteínas diana para la MAP cinasa, se encuentran los factores de transcripción que regulan la expresión de proteínas con papeles importantes en el ciclo y la diferenciación celulares. Resulta importante que, con frecuencia, diferentes tipos de señales extracelulares activen diferentes vías de señalización que resultan en la activación de miembros distintos de la familia de la MAP cinasa.

Dado que una mutación activadora de un RTK, la Ras, o una proteína en la cascada de la MAP cinasa se encuentra en casi todos los tipos de tumores humanos, la vía de los RTK/Ras/MAP cinasa ha sido sometida a extensos estudios y se sabe mucho acerca de sus componentes. Comenzamos nuestro análisis revisando de qué manera la Ras cicla entre el estado activo e inactivo. Luego, describimos de qué manera la Ras se activa y pasa una señal a la vía de la MAP cinasa. Finalmente, examinamos los estudios recientes que indican que tanto las levaduras como las células de los eucariontes superiores contienen múltiples vías de MAP cinasa y consideramos los modos en que las células mantienen diferentes vías de MAP cinasa separadas unas de otras mediante el uso de proteínas plataforma.

La Ras, una proteína interruptora GTPasa, opera corriente abajo de la mayoría de los receptores RTK y citocinas

Al igual que las subunidades G_α en las proteínas G triméricas analizadas en el **Capítulo 15**, la proteína G monomérica conocida como Ras alterna en un estado “encendido” con el GTP unido y un estado inactivo “apagado” con el GDP unido (véase la **Fig. 15-6** para la revisión de este concepto). A diferencia de las proteínas G triméricas, la Ras no está directamente unida a los receptores de la superficie celular. La Ras (~ 170 aminoácidos) es más pequeña que las proteínas G_α (~ 300 aminoácidos), pero los dominios que unen GTP de las dos proteínas tienen una estructura similar (véase la **Fig. 15-7** para revisar la estructura de la Ras). Los estudios bioquímicos y estructurales muestran que la G_α también contiene un dominio de la proteína que activa la GTPasa (GAP) que incrementa la velocidad intrínseca de hidrólisis de GTP por la G_α . Dado que este dominio no está presente en la Ras, tiene una velocidad intrínsecamente más lenta de hidrólisis de GTP. Así, el tiempo de vida promedio del GTP unido a la Ras es de aproximadamente 1 minuto, mucho más largo que el tiempo de vida promedio del complejo G_α -GTP.

La actividad de la proteína Ras está regulada por varios factores. La activación de la Ras está acelerada por el *factor de intercambio de guanina nucleótido* (GEF), que se une al complejo Ras-GDP y provoca la disociación del GDP unido (véase la **Fig. 15-6**). Dado que el GTP está presente en las células a concentración más alta que el GDP, se une espontáneamente a las moléculas de Ras “vacías”, lo cual libera el GEF y la formación de Ras-GTP. La hidrólisis posterior del GTP unido a GDP desactiva la Ras. Puesto que la actividad intrínseca de GTPasa del Ras-GTP es baja comparada con la de G_α -GTP, el Ras-GTP requiere el auxilio de otra proteína, una proteína activadora de la GTPasa (GAP) para desactivarla. La unión de una GAP al Ras-GTP acelera la actividad de GTPasa intrínseca de la Ras en más de 100 veces; la

hidrólisis real de GTP es catalizada por los aminoácidos, tanto de Ras como de GAP. En particular, la inserción de cadenas laterales de arginina de una GAP al sitio activo de la Ras estabiliza un intermediario de la reacción de hidrólisis.



Las proteínas Ras de los mamíferos han sido estudiadas con gran detalle porque las proteínas Ras mutantes se asocian con muchos tipos de cánceres humanos. Estas proteínas mutantes, que se unen al GTP pero no pueden hidrolizarlo, están permanentemente en estado “encendido” y contribuyen a las transformaciones oncogénicas (véase el **Cap. 24**). La determinación de la estructura tridimensional del complejo Ras-GAP y las pruebas de las formas mutantes de Ras explicaron la sorprendente observación de que la mayoría de las proteínas Ras activas constitutivamente, oncogénicas (Ras^D), contienen una mutación en la posición 12. El reemplazo de la glicina-12 normal con otro aminoácido (excepto prolina) bloquea la unión normal de GAP y “fija” esencialmente a Ras en el estado activo unido a GTP. ■

La primera indicación de que Ras opera corriente abajo desde RTK en una vía de señalización común provino de experimentos en los cuales fibroblastos en cultivo fueron inducidos a proliferar por el tratamiento con una mezcla de dos hormonas proteicas: el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF). La microinyección de anticuerpos anti-Ras a estas células bloqueó la proliferación celular. Por el contrario, la inyección de Ras^D, un mutante activo constitutivamente de la proteína Ras que hidroliza GTP de modo muy ineficiente y así persiste en estado activo, provocó la proliferación de las células en ausencia de sus factores de crecimiento. Estos hallazgos son compatibles con estudios que emplean el método de ensayo de tracción detallado en la **Figura 15-14**, que muestra que la adición de FGF a los fibroblastos conduce a un rápido incremento en la proporción de Ras presente en la forma activa unida a GTP. Sin embargo, como veremos, un RTK activado (o un receptor de citocina) no puede activar de modo directo la Ras. En lugar de ello, otras proteínas deben ser reclutadas primero al receptor activado y servir como adaptadores.

Estudios genéticos en *Drosophila* identificaron proteínas transductoras de la señal clave en la vía de la Ras/MAP cinasa

Nuestro conocimiento de las proteínas implicadas en la vía de la Ras/MAP cinasa provienen principalmente de los análisis genéticos de moscas de la fruta mutantes (*Drosophila*) y de gusanos (*C. elegans*) que fueron bloqueados en etapas particulares de la diferenciación. Para ilustrar el poder de este enfoque experimental, consideramos el desarrollo de un tipo particular de célula en el ojo compuesto de la *Drosophila*.

El ojo compuesto de la mosca está formado por más de 800 ojos individuales llamados *omatidios* (**Fig. 16-15a**). Cada omatidio consiste de 22 células, ocho de las cuales son neuronas fotosensibles llamadas *retínulas*, o células R, designadas R1-R8 (**Fig. 16-15b**). Un RTK llamado *Sevenless* (*Sev*) regula específicamente el desarrollo de la célula R7 y no resulta esencial para ninguna otra función conocida. En moscas con un gen *sevenless* (*sev*) mutante, la célula R7 de cada omatidio no se forma (**Fig. 16-15c, abajo**). Dado que el fotorreceptor R7 es necesario solo para que las moscas vean en la luz ultravioleta,

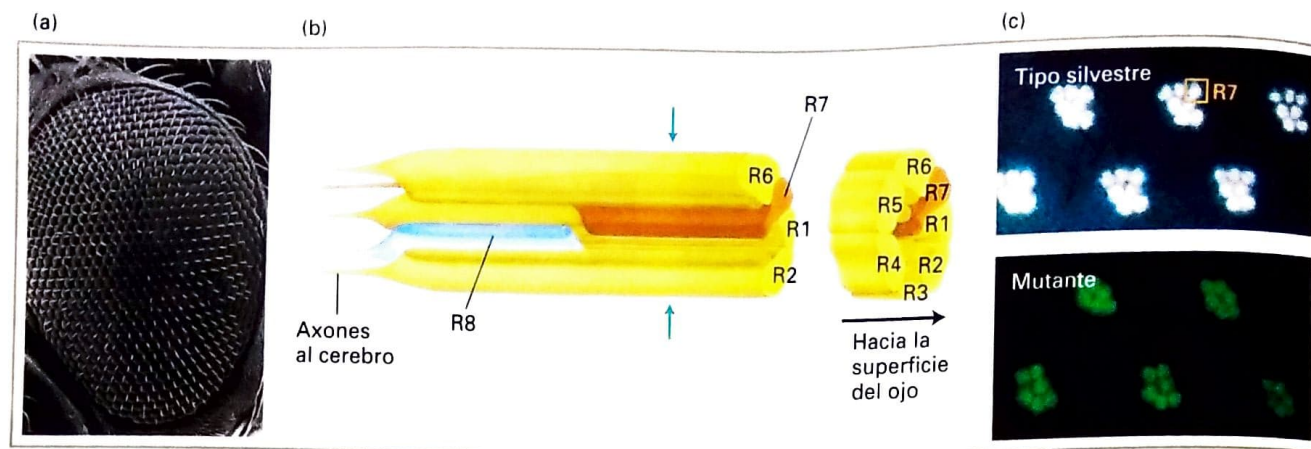


FIGURA 16-15 El ojo compuesto de la *Drosophila melanogaster*. (a) Fotomicrografía electrónica de barrido que muestra los omatidios individuales que componen el ojo de la mosca de la fruta. (b) Corte longitudinal y vistas de los cortes de un omatidio individual. Cada una de estas estructuras tubulares contiene ocho fotorreceptores, designados R1-R8, que son células largas, cilíndricas, fotosensibles. R1-R6 (en amarillo) se extienden en toda la profundidad de la retina, mientras que R7 (pardo) está localizada hacia la superficie del ojo, y R8 (azul), hacia la parte posterior, en la zona de la salida de los axones. (c) Comparación de los ojos de las moscas de la fruta silvestres y de

las mutantes *sevenless* vistas por una técnica especial que puede distinguir los fotorreceptores de un omatidio. El plano de corte está indicado por las flechas azules en (b), y la célula R8 está fuera del plano de estas imágenes. Los siete fotorreceptores de este plano se ven fácilmente en el omatidio tipo silvestre (parte superior), mientras que solo seis son visibles en el omatidio mutante (parte inferior). Las moscas con la mutación *sevenless* carecen de la célula R7 en sus ojos. (Parte [a] tomada de E. Hafen y K. Basler, 1991, *Development* 11(suppl.):123; parte [b] adaptada de R. Reinke y S. L. Zipursky, 1988, *Cell* 55:321; parte [c] cortesía de U. Banerjee.)

las mutantes que carecen de las células R7 pero por lo demás son normales se aíslan fácilmente. Por lo tanto, las células R7 de las moscas son un sistema genético ideal para estudiar el desarrollo celular.

Durante el desarrollo de cada omatidio, una proteína llamada *Boss* (*Bride of Sevenless*) se expresa sobre la superficie de la célula R8. Esta proteína unida a la membrana es el ligando de RTK de Sev sobre la superficie de la célula precursora R7 vecina, y la señal para que se desarrolle en una neurona fotosensible (Fig. 16-16a). En las moscas mutantes que no expresan una proteína *Boss* o Sev RTK funcional, la interacción entre las proteínas *Boss* y Sev no puede ocurrir y no se desarrollan células R7 (Fig. 16-16b); este es el origen del nombre “Sevenless” (que en español quiere decir “sin siete”) para el RTK de las células R7.

A fin de identificar las proteínas que transducen las señales intracelulares en la vía RTK Sev, los investigadores produjeron moscas mutantes que expresaban una proteína Sev sensible a la temperatura. Cuando estas moscas se mantuvieron a una temperatura permisiva, todos los omatidios contuvieron las células R7; cuando se mantuvieron a temperatura no permisiva, ninguna de las células R7 se desarrolló. Sin embargo, a una temperatura intermedia particular fue funcional una cantidad de RTK Sev suficiente para mediar el desarrollo de R7 normal. Los investigadores razonaron que a esta temperatura intermedia la vía de señalización estaría defectuosa (y así, no se desarrollarían células R7) si el nivel de otra proteína involucrada en la vía se redujera, disminuyendo de este modo la acti-

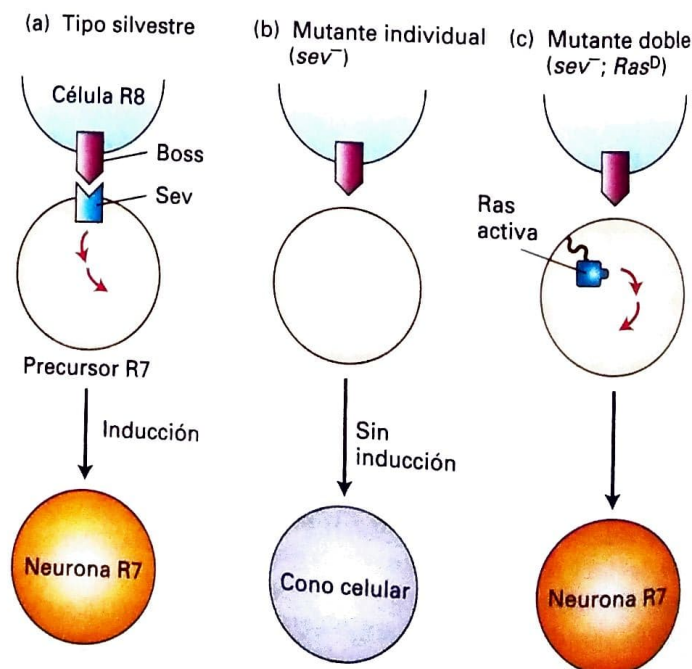


FIGURA EXPERIMENTAL 16-16 Los estudios genéticos revelan que la activación de Ras induce el desarrollo de los fotorreceptores R7 en el ojo de la *Drosophila*. (a) Durante el desarrollo larvario de las moscas de tipo silvestre, la célula R8 en cada omatidio en desarrollo expresa una proteína de la superficie celular llamada *Boss*, que se une al Sev RTK de la superficie de su célula precursora vecina R7. Esta interacción induce cambios en la expresión génica que resultan en la diferenciación de la célula precursora en una neurona funcional R7. (b) En los embriones de las moscas con una mutación en el gen *sevenless* (*sev*), las células precursoras R7 no se pueden unir a *Boss* y, por lo tanto, no se diferencian normalmente a células R7. En lugar de ello, la célula precursora entra en una vía de desarrollo alternativa y por último se transforma en un cono. (c) Las larvas que son mutantes dobles (*sev*; *Ras^D*) expresan Ras en forma activa constitutivamente (*Ras^D*) en la célula precursora R7, lo cual induce la diferenciación de las células precursoras R7 en ausencia de la señal mediada por *Boss*. Este hallazgo muestra que la Ras activada es suficiente para mediar la inducción de una célula R7. (Véase M. A. Simon y cols., 1991, *Cell* 67:701; y M. E. Fortini y cols., 1992, *Nature* 355:559.)

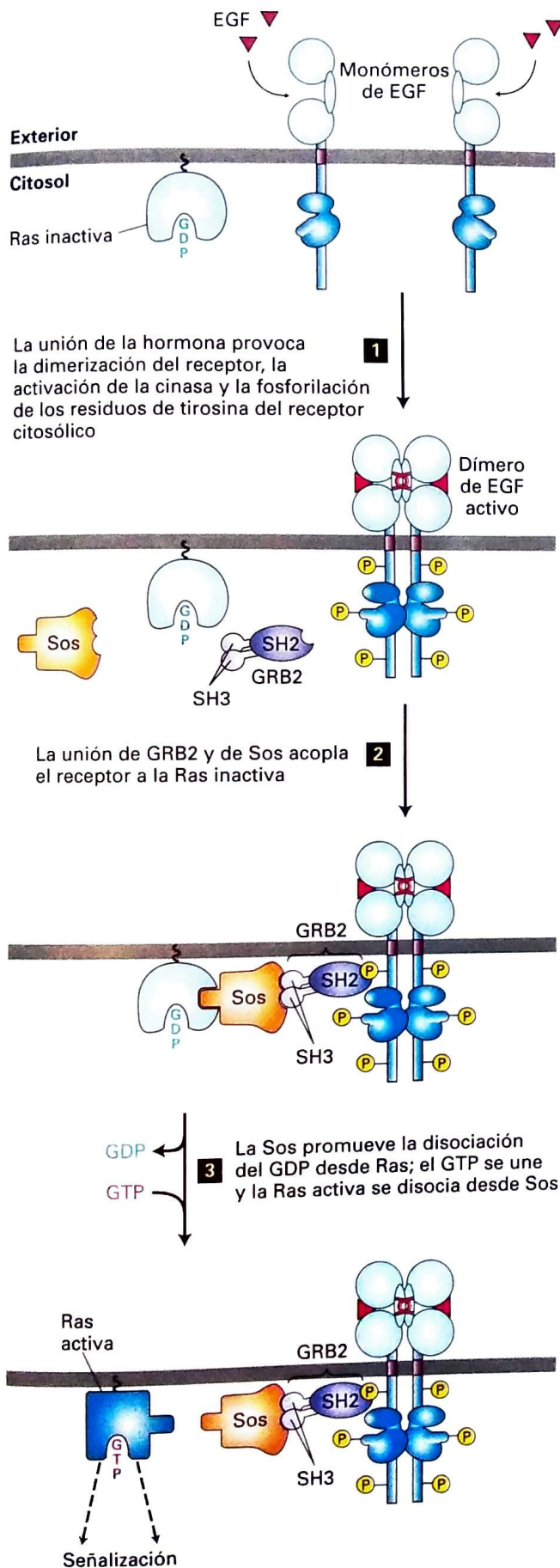


FIGURA 16-17 La activación de Ras después de la unión al ligando de los receptores de tirosincinasa (RTK) o receptores de citocina. Los receptores para el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y muchos otros factores de crecimiento son RTK. La proteína adaptadora citosólica GRB2 se une a una fosfotirosina específica en un receptor activado, unido al ligando y a la proteína Sos citosólica, y la lleva cerca de la membrana plasmática y de su sustrato, el Ras-GDP inactivo. La actividad del factor de intercambio de guanina nucleótido (GEF) de la Sos promueve entonces la formación del Ras-GTP activo. Nótese que el Ras queda unido a la superficie citosólica de la membrana plasmática por un ancla hidrofóbica de farnesilo (véase la Fig. 10-19). [Vease J. Schlessinger, 2000, *Cell* 103:211; y M. A. Simon, 2000, *Cell* 103:13.]

vidad de toda la vía por debajo del nivel necesario para formar una célula R7. Una mutación recesiva que afectara una proteína de este tipo tendría este efecto porque en los organismos diploides, como una *Drosophila*, un heterocigoto que contuviera un alelo silvestre y uno mutante de un gen, produciría la mitad de la cantidad normal del producto génico; así, aun si la mutación recesiva estuviese en un gen esencial, el organismo sería habitualmente viable. Sin embargo, una mosca que llevase una mutación sensible a la temperatura en el gen *sev* y una segunda mutación que afectara otra proteína en la vía de señalización, se esperaría que careciera de las células R7 a temperatura intermedia.

Empleando este método de detección, los investigadores identificaron tres genes que codificaban para proteínas importantes en la vía *Sev*: una proteína adaptadora SH2 que exhibía 64% de identidad en la secuencia de aminoácidos con el GRB2 humano (proteína de unión al receptor del factor de crecimiento 2), un factor de intercambio de guanina nucleótido llamado Sos (*Son of Sevenless*) que exhibía un 45% de identidad con su contrapartida en el ratón, y una proteína Ras que exhibía 80% de identidad con sus contrapartidas en los mamíferos. Posteriormente, se encontró que estas tres proteínas operaban en otras vías de señalización iniciadas por la unión de los ligandos a diferentes RTK y que se usaban en distintos momentos y lugares en la mosca en desarrollo.

En estudios posteriores, los investigadores introdujeron un gen *ras^D* mutante en embriones de moscas que llevaban la mutación *sevenless*. Como se notó antes, el gen *ras^D* codifica una proteína Ras constitutivamente activa que está presente en la forma activa que une GTP aun en ausencia de la señal hormonal. Aunque no se expresaba RTK *Sev* funcional en estas mutantes dobles (*sev⁻; ras^D*), las células R7 se formaban normalmente, lo cual indicaba que la presencia de una proteína Ras activada es suficiente para la inducción del desarrollo de una célula R7 (Fig. 16-16c). Este hallazgo, compatible con los resultados de los fibroblastos en cultivos descritos previamente, avala la conclusión de que la activación de Ras es un paso principal en la señalización intracelular por la mayoría de todos los receptores de citocinas y RTK, si bien no por todos ellos.

Los receptores tirosincinasa y las JAK cinasa están vinculados a Ras por proteínas adaptadoras

Para que los receptores de citocinas y los RTK activen Ras, dos proteínas citosólicas (GRB2 y Sos) primero deben ser reclutadas para proveer un vínculo entre el receptor y la Ras (Fig. 16-17). La GRB2 es una *proteína adaptadora*, lo cual significa que no tiene actividad

enzimática y sirve como un vínculo o plataforma entre otras dos proteínas (en este caso, entre el receptor activado y la Sos). La Sos es una proteína de intercambio de guanina nucleótido (GEF) que cataliza la conversión de una Ras unida a GDP inactiva a una forma activa unida a GTP.

La GRB2 es capaz de servir como proteína adaptadora por su dominio SH2, que se une a un residuo de fosfotirosina específico en el RTK (o receptor de tirosina) activado. Además de su dominio SH2, la proteína GRB2 adaptadora contiene dos dominios SH3 que se unen a Sos, el factor de intercambio de guanina nucleótido (Fig. 16-17). Al igual que los dominios SH2 y PTB que unen fosfotirosina, los dominios SH3 están presentes en gran cantidad de proteínas implicadas en la señalización intracelular. Aunque las estructuras tridimensionales de varios dominios SH3 son similares, sus secuencias específicas de aminoácidos varían. Los dominios SH3 de GRB2 se unen selectivamente a secuencias ricas en prolina de Sos; diferentes dominios de SH3 en otras proteínas se unen a secuencias ricas en prolina distintas de las presentes en Sos.

Los residuos de prolina desempeñan dos papeles en la interacción entre un dominio SH3 en una proteína adaptadora (p. ej., GRB2) y una secuencia rica en prolina en otra proteína (p. ej., Sos). En primer lugar, la secuencia rica en prolina asume una conformación extendida que permite extensos contactos con el dominio SH3 y facilita de este modo la interacción. En segundo lugar, un subconjunto de estas prolinas encaja en “bolsillos” de unión sobre la superficie del dominio de la SH3 (Fig. 16-18). Varios residuos diferentes de la prolina interactúan también con el dominio SH3 y son responsables de determinar la especificidad de la unión. Así, la unión de proteínas a los dominios SH3 y a SH2 sigue una estrategia

similar: ciertos residuos proporcionan un motivo estructural clave necesario para la unión y los residuos vecinos confieren especificidad a esta unión.

La unión de Sos a la Ras inactiva provoca un cambio de conformación que desencadena el intercambio de GTP por GDP

Después de la activación de un RTK (p. ej., el receptor de EGF), un complejo que contiene al receptor activado, GRB2, y Sos se forma sobre la cara citosólica de la membrana plasmática (véase la Fig. 16-17). La formación del complejo depende de la habilidad del GRB2 de unir *simultáneamente* al receptor y a Sos. Así, la activación del receptor conduce a la relocalización del Sos desde el citosol a la membrana, lo que lleva al Sos cerca de su sustrato, es decir, Ras-GDP que ya está unido a la membrana plasmática por medio de un lípido asociado de modo covalente. La unión del Sos al Ras-GDP lleva a cambios de conformación en los segmentos Interruptor I e Interruptor II de la Ras, lo cual abre así el bolsillo de unión para GDP de modo que pueda difundir hacia el exterior (Fig. 16-19). En otras palabras, Sos funciona como el GEF para Ras. Luego, el GTP se une al Ras y lo activa. A su vez, la unión de GTP a la Ras induce una conformación específica de Interruptor I e Interruptor II que permite que la Ras-GTP active a la siguiente proteína en la vía de la Ras cinasa/MAP.

Las señales pasan de la Ras activada a una cascada de proteincinasas y termina con la MAP cinasa

Los estudios bioquímicos y genéticos en las levaduras, *C. elegans*, *Drosophila* y mamíferos han revelado que corriente abajo de Ras hay una cascada muy conservada de tres proteincinasas que culmina en la MAP cinasa. Si bien la activación de la cascada de cinasa no da los mismos resultados biológicos en todas las células, un conjunto común de cinasas que actúan de modo secuencial define la vía de la Ras/MAP cinasa, según se reseña en la Figura 16-20. La Ras se activa por el intercambio de GTP por GDP (paso 1). El Ras-GTP activo se une al dominio N-terminal regulador de Raf, una cinasa de serina/treonina (no tirosina), y la activa (paso 2). En las células no estimuladas, la Raf se fosforila y se une en un estado inactivo a la proteína que une fosfoerina 14-3-3. La hidrólisis de Ras-GTP a Ras-GDP libera Raf activa desde su complejo con 14-3-3 (paso 3) y la Raf posteriormente fosforila y, por lo tanto, activa la MEK (paso 4). (Una cinasa proteica de especificidad doble, la MEK, fosforila sus proteínas diana tanto sobre los residuos de tirosina como serina/treonina). La MEK activa fosforila y activa entonces a la MAP cinasa, otra cinasa de serina/treonina conocida también como ERK (paso 5). La MAP cinasa fosforila muchas proteínas distintas, incluyendo los factores de transcripción nuclear que median las respuestas celulares (paso 6).

Varios tipos de experimentos han demostrado que Raf, MEK y MAP cinasas se encuentran corriente abajo de la Ras y han revelado el orden secuencial de estas proteínas en la vía. Por ejemplo, proteínas Raf mutantes que carecen del dominio regulador N-terminal son activas constitutivamente e inducen a las células en cultivo quiescentes a proliferar en ausencia de estimulación por factores de crecimiento. En un inicio, estas proteínas Raf mutantes se identificaron en las célu-

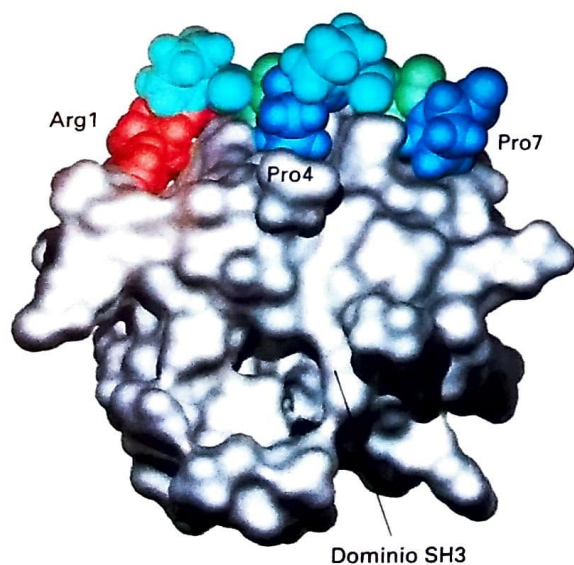


FIGURA 16-18 Modelo superficial de un dominio de SH3 unido a un péptido diana. El péptido diana corto, rico en prolinas, se muestra como un modelo espacial. En este péptido diana, dos prolinas (Pro4 y Pro7, en azul oscuro) encajan en bolsillos de unión sobre la superficie del dominio SH3. Las interacciones que involucran una arginina (Arg1, rojo), otras dos prolinas (azul claro) y otros residuos en el péptido diana (verde) determinan la especificidad de la unión. (Tomado de H. Yu y cols., 1994, *Cell* 76:933.)

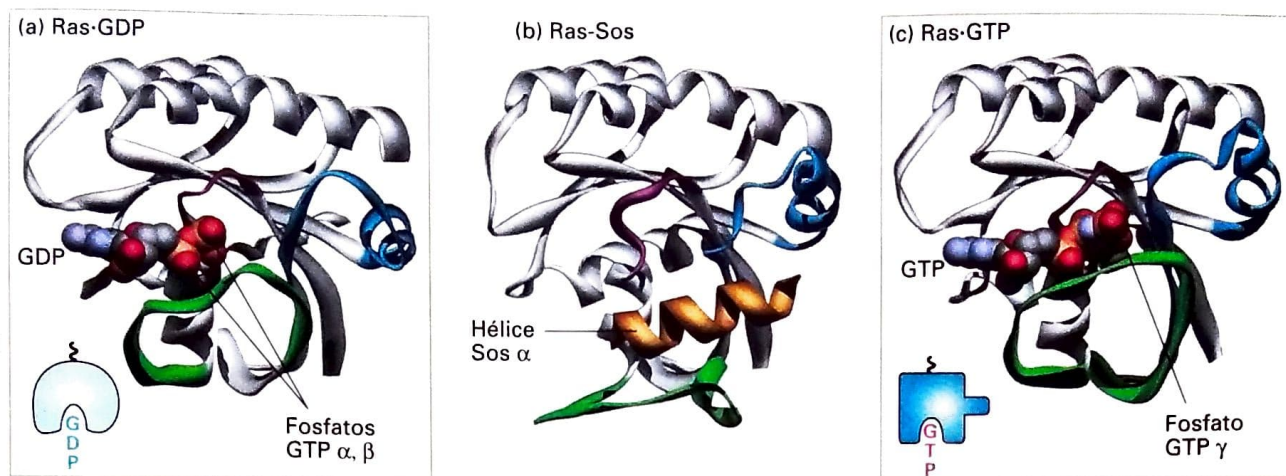


FIGURA 16-19 Estructuras de Ras unidas a GDP, proteína Sos y GTP.

(a) En Ras-GDP, los segmentos Interruptor I (verde) e Interruptor II (azul) no interactúan directamente con GDP. (b) Una hélice α (pardo) de Sos se une a ambas regiones interruptoras de Ras-GDP, lo que conduce a un cambio de conformación masivo en Ras. En efecto, Sos abre Ras y desplaza la región Interruptor I, lo que permite así que GDP difunda hacia el exterior. (c) Se cree que GTP se une al complejo Ras-Sos en primer lugar a través de su base

(guanina); la unión posterior de los fosfatos del GTP completa la interacción. El cambio de conformación resultante en los segmentos Interruptor I e Interruptor II de la Ras que permiten que tanto el fosfato GTP γ desplace al Sos y promueve la interacción del Ras-GTP con sus efectores (que se analizará posteriormente). Véase la Figura 15-8 para otro análisis de Ras-GDP y Ras-GTP.

(Adaptado de P. A. Boriack-Sjodin y J. Kuriyan, 1998, *Nature* **394**:341.)

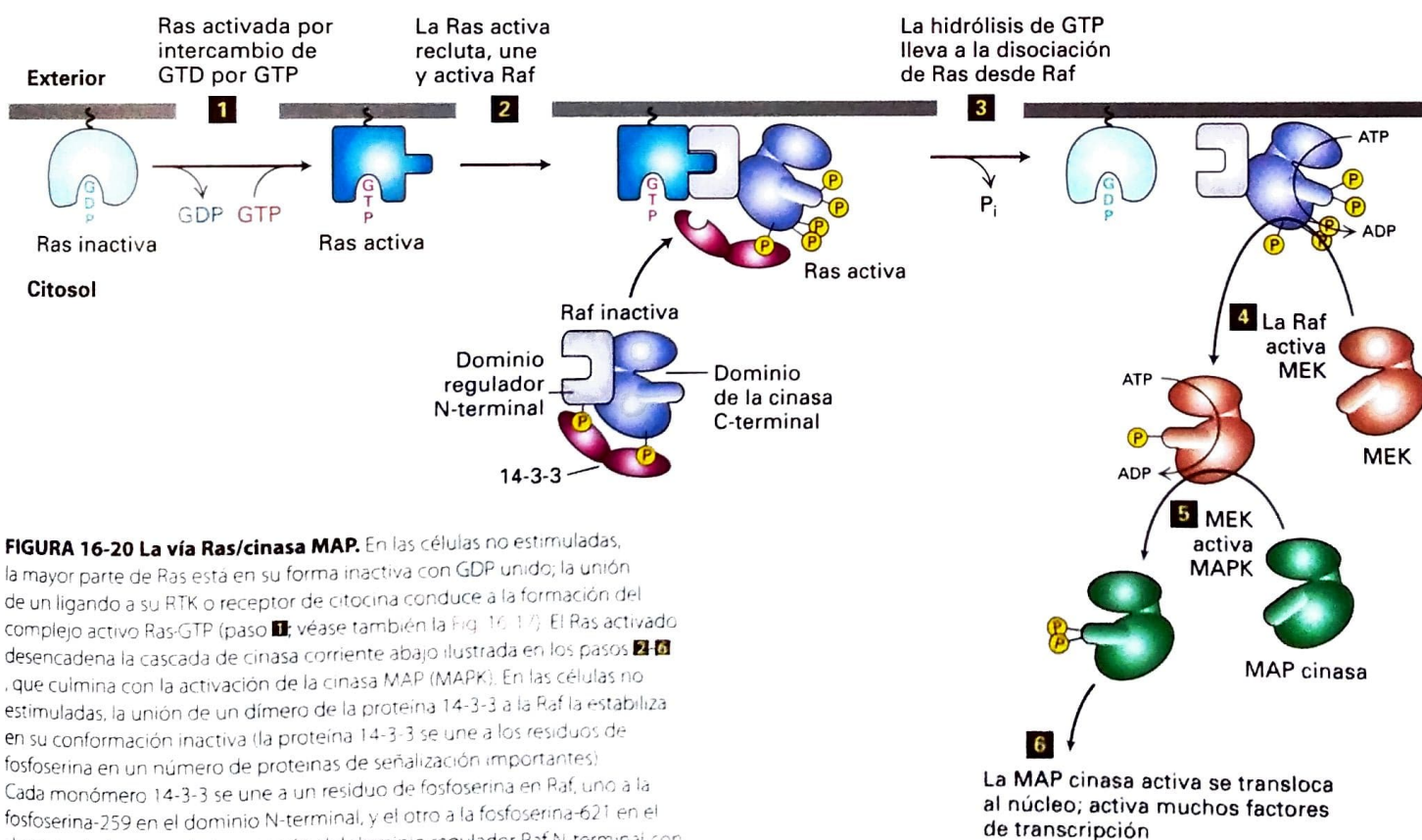


FIGURA 16-20 La vía Ras/cinasa MAP. En las células no estimuladas, la mayor parte de Ras está en su forma inactiva con GDP unido; la unión de un ligando a su RTK o receptor de citocina conduce a la formación del complejo activo Ras-GTP (paso 1; véase también la Fig. 16-17). El Ras activado desencadena la cascada de cinasa corriente abajo ilustrada en los pasos 2-6, que culmina con la activación de la cinasa MAP (MAPK). En las células no estimuladas, la unión de un dímero de la proteína 14-3-3 a la Raf la estabiliza en su conformación inactiva (la proteína 14-3-3 se une a los residuos de fosforesina en un número de proteínas de señalización importantes). Cada monómero 14-3-3 se une a un residuo de fosforesina en Raf, uno a la fosforesina-259 en el dominio N-terminal, y el otro a la fosforesina-621 en el dominio de la cinasa. La interacción del dominio regulador Raf N-terminal con Ras-GTP resulta en la desfosforilación de una de las serinas que unen Raf a 14-3-3, la fosforilación de los otros residuos y la activación de la actividad de cinasa Raf. Después de que el Ras-GDP inactivo se disocia de Raf, presumiblemente puede ser reactivado por señales provenientes de los receptores activados, y recluta así moléculas adicionales de Raf a la membrana. (Véase E. Kerkhoff y J. Rapp, 2001, *Adv. Enzyme Regul.* **41**:261; J. Avruch y cols., 2001, *Recent Prog. Hormone Res.* **56**:127; M. Yip-Schneider y cols., 2000, *Biochem. J.* **351**:151.)

2001, *Adv. Enzyme Regul.* **41**:261; J. Avruch y cols., 2001, *Recent Prog. Hormone Res.* **56**:127; M. Yip-Schneider y cols., 2000, *Biochem. J.* **351**:151.)

las tumorales; al igual que la proteína Ras^D activa constitutivamente, se dice que estas proteínas Raf mutantes están codificadas por **oncogenes** cuyas proteínas codificadas promueven la transformación de las células en las cuales se expresan (véase el Cap. 24). Por el contrario, las células de mamífero en cultivo que expresan una proteína Raf mutante no funcional no pueden ser estimuladas para proliferar sin control por una proteína Ras^D activa constitutivamente. Este hallazgo estableció un vínculo entre las proteínas Ras y Raf y demostró que Raf se encuentra corriente abajo de Ras en la vía de señalización. Estudios de unión in vitro mostraron adicionalmente que la proteína Ras-GTP purificada se une directamente al dominio regulador N-terminal de la Raf y activa su actividad catalítica.

El hecho de que la MAP cinasa se activa en respuesta a la activación de Ras fue demostrado en células cultivadas quiescentes que expresaban una proteína Ras^D constitutivamente activa. En estas células, la MAP cinasa activada es generada en ausencia de estimulación por hormonas promotoras del crecimiento. Más importante, los fotoreceptores R7 se desarrollan normalmente en el ojo en desarrollo de mutantes de *Drosophila* que carecen de proteína Ras o Raf funcional pero expresan una MAP cinasa activa constitutivamente. Este hallazgo indica que la activación de la MAP cinasa es suficiente para transmitir una señal de proliferación o de diferenciación normalmente iniciada por un ligando que se une a un receptor de tirosincinasa como el Sevenless (véase la Fig. 16-16). Sin embargo, estudios bioquímicos demostraron que la Raf no puede fosforilar de forma directa la MAP cinasa o activarla de otro modo.

El vínculo final en la cascada de cinasas activadas por Ras-GTP surgió de estudios en los cuales los científicos fraccionaron extractos de células cultivadas en busca de la actividad de cinasa que podría fosforilar a la MAP cinasa y que estaba presente solo en las células estimuladas con factores de crecimiento, no en células no estimuladas. Este trabajo condujo a la identificación de MEK, una cinasa que fosforila de forma específica una treonina y un residuo de tirosina en el labio de activación de la MAP cinasa y que, por lo tanto, activa su acción catalítica. (El acrónimo *MEK* proviene de MAP y ERK cinasa). Estudios posteriores demostraron que MEK se une al dominio catalítico C-terminal de una Raf y es fosforilada por la cinasa serina/treonina de Raf; esta fosforilación activa la acción catalítica de la MEK.

Así, la activación de la Ras induce una cascada de cinasas, que incluye Raf, MEK y MAP cinasa: RTK → Ras-Raf → MEK-MAP cinasa activados. Aunque aquí no pondremos énfasis en esto, la complejidad de esta vía se incrementa por las múltiples isoformas de cada uno de sus componentes. En los seres humanos, hay tres Ras, tres Raf, dos MEK y dos proteínas Erk; cada una de estas se superponen, pero tienen funciones no redundantes.

 Las mutaciones activadoras del gen *B-Raf* ocurren en más del 40% de los melanomas, un cáncer de piel que con frecuencia es provocado por la exposición a la radiación solar ultravioleta. De estos melanomas, una mutación particular, una sustitución de valina por ácido glutámico en la posición 600, da cuenta de más del 90% de ellos. Esta mutante *B-Raf* estimula la señalización MEK-ERK en las células en ausencia de factores de crecimiento, y los transgenes mutantes *B-Raf* inducen melanomas en los ratones. Recientemente, inhibidores muy potentes y selectivos de la cinasa *B-Raf* han entrado en la práctica clínica y están produciendo excelentes respuestas en pacientes con el melanoma *B-Raf* mutante. ■

La fosforilación de la MAP cinasa resulta en un cambio de conformación que incrementa su actividad catalítica y promueve la dimerización de la cinasa

Estudios bioquímicos y cristalográficos de rayos X han proporcionado un panorama detallado del modo en que la fosforilación activa la MAP cinasa. Como en las cinasas JAK y los receptores tirosincinasa, el sitio catalítico en la forma inactiva no fosforilada de la MAP cinasa está bloqueado por un tramo de aminoácidos, el labio de activación (Fig. 16-21a). La unión de MEK a la MAP cinasa desestabiliza la estructura del labio, lo que da como resultado la exposición de una tirosina-185 enterrada en la conformación inactiva. Después de la fosforilación de esta tirosina crítica, la MEK fosforila la treonina-183 vecina (Fig. 16-21b).

Tanto la tirosina fosforilada como el residuo de treonina fosforilada en la MAP cinasa interactúan con aminoácidos adicionales; por lo tanto, esto resulta en una conformación alterada a la región del labio, lo que a su vez permite la unión de ATP al sitio catalítico, el cual, como en todas las cinasas, se encuentra en el surco entre los dominios superior e inferior de la cinasa. El residuo de fosfotirosina (pT185) también desempeña en este caso un papel central en la unión de proteínas sustrato-específicas a la superficie de la MAP

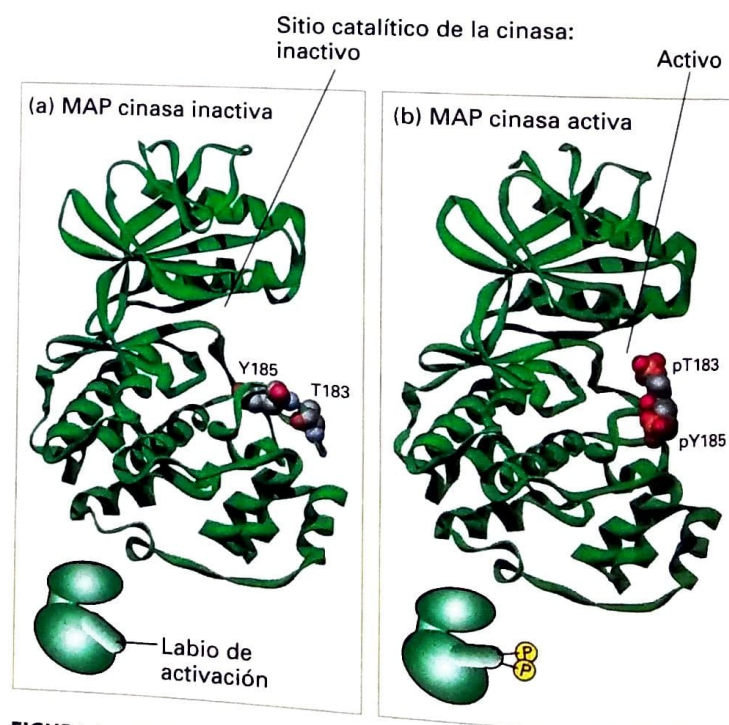


FIGURA 16-21 Estructuras de la cinasa MAP inactiva, no fosforilada y de la forma activa fosforilada. (a) En la MAP cinasa inactiva, el labio de activación está en una conformación tal que bloquea el sitio activo de la cinasa. (b) La fosforilación por la MEK, de la tirosina-185 (Y185) y la treonina-183 (T183) conduce a un cambio de conformación pronunciado en el labio de activación. Este cambio de conformación promueve tanto la unión de la cinasa MAP a sus sustratos (ATP y sus proteínas diana) a la cinasa como la dimerización de las cinasas JAK y la actividad intrínseca de cinasa de los RTK. (Tomado de B. J. Canagarajah y cols., 1997, *Cell* 90:859.)

cinasa. La fosforilación promueve no solo la actividad catalítica de la MAP cinasa, sino también su dimerización. La forma dimérica de la MAP cinasa es translocada al núcleo, donde regula la actividad de muchos factores de transcripción nucleares.

La MAP cinasa regula la actividad de muchos factores de transcripción que controlan los genes de respuesta temprana

La adición de un factor de crecimiento (p. ej., EGF o PDGF) a células de mamífero en cultivo quiescentes (que no están en crecimiento) causa un rápido incremento en la expresión de hasta 100 genes distintos. Estos se llaman *genes de respuesta temprana* porque se inducen mucho antes de que las células ingresen en la fase S y repliquen su DNA (véase el Cap. 20). Un gen de respuesta temprana importante codifica el factor de transcripción c-Fos. Junto con otros factores de transcripción, como el c-Jun, el c-Fos induce la expresión de muchos genes que codifican proteínas necesarias para

que las células avancen a través del ciclo celular. La mayor parte de los RTK que unen factores de crecimiento emplean la vía de la MAP cinasa para activar genes que codifican proteínas como c-Fos, que a su vez impulsan la célula a través del ciclo celular.

El mediador que regula al gen *c-fos* contiene un *elemento de respuesta del suero (ERS)*, llamado de este modo porque es activado por muchos factores de crecimiento del suero. Este impulsor complejo contiene secuencias de DNA que unen múltiples factores de transcripción. Como se ilustra en la Figura 16-22, la MAP cinasa dimérica activada (fosforilada) induce la transcripción del gen *c-fos* por activación directa de un factor de transcripción, el *factor complejo ternario (FCT)*, y la activación indirecta de otro *factor de respuesta del suero (FRS)*. En el citosol, la MAP cinasa fosforila y activa una cinasa llamada $p90^{RSK}$, que se transloca al núcleo donde fosforila una serina específica del FRS. Después de la translocación al núcleo, la MAP cinasa directamente fosforila serinas específicas del FCT. La asociación del FCT fosforilado con dos moléculas de FRS fosforiladas forma un factor trimérico activo que activa la transcripción génica.

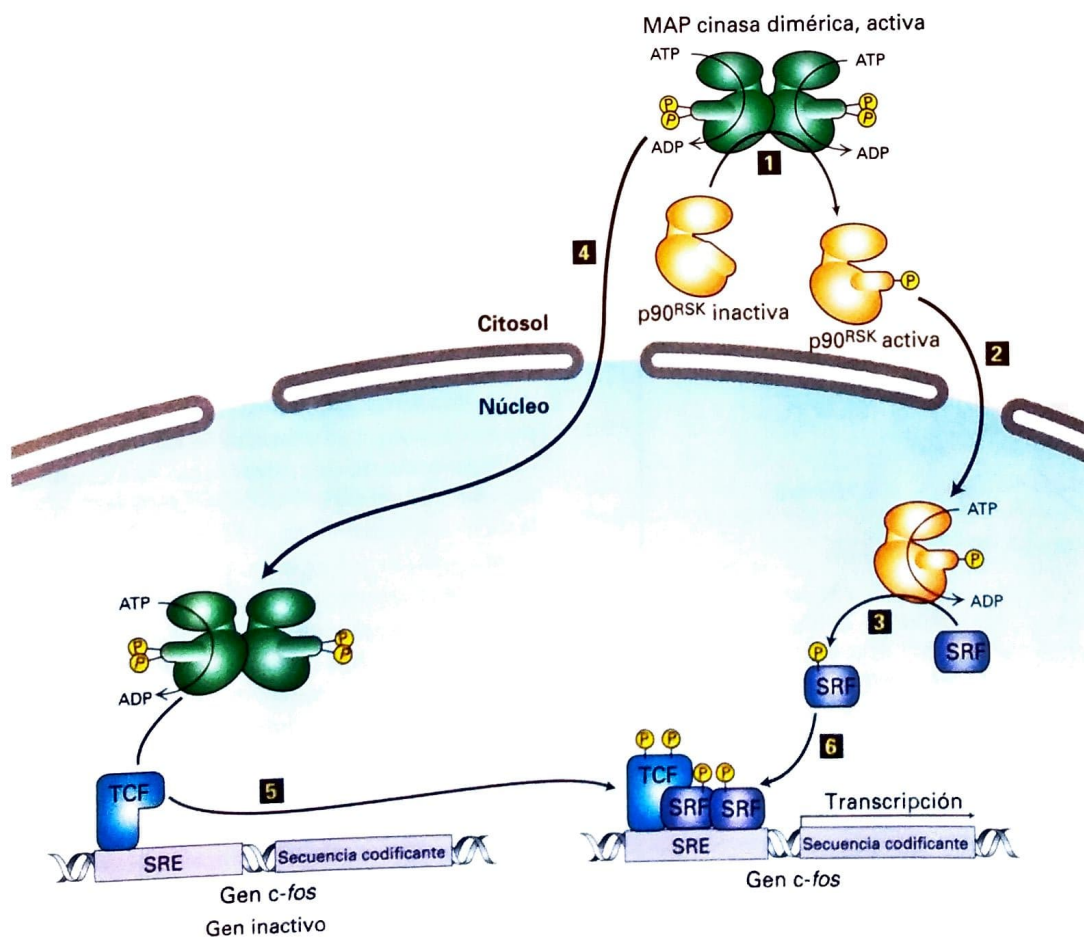


FIGURA 16-22 Inducción de la transcripción de los genes por la cinasa MAP. Pasos 1-6: en el citosol, la cinasa MAP fosforila y activa la cinasa $p90^{RSK}$, que luego se mueve al núcleo y fosforila el factor de transcripción SRF. Pasos 4 y 5: después de la translocación al núcleo, la cinasa MAP fosforila directamente el factor de transcripción TCF que ya está unido al promotor del gen *c-fos*. Paso 6: el TCF y el SRF fosforilados actúan juntos para estimular la transcripción de los genes (p. ej., *c-fos*) que contienen una secuencia ERS en su promotor. Véase el texto para detalles. (Véase R. Marais y cols., 1993, *Cell* 73:381, y V. M. Rivera y cols., 1993, *Mol. Cell. Biol.* 13:6260.)

Los receptores acoplados a la proteína G transmiten señales a la MAP quinasa en las vías de apareamiento de las levaduras

Aunque en los animales multicelulares la MAP quinasa con frecuencia es activada por los RTK o receptores de las citocinas, la señalización proveniente de otros receptores puede activar la MAP quinasa en diferentes células eucarióticas (véase la Fig. 15-34). A modo de ilustración, consideremos la vía de apareamiento en *S. cerevisiae*, un ejemplo bien estudiado de una cascada de MAP quinasa ligada a los receptores acoplados a la proteína G (GPCR), en este caso, para dos feromonas peptídicas secretadas, los factores α y a .

Las células de levadura haploides son o bien del tipo de apareamiento a o bien α y secretan señales proteicas conocidas como feromonas, que inducen el apareamiento entre las células de levadura haploide del tipo de apareamiento opuesto, a o α . Una célula haploide a secreta el factor de apareamiento a y tiene receptores de la superficie celular para el factor α ; una célula α secreta el factor del mismo nombre y tiene receptores de superficie para el factor a (véase la Fig. 16-23). Así, cada tipo de célula reconoce el factor de apareamiento producido por el tipo opuesto. La activación de la vía de la MAP quinasa por los receptores a o α induce la transcripción de genes que inhiben la progresión del ciclo celular y otros que capacitan a las células del tipo de apareamiento opuesto para fusionarse y finalmente formar una célula diploide.

La unión del ligando a cualquiera de los dos GPCR de feromona de las levaduras desencadena el intercambio de GTP por GDP en la subunidad G_α y la disociación de G_α -GTP del complejo $G_{\beta\gamma}$. Este proceso de activación es idéntico al del GPCR analizado en el capítulo previo (véase la Fig. 15-17). En muchas vías iniciadas por GPCR en los mamíferos, el G_α activo transduce la señal. Por el contrario, estudios en mutantes y bioquímicos han mostrado que el complejo $G_{\beta\gamma}$ disociado media todas las respuestas fisiológicas inducidas por la activación de los receptores de feromonas en la levadura (Fig. 16-24a). Por ejemplo, en las levaduras que carecen de G_α disociada, la subunidad $G_{\beta\gamma}$ siempre está libre. Estas células pueden aparearse en ausencia de los factores de apareamiento; es decir, la respuesta de apareamiento está constitutivamente activa. Sin embargo, en las células defectuosas para la subunidad G_β o G_γ , la vía de apareamiento no puede ser inducida en absoluto. Si una G_α fuese el transductor, en estas células mutantes se esperaría que la vía fuese constitutivamente activa.

En las vías de apareamiento de las levaduras, la $G_{\beta\gamma}$ funciona desencadenando una cascada de cinasas análoga a la que se encuentra corriente abajo respecto de Ras; cada proteína tiene un nombre específico para la levadura, pero comparte secuencias y es de estructura y función análoga a la proteína de mamífero correspondiente que se muestra en la Figura 16-20. Los componentes de esta cascada se descubrieron principalmente a través del análisis de mutaciones estériles (*Ste*) o defectuosos en las respuestas de apareamiento. Las interacciones físicas entre los componentes fueron evaluadas a través de experimentos de inmunoprecipitación con extractos de células de levaduras y otros tipos de estudios. Sobre la base de que se muestra en la Figura 16-24a. La $G_{\beta\gamma}$ libre, que está unida a la proteína Ste5, y la recluta, y a sus cinasas unidas a la membrana

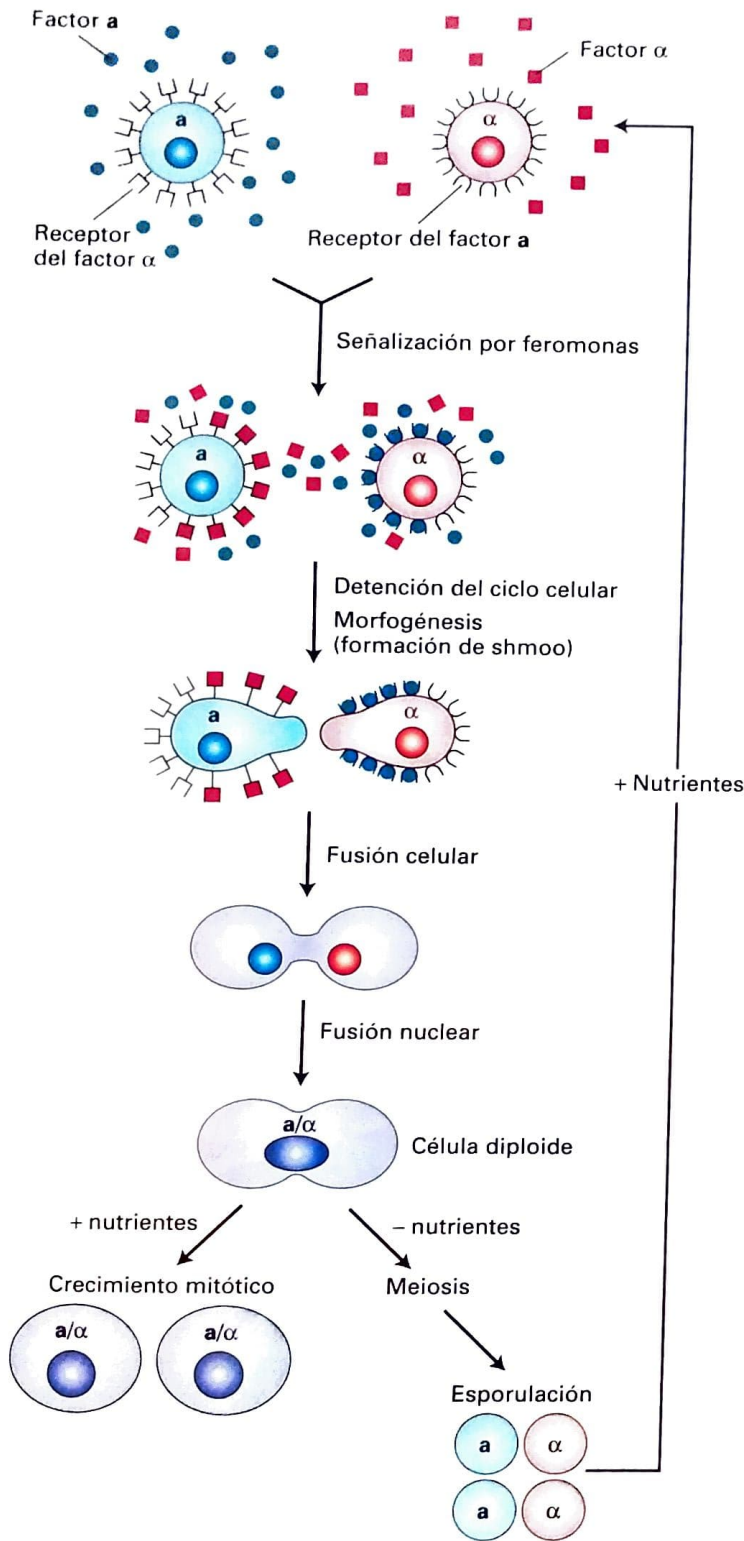


FIGURA 16-23 Apareamiento de células de levaduras haploides inducido por feromonas. Las células α producen el factor de apareamiento a y el receptor del factor a ; las células a producen el factor a y el receptor del factor α . Ambos son receptores acoplados a la proteína G. La unión de los factores de apareamiento a sus receptores afines sobre las células del tipo opuesto conduce a la activación génica, lo que da como resultado el apareamiento y la producción de células diploides. En presencia de suficientes nutrientes, estas células crecerán como diploides. Sin suficientes nutrientes, las células pasarán por meiosis y formarán cuatro esporas haploides.

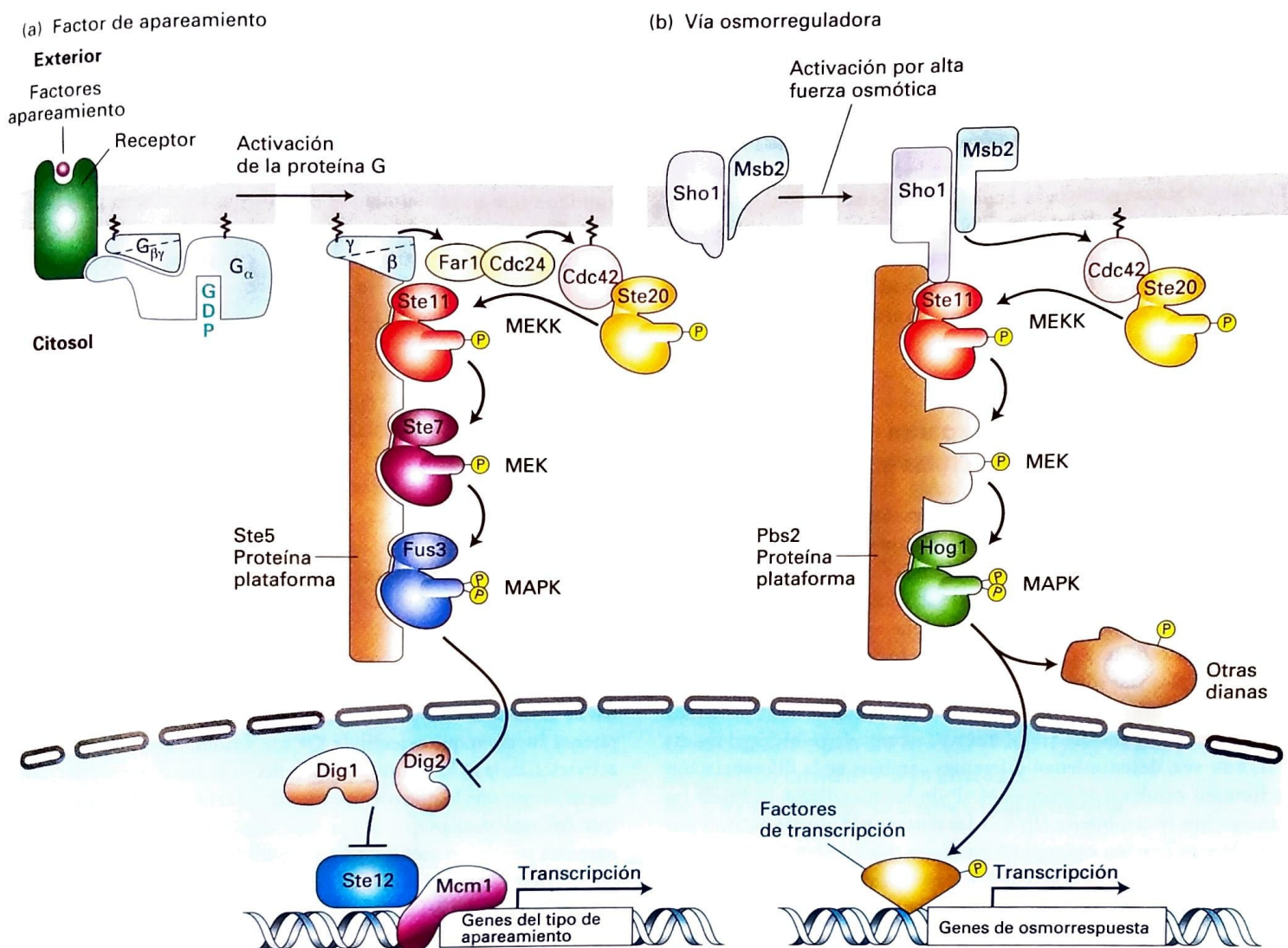


FIGURA 16-24 Cascadas de cinasas MAP en las levaduras en las vías de apareamiento y osmorreguladora. En las levaduras, diferentes receptores activan distintas vías de cinasas MAP, dos de las cuales están esquematizadas aquí. Las dos MEK esquematizadas, al igual que todas las MEK, son cinasas de especificidad doble treonina/tirosina; todas las otras son cinasas serina/treonina. (a) *Vía de apareamiento*: los receptores para los factores de apareamiento de las levaduras α y a están acoplados a las mismas proteínas G triméricas. Después de la unión al ligando y de la disociación de las subunidades de la proteína G, la subunidad $G_{\beta\gamma}$ unida a la membrana liga el andamio Ste5 a la membrana plasmática. $G_{\beta\gamma}$ también activa la Cdc24, un GEF para la proteína Cdc42 de tipo Ras; a su vez, el GTP-unido a Cdc42 activo se une y activa la cinasa Ste20 residente. Ste20 entonces se fosforila y activa a Ste11, que es análoga a la Raf y a otra cinasa MEK de los mamíferos, las proteínas MEKK. Ste20 sirve así como una cinasa MAPKKK. La Ste11 inicia una cascada de cinasas en las cuales el componente final, Fus3, es funcionalmente equivalente a la cinasa MAP (MAPK) de los eucariontes superiores. Al igual que otras cinasas MAP, la Fus3 activada entonces se transloca al núcleo. Allí fosforila dos proteínas, la Dig1 y la Dig2, y alivia su inhibición en el factor de

transcripción Ste12, lo cual permite su unión al DNA e inicia la transcripción de los genes que inhiben la progresión del ciclo celular y otros que permiten que las células de tipo de apareamiento opuesto se fusionen y finalmente formen una célula diploide. (b) *Vía osmorreguladora*: dos proteínas de la membrana plasmática, Sho1 y Msb1, se activan de modo desconocido por la exposición de las levaduras a medios de alta fuerza osmótica. La Sho1 activada recluta la proteína andamio Pbs2, que contiene un dominio MEK, a la membrana plasmática. De modo similar a la vía de apareamiento en la membrana plasmática, el complejo Sho1Msb1 también activa a Cdc42, que a su vez activa la cinasa residente Ste20. La Ste20, a su vez, fosforila y activa la Ste11, e inicia una cascada de cinasa que activa la Hog1, una cinasa MAP. En el citosol, la Hog1 fosforila dianas proteicas específicas, incluyendo los canales iónicos; después de la translocación al núcleo, la Hog1 fosforila varios factores de transcripción y enzimas que modifican la cromatina. La Hog1 también promueve la elongación transcripcional. En conjunto, las nuevas proteínas sintetizadas y modificadas sostienen la supervivencia en medios de fuerza osmótica elevada. (Tomado de N. Dard y M. Peter, 2006, *BioEssays* 28:146, y R. Chen y J. Thorne, 2007, *Biochim. Biophys. Acta* 1773:1311.)

plasmática. La Ste5 no tiene una función catalítica obvia y actúa como una plataforma para el ensamblaje de otros componentes de la cascada (Ste11, Ste7 y Fus3). La $G_{\beta\gamma}$ también activa cdc24, un GEF para la proteína tipo Ras cdc42; a su vez, el GTP-cdc42 activa la proteína cinasa Ste20. La Ste20 fosforila y activa la Ste11, una cinasa de serina/treonina análoga a la Raf y otras proteínas MEKK de mamíferos. La Ste11 activada fosforila luego a la Ste7, una MEK de especificidad doble que entonces fosforila y activa a la Fus3, una cinasa de serina/treonina equivalente a la MAP cinasa. Después de la translocación al núcleo, la Fus3 fosforila dos proteínas, la Dig1 y la Dig2, y alivia su inhibición del factor de transcripción Ste12. A su vez, el Ste12 activado induce la expresión de proteínas implicadas en las respuestas celulares específicas del apareamiento. La Fus3 también afecta la expresión génica a través de la fosforilación de otras proteínas.

Las proteínas plataforma separan múltiples vías de las cinasas MAP en las células eucarióticas

Tanto las levaduras como las células eucarióticas superiores contienen una vía de señalización Ras/MAP cinasa que se activa por señales proteicas extracelulares y culmina en la fosforilación de factores de transcripción y otras proteínas de señalización por acción de la MAP cinasa que, en conjunto, desencadenan cambios específicos en la conducta celular. Es importante que todos los eucariontes posean múltiples vías muy conservadas de cinasas MAP activadas por diferentes señales extracelulares y que activan diferentes proteínas MAP cinasa que fosforilan diferentes factores de transcripción; estos, a su vez, desencadenan diferentes cambios en la diferenciación o función celular. Las cinasas MAP de los mamíferos incluyen las cinasas *Jun N-terminales* (JNK) y las cinasas *p38*, que se activan por vías de señalización en respuesta a varios tipos de estrés y fosforilan distintos factores de transcripción y otros tipos de proteínas de señalización que afectan la división celular.

Los estudios bioquímicos y genéticos en curso en ratones y *Drosophila* tienen como objetivo determinar qué cinasas MAP median qué tipo de respuestas en cuáles señales en los eucariontes superiores. Esto ya ha sido completado en gran medida para el organismo *S. cerevisiae*, que es el más simple. Cada una de las seis cinasas MAP codificadas en el genoma de la *S. cerevisiae* ha sido asignada por análisis genético a vías de señalización desencadenadas por varias señales extracelulares, como feromonas, alta osmolaridad, falta de alimento, choque hipotónico y carencia de carbono/nitrógeno. Una segunda cascada de MAP cinasa de las levaduras, conocida como la vía osmorreguladora, se muestra en la Figura 16-24b. Cada MAP cinasa de la levadura media respuestas celulares muy específicas, según lo ejemplifica la Fus3 en la vía de apareamiento y la Hog1 en la vía osmorreguladora.

Surge una complicación porque, en ambos, levaduras y eucariontes superiores, diferentes cascadas de MAP cinasa comparten algunos componentes. Por ejemplo, la Ste11 MEKK funciona en tres vías de señalización de las levaduras: la vía de apareamiento, la vía de osmorregulación y la vía de crecimiento de los filamentos, que es inducida por la inanición. Sin embargo, cada vía activa una MAP cinasa distinta. De modo similar, en las células de mamífero las proteínas de transducción de la señal comunes corriente arriba participan en la activación de múltiples cinasas JNK.

Una vez reconocidos los distintos componentes compartidos en las diferentes vías de la MAP cinasa, los investigadores se preguntaron de qué manera se logra la especificidad de las respuestas celulares a señales particulares. Los estudios realizados con levaduras proporcionaron evidencias iniciales de que las proteínas plataforma específicas de la vía permitían que las cinasas transductoras de la señal de una vía en particular interactuaran entre sí, pero no con cinasas de otras vías. Por ejemplo, la proteína plataforma Ste5 estabiliza un gran complejo que incluye a las cinasas de la vía de apareamiento; de modo similar, la plataforma Pbs2 se emplea para la cascada de cinasas en la vía osmorreguladora (véase la Fig. 16-24). En cada vía en la que participa la Ste11, esta se encuentra restringida dentro de un gran complejo que se forma en respuesta a una señal extracelular específica, y la señalización corriente abajo desde Ste11 está restringida al complejo en el cual se localiza. Como resultado, la exposición de las levaduras a los factores de apareamiento induce la activación de una MAP cinasa única, la Fus3, mientras que la exposición a la elevada osmolaridad induce la activación de una MAP cinasa distinta, la Hog1.

Las plataformas para las vías de cinasas MAP están bien documentadas en las levaduras, moscas y gusanos, pero la presencia en células de mamífero ha sido difícil de demostrar. Quizás la proteína plataforma mejor documentada en los metazoarios es la Ksr (por su denominación en inglés, *kinase suppressor of Ras* o supresor de la cinasa de Ras), que une tanto a MEK como a la cinasa de MAP. En la *Drosophila*, la pérdida del homólogo de Ksr bloquea la señalización por una proteína Ras activa constitutivamente, lo cual sugiere una función positiva para la Ksr en la vía de la Ras/MAP cinasa en las células de la mosca. Si bien los ratones *knockout* que carecen de Ksr son fenotípicamente normales, la activación de la MAP cinasa por los factores de crecimiento o las citocinas es menor que lo normal en varios tipos celulares de estos animales. Este hallazgo sugiere que la Ksr funciona como una plataforma que aumenta pero no es esencial para la señalización de la Ras/MAP cinasa en las células de mamífero. Así, la especificidad de la señal de diferentes cinasas MAP en las células animales puede surgir a partir de su asociación con varias proteínas del tipo plataforma, pero se requiere mucha investigación adicional para probar esta posibilidad.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 16.2

La vía de la Ras/ MAP cinasa

- La Ras es una proteína interruptora GTPasa intracelular que actúa corriente abajo desde la mayoría de los RTK y los receptores de citocinas. Al igual que la G_{α} , la Ras cicla entre una forma inactiva unida a GDP y otra activa unida a GTP. El ciclado de la Ras requiere el auxilio de dos proteínas: un factor de intercambio de guanina nucleótido (GEF) y una proteína activadora de la GTPasa (GAP).
- Los RTK están vinculadas indirectamente a la Ras a través de dos proteínas: GRB2, una proteína adaptadora, y Sos, que tiene actividad GEF (véase la Fig. 16-17).
- El dominio SH2 de la GRB2 se une a una fosfotirosina en las RTK activadas, mientras que sus dos dominios SH3 se unen a Sos, y la lle-

van así a la proximidad del Ras-GDP unido a la membrana y activan su actividad de intercambio de nucleótido.

- La unión de Sos a la Ras inactiva provoca un cambio de conformación grande que permite la liberación de GDP y la unión de GTP, lo que forma Ras activa (véase la Fig. 16-19).
- La Ras activada desencadena una cascada de cinasa en la cual la Raf, MEK y la MAP cinasa se fosforilan secuencialmente y, de este modo, se activan. Luego, la MAP cinasa activada se transloca al núcleo (véase la Fig. 16-20).
- La activación de la MAP cinasa después de la estimulación de un receptor del factor de crecimiento conduce a la fosforilación y activación de dos factores de transcripción, que se asocian en un complejo trimérico que promueve la transcripción de varios genes de respuesta temprana (véase la Fig. 16-22).
- Diferentes señales extracelulares inducen la activación de distintas vías de MAP cinasa, que regulan diversos procesos extracelulares al fosforilar diferentes conjuntos de factores de transcripción.
- Los componentes de la cinasa de cada cascada de MAP cinasa se ensamblan en un complejo grande, específico de la vía, estabilizado por una proteína plataforma (véase la Fig. 16-24). Esto asegura que la activación de una vía de MAP cinasa por una señal extracelular particular no conduzca a la activación de otras vías que contengan componentes compartidos.

16.3 Las vías de señalización de los fosfoinosítidos

En secciones previas, hemos visto de qué modo la transducción de la señal desde los receptores tirosincinasas (RTK) y los receptores de citocinas se inicia con la formación de complejos multiproteicos asociados con la membrana plasmática (véanse las Figs. 16-12 y 16-13) y de qué manera estos complejos inician la vía de Ras/MAP cinasa. Aquí, analizaremos cómo estos mismos receptores inician las vías de señalización que involucran como intermediarios fosfolípidos fosforilados especiales, derivados del fosfatidil inositol. Como analizamos en el Capítulo 15, estos lípidos unidos a la membrana se conocen colectivamente como **fosfoinosítidos**. Estas vías de señalización de fosfoinosítidos incluyen varias enzimas que sintetizan diferentes fosfoinosítidos y proteínas, con dominios que pueden unirse a estas moléculas y, por lo tanto, son reclutadas a la superficie citosólica de la membrana plasmática. Además de los efectos a corto plazo sobre el metabolismo celular que encontramos en el Capítulo 15, estas vías de los fosfoinosítidos tienen efectos a largo plazo sobre el patrón de expresión génica. Aquí veremos que las vías de los fosfoinosítidos finalizan con una variedad de cinasas, que incluyen la proteincinasa C (PKC) y la proteincinasa B (PKB), que desempeñan papeles centrales en el crecimiento y el metabolismo celular. Como ejemplo, más adelante en el capítulo, veremos de qué manera la activación por insulina de la PKB desempeña un papel central en estimular la importación de glucosa al músculo.

La fosfolipasa C_γ es activada por algunos RTK y receptores de citocina

Como analizamos en el Capítulo 15, la estimulación hormonal de algunos receptores acoplados a la proteína G lleva a la activación de la fosfolipasa C (PLC). Esta enzima asociada a la membrana luego escinde al fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) para generar dos segundos mensajeros importantes: 1,2-diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃). La señalización a través de la vía IP₃/DAG lleva a un incremento en el Ca²⁺ citosólico y a la activación de la proteincinasa C (véase la Fig. 15-36).

Aunque no lo mencionamos durante nuestro análisis de la fosfolipasa C en el Capítulo 15, es específicamente la isoforma β de esta enzima (PLC_β) la que es activada por acción de las GPCR. Muchos RTK y receptores de citocinas también inician la vía IP₃/DAG activando otra isoforma de la fosfolipasa C, la isoforma γ (PLC_γ), una isoforma que contiene dominios SH2. Los dominios SH2 de la PLC_γ se unen a fosfotirosinas específicas sobre los receptores activados, y posicionan así la enzima en la cercanía de su sustrato unido a la membrana, el fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP₂). Además, la actividad de cinasa asociada con la activación del receptor fosforila los residuos de tirosina en la PLC unida, lo que aumenta su actividad de hidrolasa. De esta manera, los RTK activados y los receptores de citocina promueven la actividad de PLC_γ de dos modos: localizando la enzima en la membrana y fosforilándola. Como se vio en el Capítulo 15, la vía de la IP₃/DAG iniciada por la PLC tiene múltiples efectos fisiológicos.

El reclutamiento de la PI-3 cinasa a los receptores activados conduce a la síntesis de tres fosfatidilinositoles fosforilados

Además de la vía IP₃/DAG, muchos RTK y receptores de citocina activados inician otra vía de fosfoinosítidos al reclutar la enzima *fosfatidilinositol-3 (PI-3) cinasa* a la membrana. La PI-3 cinasa es reclutada a la membrana plasmática por la unión de su dominio SH2 a las fosfotirosinas del dominio citosólico de muchos RTK activados y receptores de citocinas. Este reclutamiento ubica al dominio catalítico de la PI-3 cinasa cerca de sus sustratos fosfoinosítidos sobre la cara citosólica de la membrana plasmática. A diferencia de las cinasas encontradas previamente que fosforilan proteínas, la PI-3 cinasa añade un fosfato al carbono 3' del fosfatidilinositol del lípido, lo que lleva a la formación de dos 3-fosfatos fosfatidilinositol separados: el PI 3, 4-bisfosfato o PI 3,4,5-trifosfato (Fig. 16-25). Al actuar como sitios de anclaje para varias proteínas de transducción de las señales, estos productos del PI 3-fosfato unidos a la membrana de las reacciones de la PI-3 cinasa a su vez transducen señales corriente abajo en varias vías importantes.

En algunas células, esta vía de la *PI-3 cinasa* puede desencadenar divisiones celulares y evitar la muerte celular programada (apoptosis), y asegura de este modo la supervivencia celular. En otras células, esta vía induce cambios específicos en el metabolismo celular.

La PI-3 cinasa fue identificada inicialmente en estudios en el virus de polioma, un virus de DNA que transforma ciertas células de mamífero para que crezcan de modo descontrolado. La transformación requiere varias oncoproteínas codificadas por el virus, incluyendo una denominada "T del medio". En un intento para descubrir cómo funciona la proteína T del medio, los investigadores descubrieron una proteincinasa PI-3 en preparados parcialmente purifica-

FIGURA 16-25 Generación de fosfatidilinositol 3-fosfatos. La enzima fosfatidilinositol-3 cinasa (PI-3 cinasa) es reclutada a la membrana por muchos receptores tirosincinasas activados (RTK) y receptores de citocinas. El 3-fosfato añadido por esta enzima, para producir PI 3, 4-bifosfato o PI 3, 4, 5-trifosfato, es un sitio de unión para varias proteínas de transducción de las señales, como el dominio PH de la proteincinasa B. PI 4, 5-bifosfato es también el sustrato para la fosfolipasa C (véase la Fig. 15-35). (Véase L. Rameh y L. Cantley, 1999, *J. Biol. Chem.* **274**:8347.)

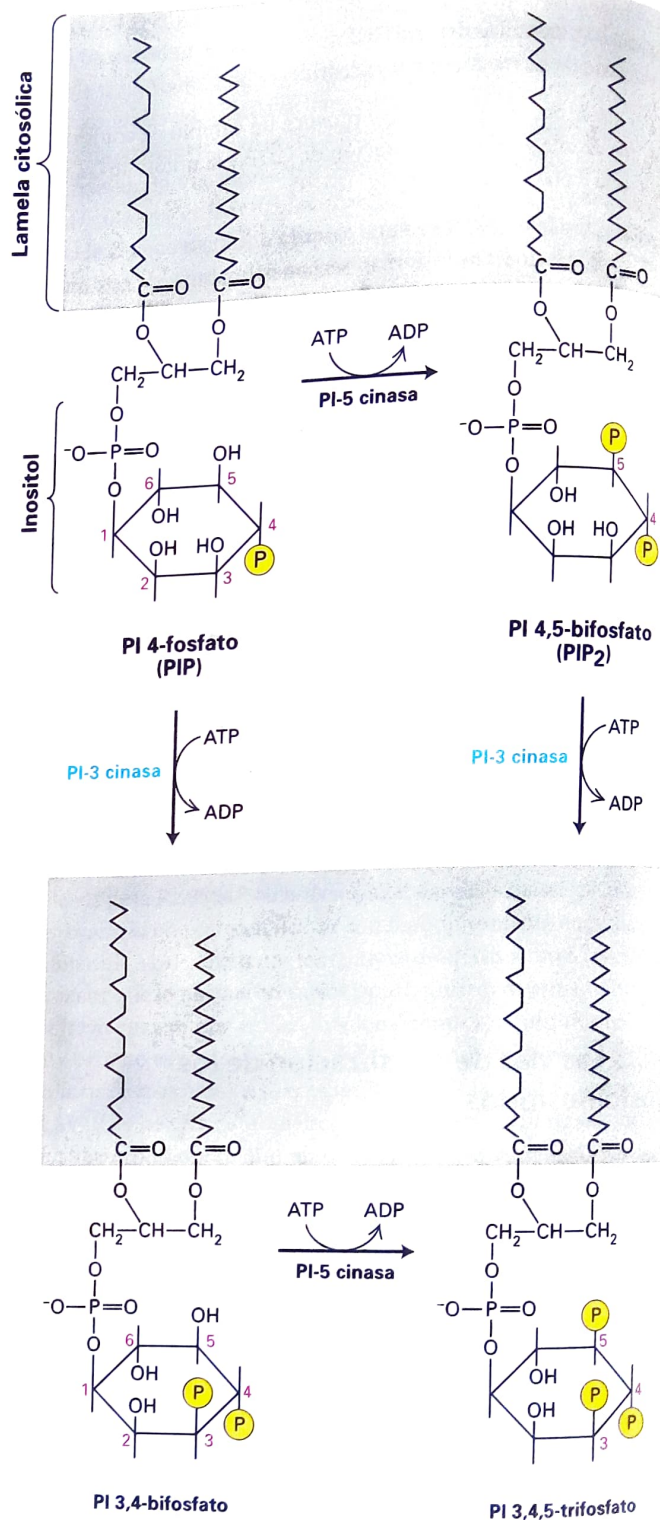
dos de la T del medio, lo que sugiere una interacción específica entre ambas. Luego se propusieron determinar de qué manera la PI-3 cinasa podría afectar el comportamiento celular.

Cuando una versión inactiva, dominante negativa de la PI-3 cinasa se expresaba en las células transformadas por el virus del polio, esta inhibía la proliferación celular descontrolada, característica de las células transformadas por el virus. Este hallazgo sugirió que la cinasa normal es importante en cierta vía de señalización esencial para la proliferación celular o para evitar la apoptosis. Estudios posteriores mostraron que las PI-3 cinasas participan en muchas vías de señalización relacionadas con el crecimiento celular y la apoptosis. De los nueve homólogos de la PI-3 cinasa codificados por el genoma humano, el mejor caracterizado contiene una subunidad p110 con actividad catalítica y una subunidad p85 con un dominio SH2 que une fosfotirosina.

La acumulación de fosfatos PI-3 en la membrana plasmática conduce a la activación de varias cinasas

Muchas proteincinasas se activan al unir fosfatidil inositol 3-fosfatos en la membrana plasmática. A su vez, estas cinasas afectan la actividad de muchas proteínas celulares. Una cinasa importante que se une a los PI-3 fosfatos es la **proteincinasa B (PKB)**, una cinasa serina/treonina que también es denominada **Akt**. Además de su dominio cinasa, la proteincinasa B también contiene un **dominio PH**, un dominio proteico conservado, presente en una amplia variedad de proteínas de señalización que se une con alta afinidad a los 3-fosfatos, tanto del PI 3,4-bifosfato como al PI 3,4,5-trifosfato. Dado que estos inositol fosfatos están presentes en la cara citosólica de la membrana plasmática, la unión recluta la proteína completa hacia la membrana celular. En las células no estimuladas, en reposo, el nivel de estos fosfoinosítidos (conocidos colectivamente como PI 3-fosfatos) es bajo, y la proteincinasa B está presente en el citosol en forma inactiva (Fig. 16-26). Después de la estimulación hormonal y del incremento resultante en los PI 3-fosfatos, la proteincinasa B se acopla a estas moléculas unidas a la membrana vía su dominio PH y se localiza en la membrana plasmática. La unión de la proteincinasa B a los PI 3-fosfatos no solo recluta la enzima a la membrana plasmática, sino que libera la inhibición del sitio catalítico por el dominio PH. Sin embargo, la máxima activación de la proteincinasa B depende del reclutamiento de otras dos cinasas, llamadas PDK1 y PDK2.

La PDK1 es reclutada a la membrana plasmática por la unión de su propio dominio PH a los PI 3-fosfatos. Tanto la proteincinasa B como la PDK1 asociadas a la membrana difunden al azar en el plano de esta, finalmente acercándose lo suficiente, de modo tal que la PDK1 puede fosforilar la proteincinasa B sobre un residuo crítico



de treonina en su labio de activación (otro ejemplo más de la activación de la cinasa por fosforilación). La fosforilación de una segunda serina, no en el segmento del labio, por la PDK2 es necesaria para la actividad máxima de la proteincinasa B (Fig. 16-26). De modo similar a la regulación de la actividad de Raf (véase la Fig. 16-20), la liberación de un dominio inhibitorio y la fosforilación por otras cinasas regulan la actividad de la proteincinasa B.

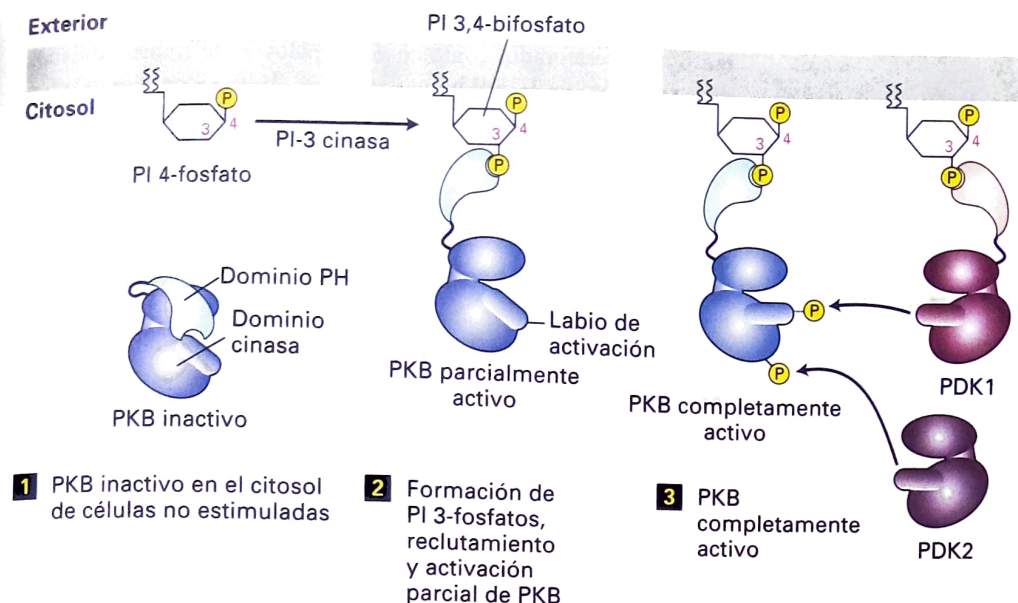


FIGURA 16-26 Reclutamiento y activación de la proteína cinasa B (PKB) en las vías de la PI-3 cinasa. En las células no estimuladas (1), la PKB está en el citosol con su dominio PH unido al dominio catalítico de la cinasa, lo que inhibe su actividad. La estimulación hormonal conduce a la activación de la PI-3 cinasa y la formación posterior de fosfatidilinositol (PI) 3-fosfatos (véase la Fig. 16-25). El grupo 3-fosfato sirve como sitio de anclaje sobre la membrana plasmática para el dominio PH de la PKB (2) y otra cinasa, la PDK1. La activación completa de la PKB requiere la fosforilación tanto en el labio de activación por la PDK1 como en el C-terminal por una segunda cinasa, la PDK2 (3). (Adaptado de A. Toker y A. Newton, 2000, *Cell* 103:185; y S. Sarbassov y cols., 2005, *Curr. Opin. Cell Biol.* 17:596.)

La proteína cinasa B activada induce muchas respuestas celulares

Una vez que se ha activado totalmente, la proteína cinasa B puede dissociarse de la membrana plasmática y fosforilar sus numerosas proteínas diana a través de la célula, lo cual tiene un amplio espectro de efectos sobre la conducta celular. La activación de la PKB toma solo de 5 a 10 minutos, aunque sus efectos pueden durar hasta varias horas.

En muchas células, la proteína cinasa B activada directamente fosforila e inactiva proteínas proapoptóticas como la Bad, un efecto a corto plazo que evita la activación de una vía apoptótica que conduce a la muerte celular (véase la Fig. 21-38). La proteína cinasa B activada promueve también la supervivencia de muchas células cultivadas al fosforilar el factor de transcripción Forkhead FOXO3a en múltiples residuos de serina/treonina, y reduce así su capacidad de inducir la expresión de varios genes proapoptóticos.

En ausencia de factores de crecimiento, FOXO3a está desfosforilado y se localiza principalmente en el núcleo, donde activa la transcripción de varios genes que codifican proteínas proapoptóticas. Cuando los factores de crecimiento se añaden a las células, la proteína cinasa B se activa y fosforila a FOXO3a. Esto permite que la proteína citosólica que se une a fosfoserina, 14-3-3, se una a FOXO3a y, de este modo, la secuestre en el citosol. (Recuerde que 14-3-3 también retiene la proteína Raf fosforilada en un estado inactivo en el citosol; véase la Fig. 16-20). Una mutante de FOXO3a en la cual los tres residuos diana de la serina para la proteína cinasa B están mutados a alaninas es “activa constitutivamente” e inicia la apoptosis aun en presencia de la proteína cinasa B activada. Este hallazgo demuestra la importancia de la FOXO3a y de la proteína cinasa B en el control de la apoptosis de las células en cultivo. La desregulación de la proteína cinasa B está implicada en la patogénia del cáncer y la diabetes, y en la Sección 16.7 veremos de qué manera la proteína cinasa B activada corriente abajo de los RTK de insulina promueve la captación de glucosa y su almacenamiento en el músculo y en el hígado. Éste es otro ejemplo de una vía de señalización que controla diferentes funciones celulares en células distintas.

La vía de la cinasa PI-3 está regulada negativamente por la fosfatasa PTEN

Como casi todos los eventos de señalización intracelulares, la fosforilación por la PI-3 cinasa es reversible. La fosfatasa relevante, llamada *fosfatasa PTEN*, tiene una especificidad inusualmente amplia. Si bien la PTEN puede quitar los grupos fosfato unidos a los residuos de serina, treonina y tirosina de las proteínas, se piensa que su capacidad para quitar el 3-fosfato del PI 3,4,5-trifosfato es su principal función en las células. La sobreexpresión de la PTEN en las células de mamífero en cultivo promueve la apoptosis al reducir el nivel de PI 3,4,5-trifosfato y así la activación y el efecto antiapoptótico de la proteína cinasa B.

El gen *PTEN* está delecionado en múltiples tipos de cánceres humanos avanzados. La pérdida resultante de la proteína PTEN contribuye al crecimiento descontrolado de las células. De hecho, las células que carecen de PTEN tienen niveles elevados de PI 3,4,5-trifosfato y actividad PKB. Dado que la proteína cinasa B ejerce efecto antiapoptótico, la pérdida de PTEN reduce indirectamente la muerte celular programada, que es el destino normal de muchas células. En ciertas células, como las células madre neuronales, la ausencia de PTEN no solo evita la apoptosis, sino que conduce a la estimulación del avance del ciclo celular y a un incremento de la velocidad de la proliferación celular. Los ratones *knockout* que carecen de PTEN tienen grandes cerebros, con un número excesivo de neuronas, lo cual atestigua la importancia de las PTEN en el control del desarrollo normal. ■

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 16.3

Las vías de señalización de los fosfoinosítidos

• Muchos RTK y receptores de citocinas pueden iniciar la vía de señalización IP3/DAG al activar la fosfolipasa C_γ (PLC $_\gamma$), una iso-

forma diferente de PLC que la activada por los receptores acoplados a la proteína G.

- Los RTK activados y los receptores de citocinas también pueden iniciar otra vía de fosfoinosítido al unirse a una PI-3 cinasa, lo que permite así que la enzima acceda a sus sustratos fosfoinosítidos unidos a la membrana, que luego se fosforilan en la posición 3 (PI 3-fosfatos; véase la Fig. 16-26).
- El dominio PH de varias proteínas se une a los PI 3-fosfatos y forma complejos de señalización asociados con la cara citosólica de la membrana plasmática.
- La proteincinasa B (PKB) se activa parcialmente al unirse a los PI 3-fosfatos con su dominio PH. La activación completa de la PKB requiere la fosforilación por otra cinasa, PDK1, que también es reclutada a la membrana mediante la unión de los PI 3-fosfatos y por una segunda cinasa, la PDK2 (véase la Fig. 16-26).
- La proteincinasa B activada promueve la supervivencia de muchas células al fosforilar directamente e inactivar varias proteínas proapoptóticas y fosforilar e inactivar el factor de transcripción FOXO3a, que de otro modo induce la síntesis de proteínas proapoptóticas.
- La señalización por medio de la vía de la PI-3 cinasa es terminada por la fosfatasa PTEN, que hidroliza al 3-fosfato en los PI 3-fosfatos. La pérdida de PTEN, una situación común en los tumores humanos, promueve la supervivencia y proliferación celular.

16.4 Las serina-cinasas receptoras que activan Smad

Hemos visto cuántos receptores activan cinasas que fosforilan proteínas diana en residuos de tirosina y activan un conjunto conservado de vías de transducción de las señales. También hemos visto de qué modo las cinasas citosólicas que fosforilan proteínas diana sobre serina o treonina se activan y funcionan en vías de señalización; estas incluyen los miembros de las familias PKA, PKB, PKC, como también las cinasas MAP. En esta sección, analizamos una familia conservada evolutivamente de serinas cinasas receptoras (la superfamilia de los receptores TGF- β) y la gran familia conservada de moléculas de señalización (la superfamilia TGF- β) que se une a ellas. Estos receptores se fosforilan y así desencadenan la activación de una clase conservada de factores de transcripción (los Smad) que regulan varias vías de crecimiento y diferenciación. En células no estimuladas, los Smad se encuentran en el citosol, pero cuando se activan se mueven al núcleo para regular la transcripción. La vía TGF- β tiene efectos muy diversos en diferentes tipos de células porque distintos miembros de la superfamilia TGF- β activan diversos miembros de la familia de receptores TGF- β , que activan diferentes miembros de la clase Smad de factores de transcripción. Además, como hemos visto con otros factores de transcripción activados por receptores, como los STAT, la misma proteína Smad activada se unirá con diferentes factores de transcripción en distintos tipos celulares y así activará diferentes conjuntos de genes en estas células. La superfamilia del **factor de crecimiento transformante β (TGF- β)** incluye un número de moléculas de señalización extracelular vincula-

das que desempeñan papeles extensos en la regulación del desarrollo, tanto en invertebrados como en vertebrados. El miembro fundador de la superfamilia TGF- β humana, el TGF- β 1, fue identificado sobre la base de su capacidad para inducir un fenotipo maligno en varias líneas celulares cancerosas de mamífero, de etapa inicial, en cultivo (“factor de crecimiento transformante”); en este caso, el TGF- β 1 promovió metástasis, la diseminación e invasión de tumores primarios, que se analizará en el **Capítulo 24**. Sin embargo, la principal función de las tres isoformas de TGF- β , TGF- β 1, 2, 3 en la mayoría de las células de mamífero normales (no cancerosas) es prevenir fuertemente su proliferación al inducir la síntesis de proteínas que inhiben el ciclo celular. El TGF- β se produce en muchas células del organismo e inhibe el crecimiento tanto de las células secretoras (señalización autocrina) como de las células vecinas (señalización paracrina). La pérdida de los receptores TGF- β o de cualquier proteína de transducción de la señal intracelular en la vía TGF- β libera células de la inhibición del crecimiento y ocurre con frecuencia en el desarrollo temprano de los tumores humanos. Las proteínas TGF- β también promueven la expresión de moléculas de adhesión celular y moléculas de la matriz extracelular, que desempeñan papeles importantes en la organización de los tejidos (véase el **Cap. 20**). Un homólogo del TGF- β en la *Drosophila*, llamada proteína Dpp, participa en el patrón dorsal-ventral en los embriones de la mosca. Otros miembros mamíferos de la superfamilia TGF- β , las activinas y las inhibinas, afectan el desarrollo temprano del aparato genital.

Otro miembro de esta superfamilia, la **proteína morfogénica del hueso (BMP)**, fue inicialmente identificada por su capacidad para inducir la formación de hueso en células en cultivo. Llamada en la actualidad BMP7, se usa en la práctica clínica para fortalecer los huesos después de las fracturas graves. De las numerosas proteínas BMP reconocidas posteriormente, muchas inducen pasos clave en el desarrollo, que incluyen la formación del mesodermo y las primeras células formadoras de sangre. La mayoría no tienen relación alguna con los huesos.

Gran parte de los tipos celulares animales producen y secretan miembros de la superfamilia TGF- β en una forma inactiva que se almacena casi unida a moléculas de la superficie celular especializadas o en la matriz extracelular. La liberación de la forma activa desde la matriz por digestión de proteasas o inactivación de un inhibidor conduce a la rápida activación de las moléculas de señalización ya en el lugar (un rasgo importante de muchas vías de señalización). La forma monomérica de los factores de crecimiento TGF- β contiene tres enlaces disulfuro intramoleculares conservados. Una cisteína adicional en el centro de cada monómero vincula los monómeros de TGF- β a homodímeros y a heterodímeros funcionales (Fig. 16-27).

Tres proteínas receptoras separadas TGF- β participan en la unión de la TGF- β y activan la transducción de la señal

Los investigadores identificaron rápidamente la TGF- β 1 como un factor inhibidor clave del crecimiento, pero para comprender la forma en que operaba, debieron encontrar los receptores a los cuales se unía. La lógica de cómo realizaron su búsqueda es representativa de los enfoques bioquímicos típicos empleados para identificar los receptores (véase la **Sección 15.2**). Primero, los investigadores hicieron reaccionar el factor de crecimiento purificado con el radioisótopo yodo-125 (¹²⁵I)

TGF- β dimérico, maduro

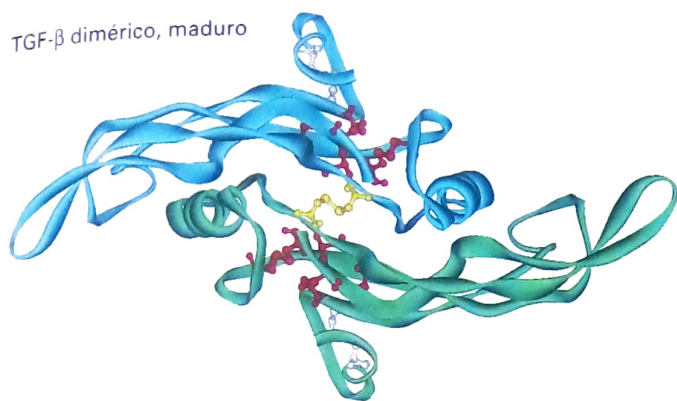


FIGURA 16-27 Estructura de la superfamilia TGF- β de moléculas de señalización. En este diagrama de cintas del dímero TGF- β maduro, las dos subunidades aparecen en verde y azul. Los residuos de cisteína ligados por disulfuros (amarillo y rojo) se muestran en formas de esferas y palillos. Los tres enlaces intracatenarios disulfuro (rojo) de cada monómero forman un dominio de cistina-nudo, que es resistente a la degradación. (Tomado de S. Daopin y cols., 1992, *Science* 257:369)

en condiciones tales que el yodo formara enlaces covalentes con los residuos de tirosina expuestos (marcándolos efectivamente con una etiqueta radiactiva). La proteína ^{125}I -TGF- β se incubó con células en cultivo, y la mezcla de incubación luego se trató con un agente químico que hacía enlaces cruzados covalentes entre el TGF- β y sus receptores de la superficie celular. La purificación de los complejos ^{125}I marcado TGF- β -receptor reveló tres polipéptidos distintos con pesos moleculares de 55, 85 y 280 kDa, denominados receptores TGF- β tipos RI, RII y RIII, respectivamente.

La Figura 16-28 (pasos 1 y 2) muestra la relación y función de las tres proteínas receptoras TGF- β . La más abundante, RIII, también llamada β -glucano, es un **proteoglucano** de la superficie celular. Un proteoglucano consiste en una proteína unida a cadenas de **glucosaminoglucano (GAG)** tales como el sulfato de heparina y el condroitina sulfato (véase la Fig. 20-31). La RIII, una proteína transmembrana, se une a las moléculas de TGF- β madura y las concentra cerca de la superficie celular, lo que facilita su unión a los receptores RII. Los receptores tipo I y tipo II son proteínas transmembrana dimericas con serina/treonina cinasas como parte de sus dominios citosólicos. La RII exhibe actividad de cinasa *constitutiva*; es decir, es activa aun cuando no esté unida a TGF- β . La unión a TGF- β induce la formación de complejos que contienen dos copias cada uno de RI y RII, otro ejemplo de oligomerización inducida por el ligando de los receptores de la superficie celular. Luego, una subunidad RII fosforila los residuos de serina y treonina en una secuencia muy conservada de la subunidad RI adyacente a la cara citosólica de la membrana plasmática, lo cual pone en funcionamiento la actividad de la cinasa RI.

Los receptores TGF- β activados fosforilan los factores de transcripción Smad

Los investigadores identificaron factores de transcripción corriente abajo desde los receptores TGF- β a partir de estudios de mutantes de

Drosophila. Estos factores de transcripción de la *Drosophila* y las proteínas relacionadas en los vertebrados se denominan ahora **Smad**. Tres tipos de proteínas Smad funcionan en la vía de señalización TGF- β : las *R-Smad* (Smad reguladas por receptor; Smad 2 y 3), las *co-Smad* (Smad4) y las *I-Smad* (Smad inhibidoras).

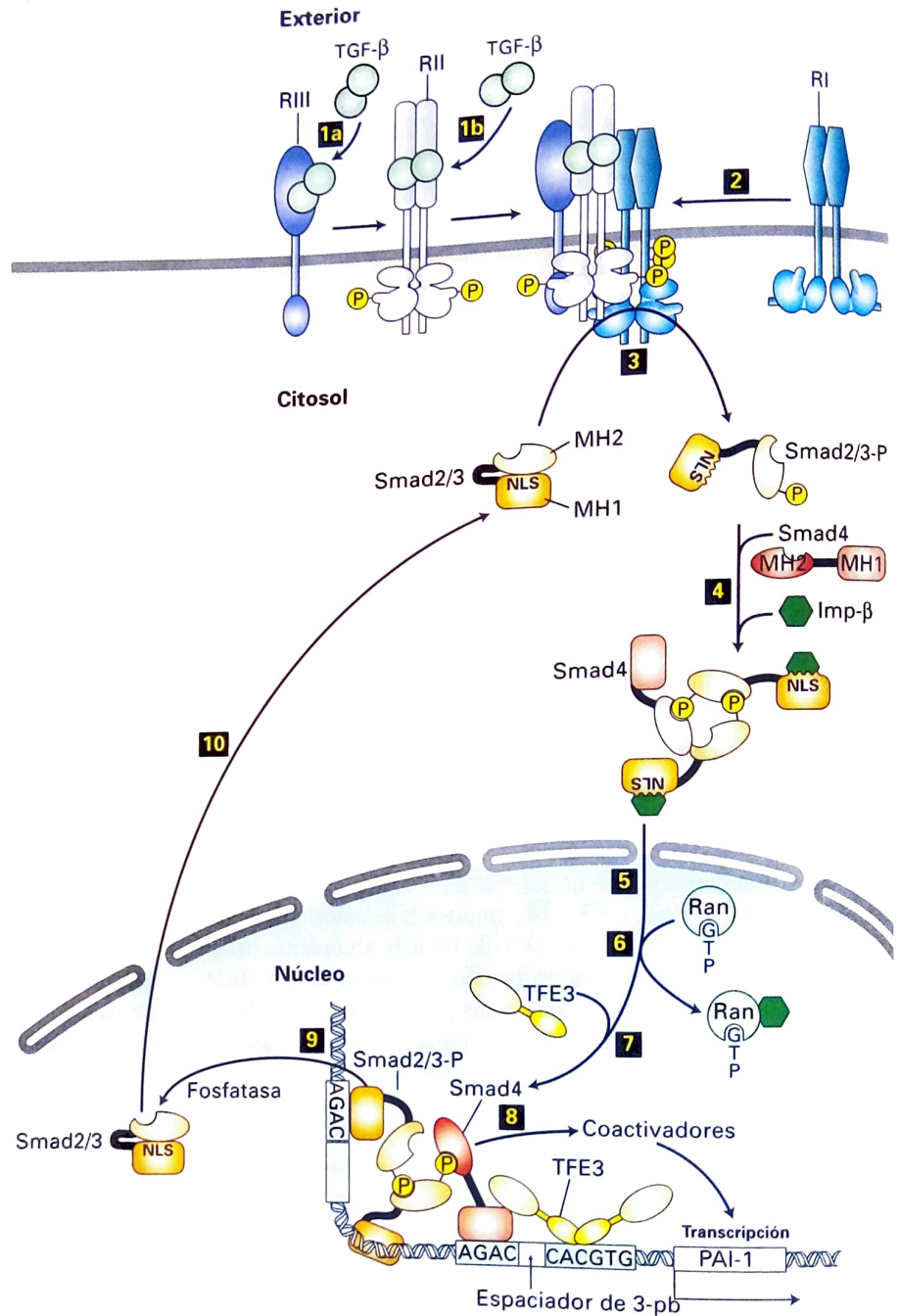
Como se ilustró en la Figura 16-28, una R-Smad (Smad2 o Smad3) contiene dos dominios, llamados MH1 y MH2, separados por una región vinculante flexible. El dominio N-terminal MH1 contiene un segmento específico de unión al DNA y también un dominio llamado la *señal de localización nuclear (SLN)*. Los dominios SLN están presentes en virtualmente todos los factores de transcripción que se encuentran en el citosol y son necesarios para su transporte al núcleo (véase el Cap. 13). Sin embargo, cuando los R-Smad se encuentran en su estado inactivo no fosforilado, el dominio SLN está enmascarado y los dominios MH1 y MH2 se asocian de modo tal que no pueden unirse al DNA o a una co-Smad. La fosforilación de tres residuos de serina cerca del extremo C-terminal de un R-Smad por receptores activados tipo I TGF- β separa los dominios, lo que permite la unión de una importina (véase la Fig. 13-36) al SLN, lo cual posibilita el ingreso del Smad al núcleo.

Simultáneamente, dos de las serinas fosforiladas de cada Smad3 que fueron añadidas por el receptor cinasa RI se unen a los sitios de unión de fosfoserina de los dominios MH2 en un Smad3 y un Smad4, y forman un complejo estable que contiene dos moléculas de Smad3 (o Smad2) y una molécula de un co-Smad (Smad4). La importina unida entonces media la translocación del complejo heterodimérico R-Smad/co-Smad al núcleo. Después de que la importina se disocia dentro del núcleo, el complejo Smad3/Smad4 (o Smad2/Smad4) se une a otros factores de transcripción para activar la transcripción de genes diana específicos.

Dentro del núcleo, los R-Smad están siendo desfosforilados continuamente por una fosfatasa nuclear, lo cual resulta en la disociación del complejo R-Smad/co-Smad y la exportación de estos Smad desde el núcleo. Dado este transporte nucleocitoplasmático continuo de Smad, la concentración de los Smad activos dentro del núcleo refleja aproximadamente los niveles de los receptores TGF- β activados de la superficie celular.

Virtualmente, todas las células de mamífero secretan al menos una isoforma de TGF- β , y la mayoría tiene receptores de TGF- β sobre su superficie. Sin embargo, dado que diferentes tipos de células contienen distintos conjuntos de factores de transcripción a los cuales pueden unirse los Smad activados, las respuestas celulares inducidas por los TGF- β varían entre los tipos celulares. Por ejemplo, en las células epiteliales y los fibroblastos, los TGF- β inducen la expresión de proteínas de la matriz extracelular (p. ej., fibronectinas y colágenos; véase el Cap. 20) y proteínas que inhiben las proteasas séricas, que de otro modo degradarían estas proteínas de la matriz extracelular. Esta inhibición estabiliza la matriz y permite que las células formen tejidos estables. Las proteínas inhibidoras incluyen el inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1). La transcripción de gen *PAI-1* requiere la formación de un complejo del factor de transcripción TFE3 con el complejo R-Smad/co-Smad (Smad3/Smad4) y la unión de todas estas proteínas a secuencias específicas dentro de la región reguladora del gen *PAI-1* (Fig. 16-28, abajo). Al asociarse con otros factores de transcripción, un complejo R-Smad/co-Smad promueve la expresión de genes que codifican otras proteínas como p15, que detiene el ciclo celular en la etapa G₁ y así bloquea la proliferación (véase el Cap. 19).

FIGURA 16-28 Vía de señalización de TGF- β /Smad. Paso **1a**: en algunas células, el TGF- β se une al receptor TGF- β tipo III (de RII), que incrementa la concentración de TGF- β cerca de la superficie celular y también presenta TGF- β al receptor tipo II (RII). Paso **1b**: en otras células, el TGF- β se une directamente a RII, una cinasa constitutivamente fosforilada y activa. Paso **2**: el RII unido al ligando recluta y fosforila el segmento yuxtamembrana del receptor tipo I (RI), que no se une en forma directa al TGF- β . Este libera la inhibición de la actividad cinasa RI, que de otro modo es impuesta por el segmento de RI entre la membrana y su dominio de cinasa. Paso **3**: el RI activado entonces fosforila Smad2 o Smad3 (que se muestra aquí como Smad2/3), lo cual provoca un cambio de conformación que desenmascara su señal de localización nuclear (SLN). Paso **4**: dos moléculas fosforiladas de Smad2/3 se unen a una molécula de co-Smad (Smad4), que no está fosforilada, y con una importina, y así forman un complejo citosólico grande. Pasos **5** y **6**: después de que todo el complejo se transloca al núcleo, el Ran-GTP provoca la disociación de la importina, como se analizó en el Capítulo 13. Paso **7**: un factor de transcripción nuclear (p. ej., TFE3) se asocia entonces con el complejo Smad2/3/Smad4 y forma un complejo de activación que une en forma cooperativa en una geometría precisa a una secuencia reguladora de un gen diana. Paso **8**: este complejo recluta entonces coactivadores de la transcripción e induce la transcripción de los genes (véase el Cap. 7). Paso **9**: Smad2/3 se desfosforila por una fosfatasa nuclear (paso **9**) y se recicla a través de un poro nuclear al citosol (paso **10**), donde puede ser reactivado por otro complejo receptor TGF- β . Se muestra en la parte inferior el complejo de activación para el gen que codifica el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) y complejos de transcripción similares activan la expresión de genes que codifican otras proteínas de la matriz extracelular, como la fibronectina. (Véase A. Moustakas y C. H. Heldin, 2009, *Development* 136:3699; y D. Clarke y X. Liu, 2008, *Trends Cell Biol.* 18:430)



Las proteínas BMP, que también pertenecen a la superfamilia TGF- β , se unen a un conjunto diferente de receptores que son similares a las proteínas TGF- β , RI y RII y los activan, pero fosforilan otras R-Smad. Dos de estas Smad fosforiladas forman un complejo trimérico con Smad4, y este complejo Smad activa diferentes respuestas de transcripción que aquellas inducidas por el receptor TGF- β .

La pérdida de la señalización por TGF- β desempeña un papel clave en el desarrollo temprano de muchos cánceres. Diversos tumores humanos contienen una mutación inactivadora, ya sea en los receptores TGF- β o en las proteínas Smad, y así son resistentes a la inhibición del crecimiento por TGF- β (véase la Fig. 24-24). Por ejemplo, la mayoría de los cánceres humanos de páncreas contienen una delec-

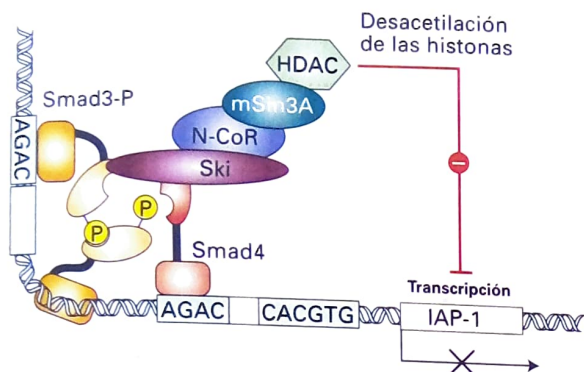


FIGURA 16-29 Modelo de regulación en menos de la función activadora de la transcripción de Smad mediada por Ski. Ski reprime la función de Smad al unirse directamente a Smad4. Dado que el dominio de unión a Ski en Smad4 se superpone de modo significativo con el dominio MH2 de Smad4 necesario para la unión de la cola fosforilada de Smad3, la unión de Ski interrumpe las interacciones normales entre Smad3 y Smad4 necesarias para la activación de la transcripción. Además, Ski recluta la proteína N-CoR, que se une directamente a mSin3A; a su vez, mSin3A interactúa con la desacetilasa de las histonas (HDAC), una enzima que promueve la desacetilación de las histonas o sus promotores cercanos, lo que reprime la expresión génica (véase el Cap. 7). Como resultado de ambos procesos, la activación de la transcripción inducida por TGF- β y mediada por los complejos Smad se apaga. La proteína SnoN relacionada funciona de modo similar a Ski reprimiendo la señalización por TGF- β . (Véase J. Deheunick y K. Luo, 2009, *Cell Res.* 19:47.)

ion en el gen que codifica Smad4 y, de este modo, no pueden inducir los inhibidores del ciclo celular en respuesta a TGF- β . De hecho, en un principio Smad4 fue llamada *DPC* (por su nombre en inglés *deleted in pancreatic cancer*, o su traducción: “delecionada en el cáncer pancreático”). El retinoblastoma, el cáncer de colon y gástrico, el hepatoma y algunos tumores malignos de células T y B tampoco responden a la inhibición del crecimiento por TGF- β . Esta falta de respuesta se correlaciona con la pérdida de los receptores TGF- β tipo I o tipo II a TGF- β ; la respuesta a TGF- β puede ser restablecida por la expresión recombinante de la proteína “perdida”. Por lo general, las mutaciones en Smad2 también ocurren en varios tipos de tumores humanos. ■

Los bucles de retroalimentación negativa regulan la señalización TGF- β /Smad

En la mayoría de las vías de señalización, la respuesta a un factor de crecimiento u otra molécula de señalización disminuye con el tiempo (desensibilización). Esta respuesta es adaptativa, y evita la sobreexposición y hace posible un control de regulación fina de las respuestas celulares. Varias proteínas intracelulares reprimen las vías TGF- β /Smad, incluidas dos proteínas citosólicas llamadas *SnoN* y *Ski* (*Ski* es el acrónimo que proviene de “Sloan-Kettering Cancer Institute”). Estas proteínas fueron identificadas originalmente como **oncoproteínas**, que causan cáncer dado que la expresión de Ski o de SnoN está elevada en muchos cánceres, incluidos los melanomas y ciertos cánceres de mama. Cuando se encuentran sobreexpresadas en fibroblastos en cultivo primario, Ski o SnoN provocan una proliferación anormal de células, y la represión de Ski en los cánceres de páncreas reduce el crecimiento tumoral. Hasta años después no se comprendió el modo en que SnoN y Ski desencadenan la proliferación anormal de las células, cuando se

encontró que se unían a la co-Smad (Smad4) y que fosforilaban a las R-Smad (Smad3) después de ser estimuladas por TGF- β . SnoN y Ski no evitan la formación del complejo R-Smad/co-Smad ni afectan la capacidad de un complejo Smad de unirse a las regiones de control del DNA. En realidad, bloquean la activación de la transcripción al unirse a un complejo Smad, en parte induciendo la desacetilación de las histonas en segmentos de cromatina adyacentes. Esto vuelve a las células resistentes a los efectos inhibidores del crecimiento del TGF- β (Fig. 16-29). Resulta interesante que la estimulación por TGF- β provoque la rápida degradación de Ski y SnoN, pero después de unas pocas horas la expresión de SnoN se induce fuertemente por la unión del complejo Smad2/Smad4 al promotor del gen de SnoN. Se piensa que los niveles aumentados de estas proteínas disminuyen los efectos de señalización a largo plazo debido a la exposición continua al TGF- β . Este es otro ejemplo de retroalimentación negativa en el que un gen inducido por la señalización de TGF- β , en este caso SnoN, inhibe la señalización adicional por TGF- β .

Entre las otras proteínas inducidas después de la estimulación de TGF- β , se encuentran las I-Smad, en especial Smad7, la cual bloquea la capacidad de los receptores activados tipo I (RI) de fosforilar las proteínas R-Smad y también puede marcar los receptores TGF- β para su degradación. De este modo Smad7, al igual que Ski y SnoN, participa en un bucle de retroalimentación negativa: su inducción inhibe la señalización intracelular por la exposición prolongada a la hormona estimulante.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 16.4

Las serina-cinasas receptoras que activan Smad

- La superfamilia del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) incluye un número de moléculas de señalización extracelular relacionadas que desempeñan papeles extendidos en la regulación del desarrollo.
- Los monómeros TGF- β se almacenan en una forma inactiva en la superficie celular o en la matriz extracelular; la liberación de los monómeros activos (p. ej., por la digestión mediante proteasas) conduce a la formación de homodímeros y heterodímeros funcionales.
- Los receptores TGF- β consisten en tres tipos (RI, RII, RIII). La unión de los miembros de la superfamilia TGF- β al receptor RII cinasa permite que RII fosforile el dominio citosólico del receptor RI y active su capacidad intrínseca de cinasa de serina/treonina. RI fosforila entonces a un R-Smad, lo que expone una señal de localización nuclear (véase la Fig. 16-28).
- Después de que los R-Smad fosforilados se unen a un co-Smad, el complejo resultante se transloca al núcleo, donde interactúa con varios factores de transcripción para inducir la expresión de los genes diana (véase la Fig. 16-28).
- Las oncoproteínas (p. ej., Ski y SnoN) y las I-Smad (p. ej., Smad7) actúan como reguladores negativos de la señalización por TGF- β (Fig. 16-29) al inhibir la transcripción mediada por el complejo Smad2/3/Smad4.
- Por lo general, la señalización por TGF- β inhibe la proliferación celular. La pérdida de varios componentes de la vía de señalización contribuye a la proliferación celular anormal y la malignidad.

16.5 Vías de señalización controladas por ubiquitinación: Wnt, Hedgehog y NF- κ B

Todas las vías de señalización analizadas hasta el momento son reversibles y, por lo tanto, pueden ser apagadas con relativa rapidez si la señal extracelular es eliminada. En esta sección, analizamos varias vías irreversibles o solo lentamente reversibles en las cuales un componente crítico (ya sea un factor de transcripción o un inhibidor de un factor de transcripción) se ubiquitina y luego se escinde por proteólisis. En primer lugar, analizamos la señalización por los **Wnt** y **Hedgehog**, dos familias evolutivamente conservadas de proteínas de señalización que desempeñan papeles centrales en muchas vías de desarrollo y, con frecuencia, inducen la expresión de genes necesarios para que una célula adquiera una nueva identidad o destino. Si bien las vías de señalización Wnt y Hedgehog emplean diferentes conjuntos de receptores y proteínas de señalización, comparten similitudes, razón por la cual las agrupamos:

- Wnt y Hedgehog se unen a receptores que son similares en su estructura a siete receptores acoplados a la proteína G que se expanden pero no activan las proteínas G.
- En el estado de reposo, los factores de transcripción clave de ambas vías se ubiquitinan y son marcados para la escisión proteolítica, lo cual los torna inactivos.
- La activación de cada vía implica el desensamblaje de complejos proteicos citosólicos grandes, la inhibición de la ubiquitinación y la liberación del factor de transcripción activo.
- Las cinasas que incluyen la cinasa 3 de la sintasa de glucógeno (GSK3) desempeñan papeles centrales en ambas vías de señalización.

Examinamos luego la *vía de NF- κ B*, una tercera vía de señalización controlada por la ubiquitinación. En este caso, un inhibidor de un factor de transcripción, más que el propio factor de transcripción, es desactivado por la ubiquitinación. En el estado de reposo, un factor de transcripción clave, llamado **NF- κ B**, es secuestrado en el citosol unido a un inhibidor. Varias condiciones que inducen estrés provocan la ubiquitinación y la degradación inmediata del inhibidor, lo que permite que las células respondan de inmediato y vigorosamente activando la transcripción génica. Al aprender el modo en que la vía NF- κ B es activada por una clase de receptores de superficie, vemos también una función muy distinta de la poliubiquitinación: la formación de una plataforma para ensamblar un complejo de transducción de la señal clave.

La señalización Wnt desencadena la liberación de un factor de transcripción desde un complejo proteico citosólico

Los componentes de las vías de señalización Wnt y Hedgehog fueron dilucidados principalmente mediante análisis genético de las mutantes de desarrollo en la *Drosophila*, pero también son operativos en los seres humanos. Se piensa que las mutaciones en estas vías desencadenan varios tipos de cánceres humanos. De hecho, el primer gen *Wnt* de vertebrados descubierto, el gen *Wnt-1* de ratón, fue noticia porque se encontraba sobreexpresado en ciertos cánceres de mama. Los trabajos

posteriores mostraron que esta sobreexpresión era provocada por la inserción del genoma del virus del tumor mamario de ratón (MMTV) cerca del gen *Wnt-1*. Por lo tanto, el gen *Wnt-1* es un **protooncogén**, un gen celular normal cuya expresión inadecuada promueve el inicio del cáncer (véase el **Cap. 24**). La palabra *Wnt* es la amalgama de *sin alas* (en el inglés, *wingless*), el gen correspondiente en la mosca, con *int* por el sitio de integración del retrovirus en los ratones.

La activación de la *vía Wnt* controla numerosos eventos críticos del desarrollo, como el desarrollo del cerebro, el patrón de los miembros y la organogénesis. Un papel central de la señalización de Wnt en la formación de los huesos fue revelado por el hallazgo de que las mutaciones inactivadoras de la vía de los componentes Wnt afecta la densidad ósea de los seres humanos. Se sabe ahora que la señalización de Wnt controla la formación de los osteoblastos (células formadoras de hueso). Adicionalmente, las señales Wnt son importantes para controlar las células madre (véase el **Cap. 21**) y en muchos otros aspectos del desarrollo.

Debido a la conservación de la vía de señalización Wnt en la evolución de los metazoos, los estudios genéticos en *Drosophila* y *C. elegans*, estudios de los protooncogenes de ratón y los genes supresores de tumores y los estudios de los componentes de la unión celular han contribuido, en conjunto, a identificar varios componentes de la vía. Las proteínas Wnt son secretadas al medio extracelular por moléculas de señalización, que son modificadas por la adición de un grupo palmitato cerca de su extremo N-terminal. Se cree que este grupo hidrofóbico une las proteínas Wnt a la membrana plasmática de las células que secretan esta proteína y limitan así su espectro de acción a las células adyacentes. Las proteínas Wnt actúan a través de dos proteínas receptoras de la superficie celular: *Frizzled* (*Fz*), que contiene siete hélices α que atraviesan la membrana y se une directamente a Wnt, y un correceptor designado *LRP*, que parece asociarse a *Frizzled* en una forma dependiente de la señal Wnt (véase la **Fig. 20-30**). Las mutaciones en los genes que codifican para las proteínas Wnt, *Frizzled* o *LRP* (llamada *Arrow* en *Drosophila*) tienen, todas, efectos similares en el desarrollo de los embriones.

De acuerdo con un modelo actual de la *vía Wnt*, el jugador central en la transducción de la señal intracelular Wnt es llamado β -catenina en los vertebrados y Armadillo en la *Drosophila*. Esta proteína con múltiples talentos funciona tanto como activador de la transcripción como proteína de unión entre el citoesqueleto y la membrana (véase la **Fig. 20-13**). En ausencia de una señal Wnt, la β -catenina que no está unida a las moléculas de adhesión celular de las membranas o del citoesqueleto lo está a un complejo basado en la proteína plataforma Axina y contiene la proteína poliposis coli adenomatosa (*APC*), llamada así porque su pérdida puede dar como resultado cáncer colorrectal. En el estado de reposo, dos cinasas del complejo, la caseinasa 1 (*CK1*) y la *GSK3*, fosforilan de modo secuencial la β -catenina en múltiples residuos de serina y treonina. Algunos de estos residuos fosforilados sirven como sitios de unión para la proteína ubiquitinadamente es degradada por el proteasoma 26S (**Fig. 16-30a**; para más acerca de la ubiquitinación, véanse las **Figs. 3-29 y 3-34**).

La vía completa por la cual la señalización de Wnt bloquea la degradación de la β -catenina aún no se ha identificado. Sin embargo, sabemos que la unión de Wnt tanto a *Fz* como a *LRP* conduce a la fosforilación del dominio citosólico de *LRP*, probablemente a través de la *GSK3* o de la *CK1* libres. Esto permite que la Axina se una al do-

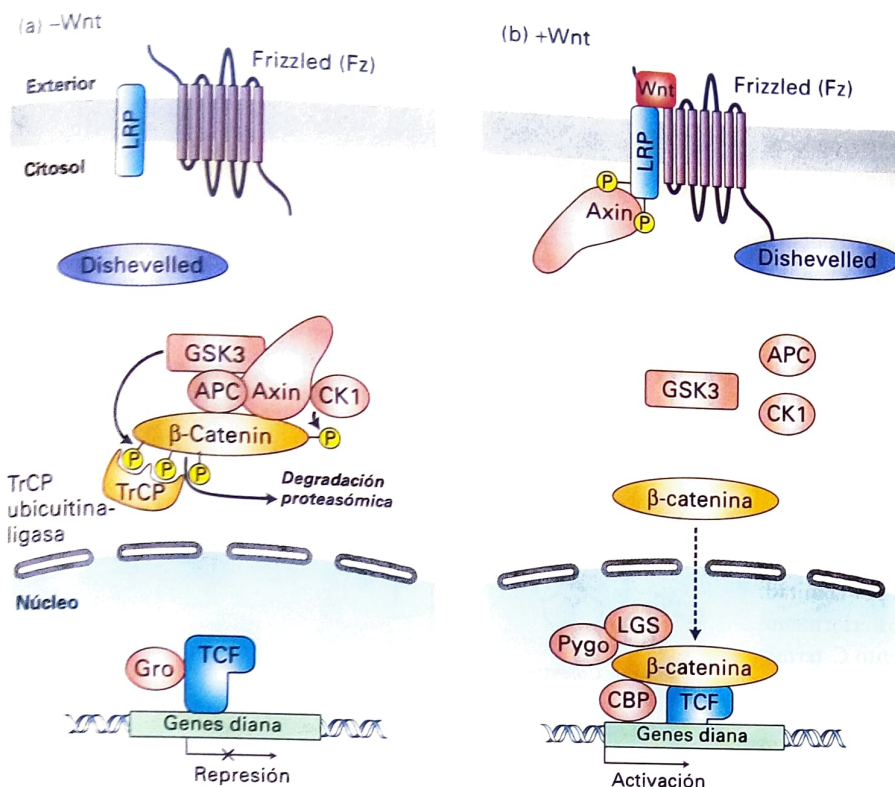


FIGURA 16-30 Vía de señalización Wnt. (a) En ausencia de Wnt, el factor de transcripción TCF se une a los promotores o moderadores de los genes diana, pero su asociación con los represores de la transcripción, como Groucho (Gro), inhibe la activación génica. La β -catenina se encuentra en un complejo con la Axina (una proteína andamio), el CPA y las cinasas CK1 y GSK3, que secuencialmente fosforilan la β -catenina. La formación mediada por Axina de este complejo facilita la fosforilación de la β -catenina por la GSK3 en un factor estimado de 20 000. La ubiquitina ligasa E3 TrCP luego se une a dos de estos residuos fosforilados de la β -catenina, lo que lleva a la ubiquitinación de esta y a su degradación en los proteasomas. (b) La unión de Wnt a su receptor Frizzled (Fz) y al correceptor LRP desencadena la fosforilación del LRP por GSK3 y otra cinasa, y permite la unión ulterior de la Axina. Esto rompe el complejo Axina-CPA-CK1-GSK3- β -catenina, y evita la fosforilación de la β -catenina por CK1 y la GSK3 y lleva a la acumulación de la β -catenina en la célula. Después de la translocación al núcleo, la β -catenina se une a TCF para desplazar el represor Gro y recluta Pygo, LGS y otras proteínas para activar la expresión génica. (Tomado de R. van Amerongen y R. Nusse, 2009, *Development* 136:3205; F. Staal y J. Sen, 2008, *Eur. J. Immunol.* 38:1788; y E. Verheyen y C. Gottardi, 2010, *Dev. Dyn.* 239:34. Véase también la página web de Wnt: www.stanford.edu/nusselab/cgi-bin/wnt/.)

minio citosólico del correceptor de LRP. Este cambio en la localización de la Axina interrumpe las interacciones que estabilizan el complejo citosólico que contiene Axina, GSK3, CK1 y β -catenina y así evita la fosforilación de esta última por CK1 y GSK3. A su vez, esto evita la ubiquitinación y la degradación posterior de la β -catenina y la estabiliza en el citosol (Fig. 16-30b). Dicho proceso requiere de la proteína Dishevelled (Dsh), que se une al dominio citosólico del receptor Frizzled. La β -catenina liberada se transloca al núcleo, donde se asocia con un factor de transcripción (TCF) y funciona como un coactivador para inducir la expresión de genes diana particulares que, con frecuencia, incluyen a los que promueven la proliferación celular. (Recuerde que TCF también funciona en la vía de la cinasa MAP; véase la Fig. 16-22).

La activación inapropiada de la vía Wnt es característica de muchos cánceres humanos. En diversos tumores, el nivel de β -catenina libre es anormalmente elevado, y esta observación proveyó una de las primeras pistas de que la β -catenina puede activar muchos genes promotores del crecimiento. Las mutaciones inactivadoras en los genes que codifican APC y Axina se encuentran en múltiples tipos de cánceres humanos, al igual que las mutaciones en los sitios de fosforilación de la β -catenina para GSK3 o CK1; estas mutaciones reducen la formación del complejo citosólico (Fig. 16-30a), reducen la degradación de β -catenina y permiten que esta active la expresión génica en ausencia de la señal Wnt normal.

Entre los genes diana de Wnt se encuentran muchos que controlan también la señalización por Wnt, lo cual indica un alto grado de regulación por retroalimentación. La importancia de la estabilidad de la β -catenina y su localización significa que las señales Wnt afectan un equilibrio crítico entre los tres depósitos de β -catenina de la célula: la interfase membrana-citoesqueleto, el citosol y el núcleo.

Para señalizar, la Wnt también debe unirse a los proteoglicanos de la superficie celular. La evidencia sobre la participación de los proteoglicanos en la señalización por Wnt proviene de las mutantes *Drosophila sugarless (sgl)*, que carecen de una enzima clave necesaria para sintetizar los GAG heparina y condroitina sulfato. Estas mutantes tienen niveles muy deprimidos de Wingless (la proteína Wnt de la mosca) y exhiben otros fenotipos asociados con defectos en la señalización Wnt. Se desconoce el modo en que los proteoglicanos facilitan la señalización por Wnt, pero quizás la unión de estas cadenas de glucosaminoglicanos específicas sea necesaria para que se una a su receptor Fz o al correceptor LRP. Este mecanismo sería análogo a la unión del factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF) al heparán sulfato, que incrementa la unión del FGF a su tirosinasa receptor (véase la Fig. 16-5).

La señalización Hedgehog alivia la represión de los genes diana

La vía *Hedgehog (Hh)* es similar a la Wnt por el hecho de que dos proteínas de membrana, una con siete segmentos que se expanden en la membrana, son necesarias para recibir y transducir una señal. La vía Hh también involucra el desensamblaje de un complejo intracelular que contiene un factor de transcripción, al igual que la vía Wnt. A diferencia de la Wnt, la proteína Hh sufre un procesamiento postraduccional característico, que se describe más abajo. La señalización Hh también difiere de la señalización de Wnt porque sus dos receptores de membrana se mueven entre la membrana plasmática y las vesículas intracelulares y, en los mamíferos, la señalización Hh está restringida al cilio primario que sobresale desde la superficie celular.

Si bien la Hedgehog es una proteína secretada, se mueve solamente una corta distancia desde una célula de señalización del orden de 1 a 20 células y es unida por receptores de las células que la reciben. Así, las señales Hh, al igual que las Wnt, tienen efectos bastante localizados. A medida que la Hh difunde aumentando la distancia de las células que la secretan, su concentración disminuye y diferentes concentraciones de Hh inducen distintos destinos en las células diana: las que reciben una gran cantidad de Hh encienden ciertos genes y forman ciertas estructuras; las que reciben una cantidad más pequeña encienden genes distintos y así forman estructuras diferentes. Las señales que inducen diferentes destinos celulares dependiendo de su concentración en las células efectoras se conocen como **morfógenos**. Durante el desarrollo, la producción de Hedgehog y otros morfógenos está estrechamente regulada en tiempo y espacio.

Procesamiento de la proteína precursora Hh La Hedgehog se forma a partir de una proteína precursora con una actividad autoproteolítica que permite que la proteína se corte a sí misma por la mitad. La escisión produce un fragmento N-terminal, que posteriormente se secreta para señalizar para otras células, y un fragmento C-terminal, que se degrada. Como se muestra en la **Figura 16-31**, la escisión del precursor está acompañada por la adición covalente del lípido colesterol al nuevo carboxi terminal del fragmento N-terminal. El dominio C-terminal del precursor, que cataliza estas reacciones, se encuentra en otras proteínas y puede promover mecanismos autoproteolíticos similares.

Una segunda modificación a la Hedgehog, la adición de un grupo palmitoilo al N-terminal, torna a la proteína aún más hidrofóbica. En conjunto, los dos grupos hidrofóbicos unidos pueden hacer que la Hedgehog secretada es una de forma no específica y reversible a las membranas plasmáticas y limitan y cambian su difusión y su acción en los tejidos. La restricción espacial desempeña un papel crucial en la restricción de los efectos de poderosas señales como la Hh. Recuerde que los grupos palmitoilo también se añaden a las proteínas Wnt y probablemente también hagan que la Wnt se una reversiblemente a las células, lo cual restringe la señalización Wnt a las células adyacentes a la célula que emitió la señal.

La vía Hh en la *Drosophila* Estudios genéticos en la *Drosophila* indican que dos proteínas de la membrana, *Smoothed* (*Smo*) y *Patched* (*Ptc*), son necesarias para recibir y transducir una señal Hedgehog al interior de la célula. La *Smoothed* tiene siete hélices α que se extienden en la membrana y está relacionada en sus secuencias con el receptor Fz de Wnt. Se predice que *Patched* contiene 12 hélices α transmembrana y es en gran medida similar en su estructura a la proteína Niemann-Pick C1 (NPC1), un miembro de la **superfamilia ABC** de proteínas de la membrana (véase el **Cuadro 11-3**).

La **Figura 16-2** muestra un modelo actual de la **vía de Hedgehog** (*Hh*) en la *Drosophila*. Inicialmente, la evidencia que apoya este modelo provino de estudios hechos en embriones de la mosca con mutaciones con pérdida de la función en los genes *hedgehog* (*hh*) o *smoothed* (*smo*). Ambos tipos de embriones mutantes tienen fenotipos de desarrollo muy similares. Más aún, tanto los genes *hh* como *smo* son necesarios para activar la transcripción de los mismos genes diana (p. ej., *patched* y *wingless*) durante el desarrollo embrionario. Por el contrario, las mutaciones con pérdida de la función en el gen *patched* (*ptc*) producen un fenotipo bastante distinto, similar al efecto de inundación del embrión con la pro-

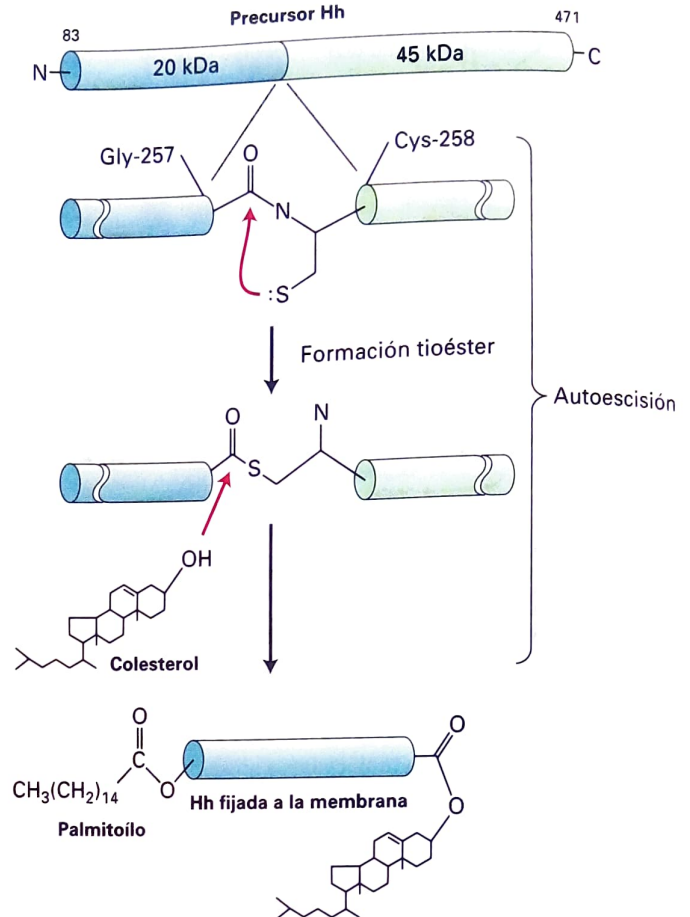


FIGURA 16-31 Procesamiento de la proteína precursora Hedgehog (Hh).

Las células sintetizan un precursor de 45 kDa Hh, que sufre un ataque nucleofílico por la cadena lateral tiol de la cisteína 258 (Cys-258) del carbono del carbonilo del residuo adyacente de glicina 257 (Gly-257), que forma un intermediario tioéster de alta energía. Una actividad enzimática del dominio C-terminal cataliza luego la formación de un enlace éster entre el grupo hidroxilo β -3 del colesterol y la glicina 257, lo que escinde el precursor en dos fragmentos. El fragmento de señalización N-terminal (azul) retiene el colesterol y también se modifica por la adición de un grupo palmitoilo en el N-terminal. Se piensa que este procesamiento ocurre principalmente dentro de la célula. Las dos anclas hidrofóbicas pueden fijar la proteína secretada, procesada, Hh a la membrana plasmática. (Adaptado de J. A. Porter y cols., 1996, *Science* **274**:255.)

teína Hedgehog. Así, *Patched* parece antagonizar las acciones de Hedgehog y viceversa. Estos hallazgos sugieren que, en ausencia de Hedgehog, *Patched* reprime los genes diana al inhibir una vía de señalización necesaria para la activación génica. La observación adicional de que *Smoothed* es necesaria para la transcripción de los genes diana en los mutantes que carecen de función *patched* ubica a *Smoothed* corriente abajo de *Patched* en la vía Hh. La evidencia indica que Hedgehog se une directamente a *Patched* y evita que este bloquee la acción de *Smoothed*, lo cual activa la transcripción de los genes diana.

En ausencia de Hedgehog, *Patched* está enriquecido en la membrana plasmática, pero *Smoothed* lo está en las membranas que cubren las vesículas internas. El complejo de proteínas citosólicas en la vía de la Hh consiste en varias proteínas (**Fig. 16-32a**), que incluyen *Fused* (*Fu*), una cinasa serina-treonina; *Costal-2* (*Cos2*),

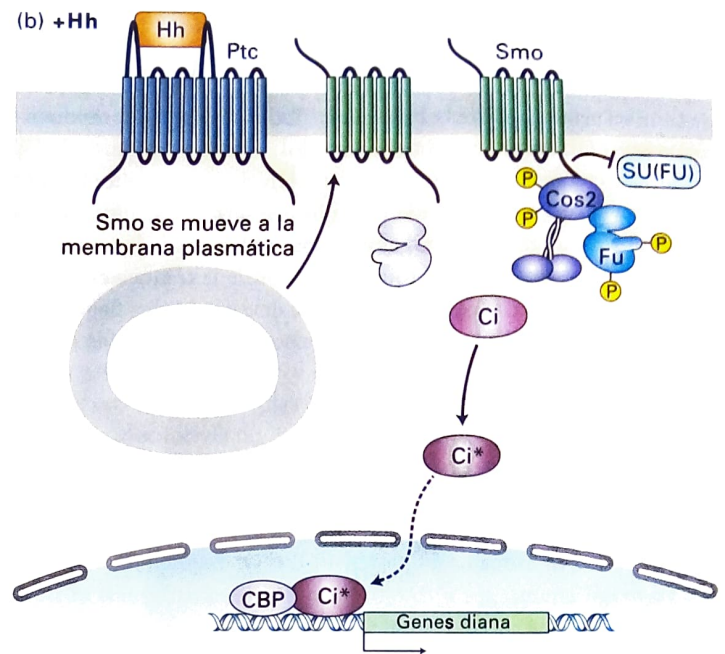
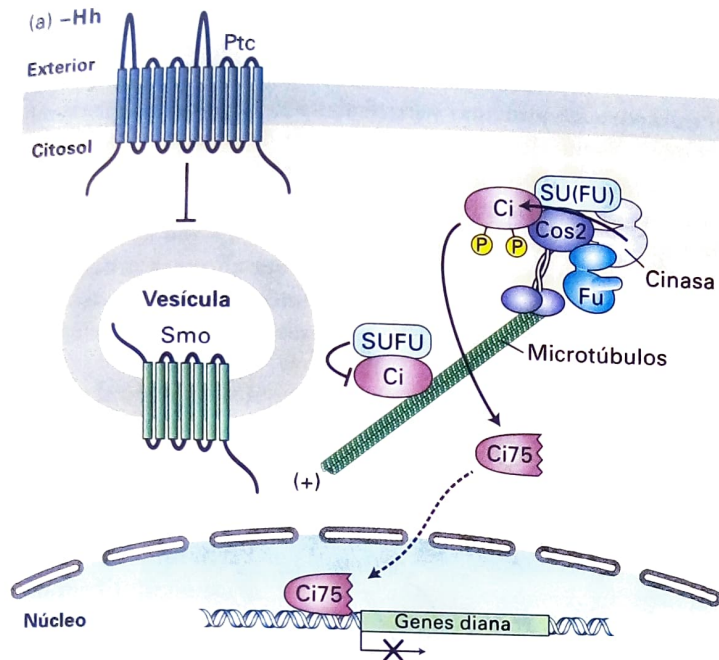


FIGURA 16-32 La señalización Hedgehog en las moscas. (a) En ausencia de la hedgehog (Hh), la proteína patched (Ptc) inhibe la proteína smoothened (Smo), presente principalmente en la membrana de vesículas internas. Un complejo que contiene Fused (Fu), una cinasa; otras cinasas; Costal-2 (Cos-2), una proteína motora relacionada con la cinecina; y Cubitus interruptus (Ci), un factor de transcripción que se une al dedo de zinc, se une a los microtúbulos. Ci se fosforila en una serie de pasos que involucran la proteína cinasa A (PKA), la sintasa-cinasa 3 glucógeno (GSK3) y la caseína-cinasa 1 (CK1). Luego, la Ci fosforilada se escinde proteolíticamente por acción de la vía de la ubiquitina-proteasoma, y esto genera el fragmento Ci75, que funciona como un represor de la transcripción de los genes que responden a Hh. Su(Fu) también puede asociarse a lo largo de toda la Ci para evitar su translocación al núcleo. (b)

Hh se une a la Ptc y provoca que cierta Ptc se mueva a los compartimientos internos (no se muestra) y alivia la inhibición de la Smo. Entonces, Smo se mueve a la membrana plasmática, se fosforila, se une a la Cos-2 y se estabiliza a partir de la degradación. Tanto Fu como Cos-2 se fosforilan extensamente y, lo que resulta más importante, el complejo Fu-Cos 2-Ci se disocia. Esto conduce a la estabilización de una Ci, Ci* modificada alternada en toda su longitud que desplaza al represor Ci75 del promotor de los genes diana, recluta la proteína activadora de unión a CREB (CBP) e induce la expresión de los genes diana. Se desconocen los compartimientos exactos de la membrana en los cuales Ptc y Smo responden a Hh y su función. (Tomado de S. Goetz y K. Anderson, 2010, *Nature Rev. Genet.* 11:331.)

una proteína del tipo de la cinesina asociada a los microtúbulos; y Cubitus interruptus (Ci), un factor de transcripción. Este complejo se une a los microtúbulos del citosol. La fosforilación de Ci por al menos tres cinasas provoca la unión de un componente de un complejo ubiquitina ligasa que, a su vez, dirige la ubiquitinación de Ci y su direccionamiento a los proteasomas allí. La Ci es sometida a escisión proteolítica; el fragmento de Ci resultante, designado Ci71, se transloca al núcleo y reprime la expresión de los genes diana Hh.

Después de la unión de Hedgehog al receptor Patched, ambas proteínas se mueven desde la superficie celular a las vesículas internas, mientras que Smoothened lo hace desde las vesículas internas a la membrana plasmática; la unión de Hedgehog a Patched también inhibe su capacidad de inhibir Smoothened (Fig. 16-32a). Esto desencadena varias respuestas celulares, que incluyen un incremento en la fosforilación de Fu y Cos2. Es importante considerar que el complejo de Fu, Cos2 y Ci se disocia de los microtúbulos, y Cos2 se asocia con la cola C-terminal de Smoothened. La ruptura resultante del complejo Fus, Cos2 y Ci provoca una reducción tanto en la fosforilación como en la escisión de Ci. Como resultado, se genera una forma modificada de Ci en toda su longitud, llamada Ci*, y se transloca al núcleo, donde se une al coactivador de la

transcripción, proteína que une CREB (CBP), lo que promueve la expresión de los genes diana.

Regulación de la señalización Hh El control por retroalimentación de la vía Hh es importante porque la señalización Hh sin restricciones puede provocar el sobrecrecimiento canceroso o la formación de los tipos celulares erróneos. En *Drosophila*, uno de los genes inducidos por la señal Hh es *patched*. El incremento ulterior en la expresión de Patched antagoniza la señal Hh en gran medida por la reducción del depósito de la proteína Smoothened activa. Así, el sistema está amortiguado: si durante el desarrollo se genera demasiado Hh, se compensará con un incremento consecuente de Patched; si se produce muy poca señal Hh, la cantidad de Patched disminuye.

La señalización de Hedgehog en los vertebrados involucra a los cilios primarios

La vía de señalización Hh de los vertebrados comparte muchas características con la vía en *Drosophila*, pero también hay algunas diferencias sorprendentes. En primer lugar, los genomas de los mamíferos

contienen tres genes *hh* diferentes y dos genes *ptc*, que se expresan diferencialmente en varios tejidos. En segundo lugar, los mamíferos expresan tres factores de transcripción Gli que se dividen los papeles de la única proteína Ci de la *Drosophila*. Todos los demás componentes de la vía Hh también están conservados.

El aspecto más fascinante de la vía Hh de los mamíferos es la importancia recién reconocida del cilio primario. Los cilios son las estructuras de membrana largas que sobresalen desde la superficie celular. Los papeles de los abundantes cilios de la tráquea en movilizar materiales a lo largo de la superficie de esta y de los flagelos en el movimiento de los espermatozoides son bien conocidos (véase

el Cap. 18). Sin embargo, la mayoría de las células tienen un cilio inmóvil único llamado *cilio primario* (Fig. 16-33). Como aprendemos en el Capítulo 18, los cilios se extienden y se mantienen por el transporte de proteínas y partículas a lo largo de un haz de microtúbulos centrales; diferentes proteínas de transporte intraflagelares (TIF) mueven proteínas y partículas desde la base del cilio hasta su punta en la dirección opuesta. Parte de la evidencia inicial de un papel de los cilios en la señalización Hh provino de una detección sistemática en busca de mutaciones que alteraran el desarrollo temprano en los mamíferos de modo similar a lo observado en los embriones con señalización Hh alterada: estos fenotipos incluyeron

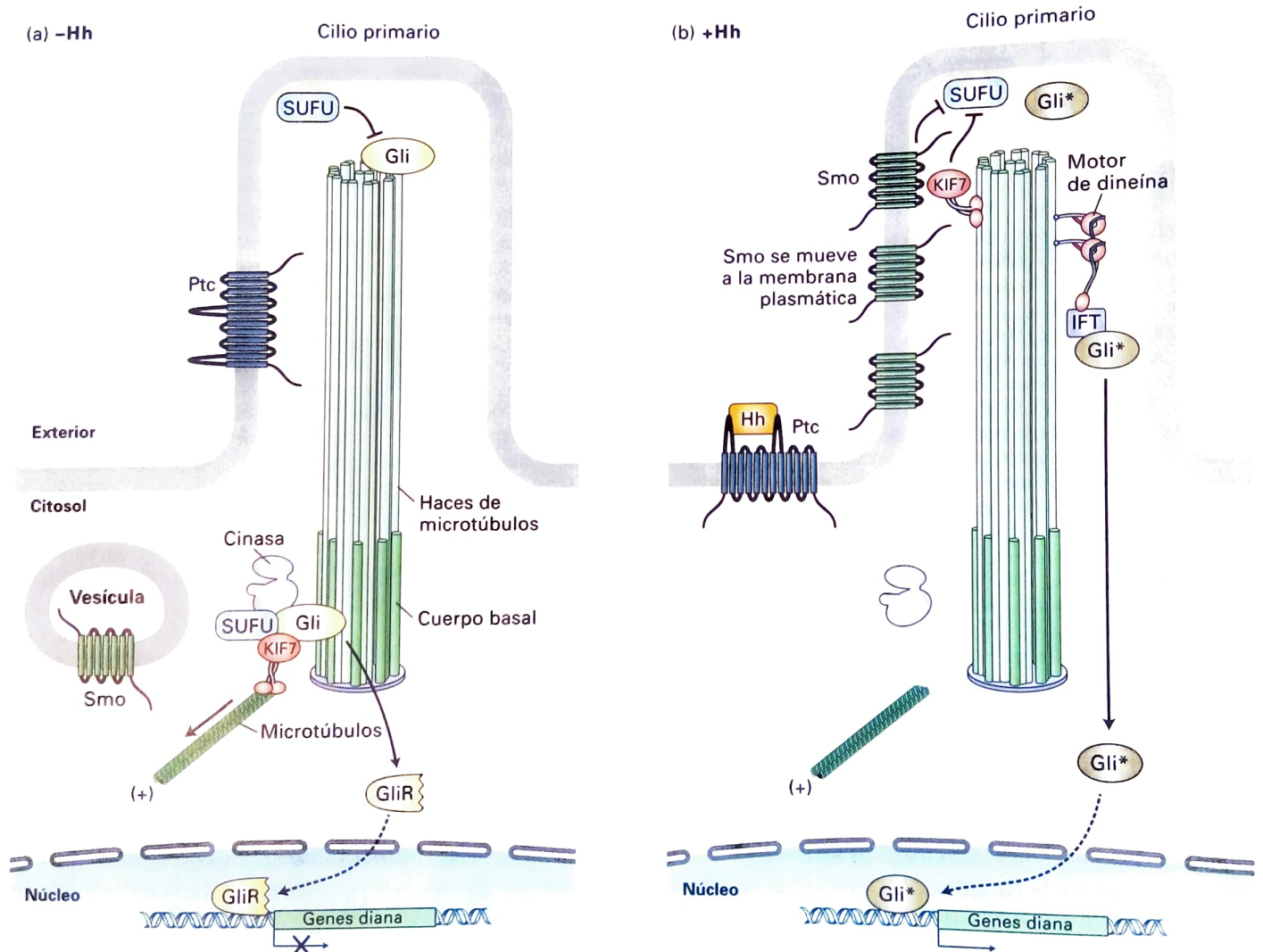


FIGURA 16-33 La señalización Hedgehog en los vertebrados. La señalización Hedgehog (Hh) ocurre en los cilios primarios, pero de cualquier modo el proceso general es similar al de las moscas. (a) En ausencia de Hh, Patched se localiza en la membrana de los cilios y, de un modo desconocido, bloquea la entrada de Smoothened a ellos; Smo está presente principalmente en la membrana de las vesículas internas. La cinasa KIF7 (el homólogo de Cos-2) se une a los microtúbulos de la base de los cilios, donde puede formar un complejo con el factor de transcripción Gli (el homólogo en los vertebrados

de Ci), SuFu y las cinasas. KIF7 evita el enriquecimiento de Gli dentro del cilio y promueve el procesamiento proteolítico de Gli al represor de esta GliR. (b) La unión de Hh desencadena el movimiento de Smo a la membrana del cilio y el movimiento de la proteína motora KIF7 hasta el extremo del microtúbulo ciliar, donde Gli se acumula y se activa por un mecanismo aún desconocido. Luego, la Gli activada es transportada hacia la parte inferior del cilio y se libera al citosol. (Tomado de S. Goetz y K. Anderson, 2010, *Nature Rev. Genet.* 11:331.)

la pérdida de ciertos tipos de células del tubo neural que requieren altos niveles de una proteína Hh. Muchas de estas mutaciones se encontraban en los genes que codificaban las proteínas TIF, lo que indica un papel para los cilios (o flagelos) en la señalización Hh.

El análisis posterior mostró que, en ausencia de señalización Hh, la Ptc se localiza en la membrana del cilio primario, y la Smo, en las vesículas internas cercanas a la base del cilio (Fig. 16-33a). Después de la adición de Hh, Smo se localiza en la membrana del cilio, mientras que Ptc sale de la membrana del cilio (Fig. 16-33b). Este movimiento de la Smo involucra la fosforilación del dominio citosólico C-terminal del receptor por la *cinasa del receptor β -adrenérgico* (BARK), la misma enzima que modifica a los receptores acoplados a la proteína G. Luego, la β -arrestina se une a Smo y, a su vez, recluta la proteína motora de los microtúbulos Kif3A, que se une a los microtúbulos del centro del cilio y mueve la Smo hacia la parte superior de la membrana del cilio. Al mismo tiempo, la degradación de la Gli a un fragmento del represor está bloqueada, y la proteína motora Kif7 mueve la Gli a la punta del cilio. Allí, es activada por Smo mediante un mecanismo que aún se desconoce, y luego otra proteína motora, una dineína, mueve la Gli activada hasta la base del cilio (Fig. 16-31b). Al igual que en las moscas, este factor de transcripción activo luego se mueve al núcleo, donde puede activar la expresión de múltiples genes diana.

No queda claro por qué durante la evolución de los vertebrados los cilios primarios se volvieron necesarios para la señalización Hh, dado que el mismo resultado (la conversión de un factor de transcripción desde un represor a un activador de la expresión génica) ocurre corriente abajo de la señalización Hh, tanto en los sistemas mamíferos como invertebrados.



La inactivación inadecuada de la señalización Hh es la causa de varios tipos de tumores humanos, que incluyen los meduloblastomas (tumores de cerebelo) y los rhabdomiomas (tumores musculares). Los cilios primarios son esenciales para esta señalización anormal de Hh y los fármacos que inhiben la función de los cilios primarios están siendo probados en modelos animales de estos cánceres. Por ejemplo, la expresión de una forma mutante activada de *Smoothed* en el cerebro del ratón posnatal causará meduloblastomas, pero estos tumores no se ocasionarán si en simultáneo se inactiva un gen que codifica una proteína esencial de los cilios. ■

La degradación de una proteína inhibidora activa el factor de transcripción NF- κ B

En el estado en reposo de las vías Wnt y Hedgehog, un factor de transcripción clave se ubiquitina y es sometido a degradación proteolítica; la activación de la vía de señalización implica el bloqueo de la ubiquitinación y la liberación del factor de transcripción en su estado activo. La vía NF- κ B opera de modo opuesto: en el estado de reposo, el factor de transcripción NF- κ B queda retenido en el citosol, unido a un inhibidor; la activación de la vía de señalización involucra la ubiquitinación seguida de la degradación del inhibidor, lo que desencadena la liberación del factor de transcripción activo. Este mecanismo permite que las células respondan a una variedad de señales de estrés y activen de modo inmediato y vigoroso la transcripción génica. Los pasos de la vía NF- κ B fueron revelados en estudios tanto de células de mamífero como en *Drosophila*.

NF- κ B (un acrónimo que proviene del descriptor “moderador del factor nuclear de la cadena ligera kappa de las células B activadas” o su denominación en inglés *nuclear-factor kappa-light-chain enhancer of activated B cells*) se activa rápidamente en las células del sistema inmunitario de mamíferos en respuesta a la infección bacteriana y viral, la inflamación y un número de otras situaciones estresantes, como la radiación ionizante. La vía NF- κ B se activa en algunas células del sistema inmunitario cuando los componentes de la pared celular bacteriana o fúngica se unen a ciertos *receptores del tipo Toll* de la superficie celular (véase la Fig. 23-23). Esta vía también es activada por las llamadas citocinas inflamatorias, como el *factor de necrosis tumoral α* (TNF α) y la *interleucina 1* (IL-1), que son liberadas por casi todas las células como respuesta a la infección. En todos los casos, la unión de un ligando a su receptor induce el ensamblaje de un complejo multiproteico en el citosol, cerca de la membrana plasmática, que desencadena una vía de señalización que da como resultado la activación del factor de transcripción NF- κ B.

Originalmente, el NF- κ B fue descubierto sobre la base de la activación transcripcional del gen que codifica la cadena ligera de los anticuerpos (inmunoglobulinas) de las células B. Ahora se cree que es el regulador maestro de la transcripción del sistema inmunitario de los mamíferos. Si bien las moscas no sintetizan anticuerpos, los homólogos de NF- κ B de la *Drosophila* inducen la síntesis de un gran número de péptidos antimicrobianos secretados en respuesta a la infección bacteriana y viral. Este fenómeno indica que el sistema regulador NF- κ B ha sido conservado durante la evolución y tiene más de quinientos millones de años.

Estudios bioquímicos de las células de mamíferos y estudios genéticos realizados en moscas proporcionaron evidencias importantes acerca de la función de la vía NF- κ B. Las dos subunidades del NF- κ B heterodimérico (p65 y p50) comparten una región de homología en su N-terminal necesaria para su dimerización y la unión al DNA. En células que no están siendo sometidas al estrés o respondiendo a signos de infección, la unión directa a un inhibidor llamado I- κ B α secuestra NF- κ B en estado inactivo en el citosol. Una única molécula de I- κ B α se une a los dominios apareados N-terminales del heterodímero p50-p65 y enmascara así sus señales de localización nuclear (Fig. 16-34a). Un complejo de tres proteínas, llamado *I- κ B cinasa*, opera inmediatamente corriente arriba de NF- κ B y es responsable de liberarla del secuestro. La subunidad de la cinasa β de I- κ B cinasa es el punto de convergencia de todas las otras señales extracelulares que activan la NF- κ B mencionada más arriba. En el lapso de minutos después de la estimulación de la célula por un agente infeccioso o una citocina inflamatoria, la subunidad β de la cinasa IKK se activa por la fosforilación y luego fosforila los dos residuos de serina N-terminales de la I- κ B α (Fig. 16-34a, pasos 1 y 2). Una ubiquitina-ligasa E3 luego se une a estas fosfoserinas y poliubiquitina I- κ B α , lo que desencadena su degradación inmediata por un proteasoma (pasos 3 y 4). En las células que expresan formas mutantes de I- κ B α en las cuales estas dos serinas han sido cambiadas a alanina y, por lo tanto, no pueden fosforilarse, NF- κ B está permanentemente inactiva, lo que demuestra que la fosforilación de I- κ B α es esencial para la activación de la vía.

La degradación de I- κ B α expone las señales de localización nuclear de NF- κ B que, a su vez, se translocan al núcleo y activan la transcripción de una multitud de genes diana (Fig. 16-34a, pasos 5 y 6). A pesar de su activación por la proteólisis, la señalización

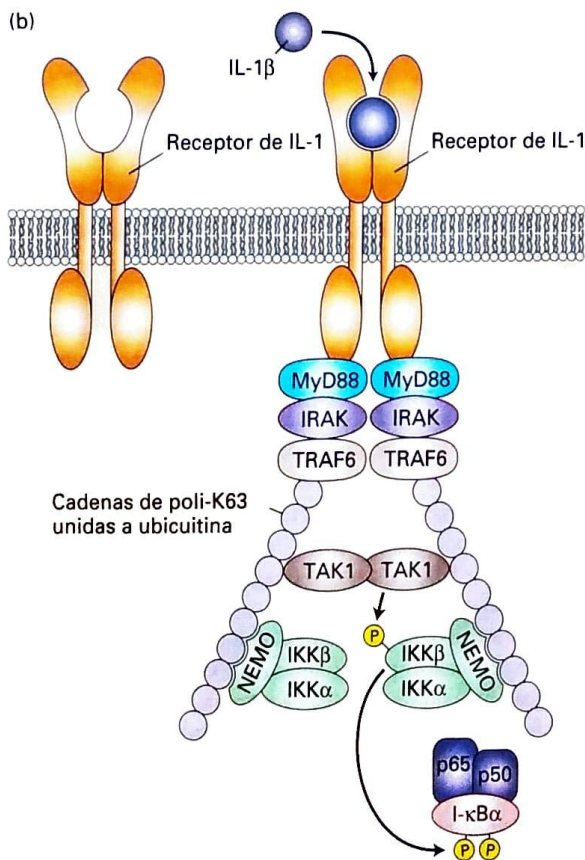
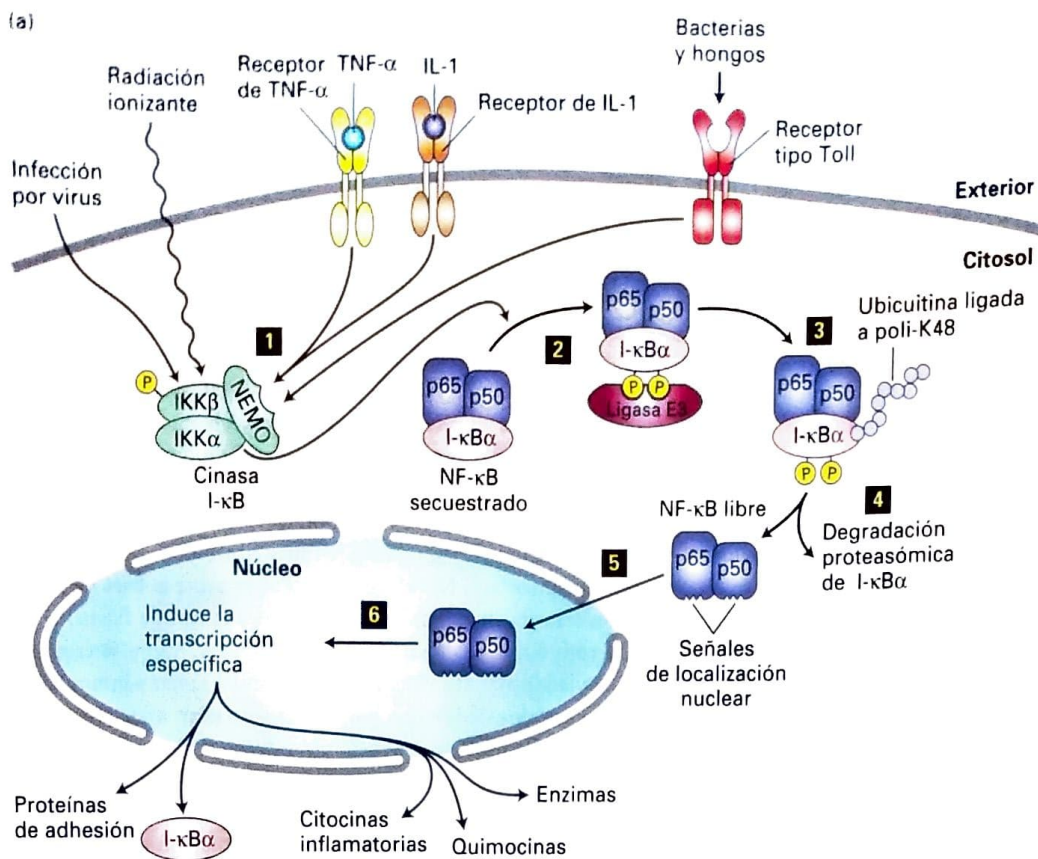


FIGURA 16-34 Activación de la vía de señalización de NF-κB. (a) En las células en reposo, el factor NF-κB dimérico de transcripción, compuesto por las subunidades p50 y p65, es secuestrado en el citosol unido al inhibidor I-κBα. Paso 1: la activación de la cinasa trímica I-κB es estimulada por muchos agentes, que incluyen la infección viral, la radiación ionizante, la unión de las citocinas proinflamatorias TNFα o IL-1 a sus receptores respectivos o la activación de cualquiera de los receptores tipo Toll por componentes de las bacterias o los hongos invasores. Paso 2: la subunidad β de la cinasa I-κB luego fosforila el inhibidor I-κBα, que entonces se une a una ubiquitina-ligasa E3. Pasos 3 y 4: la poliubiquitinación ligada a lisina 48 de I-κBα posterior la marca para su degradación por proteasomas. Paso 5: la eliminación de I-κBα desenmascara las señales de localización nuclear (SLN) en ambas subunidades de NF-κB, lo que permite su translocación al núcleo. Paso 6: en el núcleo, NF-κB activa la transcripción de numerosos genes diana, incluido el que codifica I-κBα, que actúa para terminar la señalización y los genes que codifican varias citocinas inflamatorias. (b) La unión de la interleucina-1β (IL-1β) a los receptores de IL-1 (IL-1R) desencadena la oligomerización del receptor y el reclutamiento de varias proteínas al dominio citosólico del receptor que incluye TRAF6 y la E3 ubiquitina-ligasa, que cataliza la síntesis de largas cadenas de lisina-63 ligada a poliubiquitina ligadas a TRAF6 y otras proteínas del complejo. Las cadenas de poliubiquitina funcionan como un andamio para el reclutamiento de la cinasa TAK1 y la subunidad NEMO del complejo trimérico I-κB cinasa. La TAK1 luego se autofosforila y la subunidad β de la I-κB cinasa activa su actividad de cinasa y le permite fosforilar a I-κBα. (Parte [a] tomado de R. Khush y cols., 2001, *Trends Immunol.* 22:260 y J.-L. Luo y cols., 2005, *J. Clin. Invest.* 115:2625, parte [b] tomada de B. Skaug y cols., 2009, *Ann. Rev. Biochem.* 78:769.)

NF- κ B finalmente se apaga por un bucle de retroalimentación negativo, dado que uno de los genes cuya transcripción es inmediatamente inducida por NF- κ B codifica I- κ B α . Los niveles resultantes aumentados de la proteína I- κ B α se unen a la NF- κ B del núcleo y la regresan al citosol.

En muchas células del sistema inmunitario, la NF- κ B estimula la transcripción de más de 150 genes, incluidos los que codifican citoquinas y quimocinas; estos últimos atraen a otras células del sistema inmunitario y a los fibroblastos a los sitios de la infección. La NF- κ B también promueve la expresión de proteínas receptores que permiten que los neutrófilos (un tipo de linfocito) migren desde la sangre al tejido subyacente (véase la Fig. 20-39). Además, la NF- κ B estimula la expresión de iNOS, la isoforma inducible de la enzima que produce óxido nítrico, tóxico para las bacterias, como así la expresión de varias proteínas antiapoptóticas que evitan la muerte celular. Así, este factor de transcripción simple coordina la defensa del organismo y la activa de modo directo, y responde a los patógenos y al estrés o, indirectamente, a las moléculas de señalización liberadas desde otros tejidos y células infectados o dañados.

Las cadenas de poliubiquitina sirven como plataformas que vinculan los receptores a proteínas corriente abajo en la vía del NF- κ B

Hemos visto que la subunidad β cinasa de I- κ B es el punto de convergencia para las señales extracelulares transmitidas a través de múltiples receptores, que incluyen Toll e IL-1. Dado que los dominios citosólicos de Toll e IL-1 no tienen actividad enzimática, durante muchos años fue un misterio el modo en que la activación de estos receptores llevaba a la activación y fosforilación de la subunidad β de la cinasa de I- κ B. Investigaciones iniciales demostraron que la presencia de IL-1 conducía a la oligomerización del receptor de IL-1 y a la unión de varias proteínas a su dominio citosólico, incluida la TRAF6, una E3 ubiquitina-ligasa que sintetiza cadenas de poliubiquitina. Dado que entonces se pensaba que toda la poliubiquitinación señalizaba la degradación por proteasomas, los investigadores buscaron proteínas diana ubiquitinadas que se destruyeran con rapidez. Al no encontrarlas, buscaron otros posibles papeles para la poliubiquitina y pronto encontraron que, dependiendo de la ligasa de ubiquitina E3 específica, la ubiquitina forma múltiples tipos de polímeros que tienen diferentes estructuras y funciones biológicas.

La E3 ubiquitina-ligasa que modifica I- κ B α liga el extremo carboxilo de una ubiquitina a la lisina 48 (K48) de otra; esta poli-K48 ubiquitina direcciona la proteína unida al proteasoma (Fig. 16-36a). Por el contrario, la E3 ligasa TRAF6 une el carboxi-terminal de una ubiquitina a la lisina 63 (K63) de otra (véase la Fig. 3-34). La cadena de poli-K63 resultante no direcciona las proteínas para la degradación; en lugar de ello, estas cadenas de ubiquitina actúan como plataformas que unen proteínas con un dominio poli-K63 de unión a ubiquitina. Una de estas es la proteincinasa TAK1, que se activa al unirse a la cadena de poliubiquitina; otra es la subunidad NEMO de la cinasa I- κ B. Así, la unión a la poli-K63 ubiquitina lleva a la cinasa y a su diana, la subunidad β cinasa de la I- κ B, a la proximidad, de modo tal que la TAK1 puede fosforilar y activar esta cinasa corriente abajo (Fig. 16-36b). Como se notó previamente, esta cinasa entonces fosforila I- κ B α . Así, diferentes tipos

de cadena de poliubiquitina participan de modo muy diferente en la transmisión de la señal IL-1 a la activación de los factores de transcripción NF- κ B.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 16.5

Vías de señalización controladas por la ubiquitinación: Wnt, Hedgehog y NF- κ B

- Muchas vías de señalización implican la ubiquitinación y proteólisis de la proteína diana y, de este modo, son irreversibles o solo lentamente reversibles. Las proteínas diana pueden ser un factor de transcripción o un inhibidor de un factor de transcripción.
- Wnt controla numerosos eventos críticos del desarrollo, como el desarrollo cerebral, la formación de miembros y la organogénesis. Hedgehog funciona como un morfógeno durante el desarrollo. Las mutaciones activadoras de ambas vías pueden provocar cáncer.
- Tanto Hedgehog como Wnt son proteínas secretadas que contienen anclas lipídicas que las fijan a las membranas celulares y reducen así su espectro de señalización.
- Las señales de Wnt actúan a través de dos proteínas de superficie celular, el receptor Frizzled y el correceptor LRP, y un complejo intracelular que contiene β -catenina (véase la Fig. 16-30). La unión de Wnt promueve la estabilidad y localización nuclear de β -catenina que, de modo directo o indirecto, promueve la activación del factor de transcripción TCF.
- La señal Hedgehog actúa también a través de dos proteínas de la superficie celular, Smoothened y Patched, y de un complejo intracelular que contiene el factor de transcripción Cubitus interruptus (Ci) (véase la Fig. 16-32). Una forma activadora de Ci se genera en presencia de Hedgehog; un fragmento represor Ci se genera en ausencia de Hedgehog. Tanto Patched como Smoothened cambian su localización subcelular en respuesta a Hedgehog unido a Patched.
- La señalización de Hh en los vertebrados requiere el transporte en los cilios primarios e intraflagelar de proteínas. Patched se localiza en la membrana de los cilios en ausencia de Hh, y Smo se mueve hacia los cilios cuando hay Hh presente (véase la Fig. 16-33).
- El factor de transcripción NF- κ B regula muchos genes que permiten a las células responder a la infección y a la inflamación.
- En las células no estimuladas, NF- κ B se localiza en el citosol, unida a la proteína inhibidora I- κ B α . En respuesta a muchos tipos de señales extracelulares, la ubiquitinación dependiente de la fosforilación y la degradación de I- κ B α en los proteasomas libera NF- κ B activa que se transloca al núcleo (véase la Fig. 16-34a).
- Las cadenas de poliubiquitina ligadas al receptor IL-1 activado forman una plataforma que lleva la cinasa TAK1 cerca de su sustrato, una subunidad de la cinasa I- κ B, y así permite que las señales se transmitan desde el receptor a componentes corriente abajo de la vía NF- κ B (véase la Fig. 16-34b).

16.6 Vías de señalización controladas por la escisión proteica: Notch/Delta, SREBP

En esta sección, consideramos las vías de señalización activadas por la escisión proteica en un espacio extracelular (con frecuencia, en la superficie de la célula), en general por miembros de la familia de la metaloproteasa de la matriz (MMP). Por ejemplo, en la vía *Notch/Delta*, la escisión de MMP de la parte extracelular de receptor Notch es seguida de su escisión dentro de la membrana plasmática por una proteasa distinta, con liberación del dominio citosólico que funciona como factor de transcripción. Esta vía determina los destinos de muchos tipos de células durante el desarrollo.

Previamente en este capítulo, vimos que múltiples factores de crecimiento emiten señales a través de receptores tirosincinasa. Muchos de estos factores de crecimiento, incluidos los miembros de la familia del factor de crecimiento epidérmico (EGF), se sintetizan como precursores que atraviesan la membrana y pueden emitir señales a células adyacentes al unirse a receptores EGF sobre sus superficies. Sin embargo, la escisión de estas proteínas por metaloproteasas de la matriz libera los factores de crecimiento activos al medio extracelular, lo que les permite emitir señales a las células mucho más distantes y aun a las células que los han liberado (señalización autocrina). Dado que este proceso implica una forma de escisión proteolítica similar a lo que ocurre en la vía *Notch/Delta*, también la consideraremos aquí. La activación y liberación de factores de crecimiento por escisión proteica está alterada en muchos cánceres y podría conducir a un agrandamiento, con frecuencia fatal, del corazón. La escisión inadecuada de MMP, otra proteína que se expande en la membrana, ha sido implicada en la patología de la enfermedad de Alzheimer.

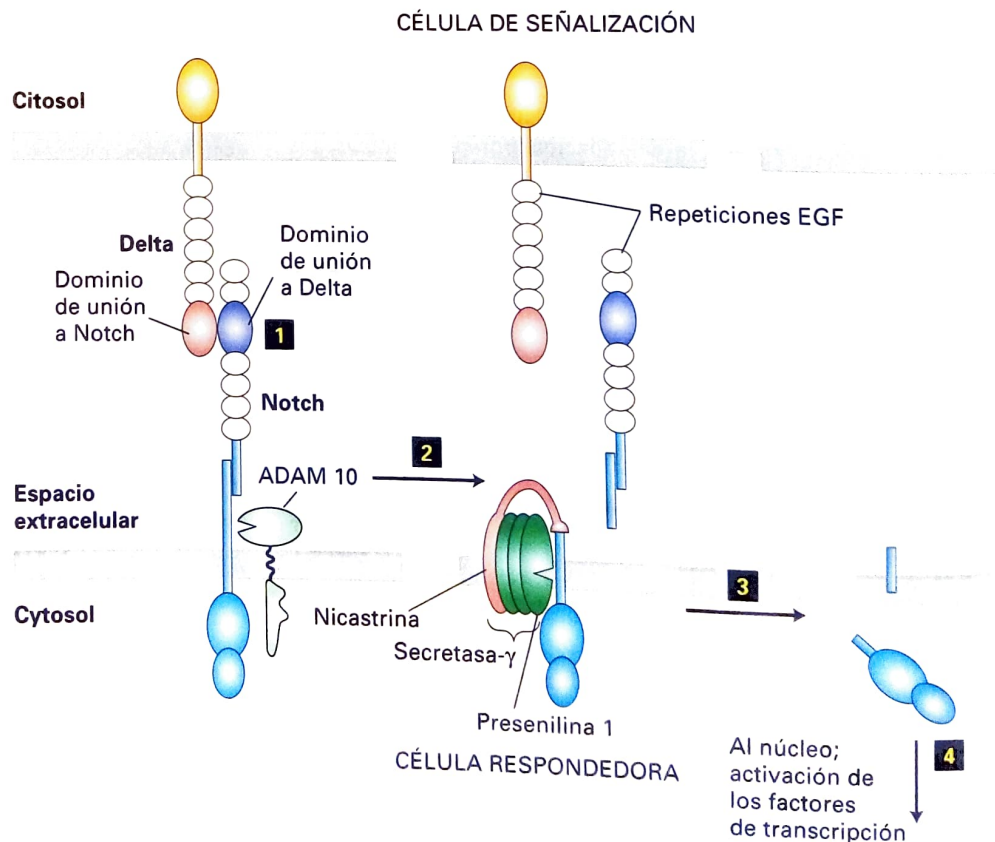
La escisión regulada de proteínas también se utiliza en algunas vías de señalización intracelular. Así, concluimos nuestro análisis describiendo una de estas vías: la escisión de un precursor de un factor de transcripción dentro de la membrana, en particular dentro de la membrana del Golgi, en respuesta a bajos niveles de colesterol. Esta vía resulta esencial para el mantenimiento del adecuado equilibrio de colesterol y fosfolípidos para la construcción de las membranas celulares (véase el Cap. 10).

Con la unión de Delta, el receptor Notch se escinde y libera un factor de transcripción componente

Tanto el receptor conocido como Notch como su ligando Delta son proteínas transmembrana que se expanden y se encuentran sobre la superficie celular. Notch también tiene otros ligandos, pero los mecanismos moleculares de activación son los mismos con cada uno de ellos. El Delta de una célula se une a Notch de una célula adyacente (pero no de la misma célula) y lo activa, de modo tal que sufre dos eventos de escisión; estos resultan en la liberación del dominio citosólico de Notch que funciona como un factor de transcripción.

La Notch se sintetiza como una proteína monomérica de la membrana en el retículo endoplasmático. En el complejo de Golgi, sufre una escisión proteolítica que genera una subunidad extracelular y una subunidad citosólica transmembrana; ambas permanecen asociadas de manera no covalente entre sí. Después de la unión de Delta, la proteína Notch sobre la célula que responde sufre dos escisiones proteolíticas adicionales (Fig. 16-35). La primera es catalizada por ADAM 10, una metaloproteasa de la matriz. (El nombre ADAM proviene de *a* dis-

FIGURA 16-35 Vía de señalización Notch/Delta. En ausencia de Delta, la subunidad extracelular de Notch en una célula que responde está asociada de modo no covalente con su subunidad citosólica transmembrana. Cuando Notch se une a su ligando Delta en una célula de señalización adyacente (paso 1), Notch es inicialmente escindida por la metaloproteasa de la matriz ADAM 10, que está unida a la membrana, y libera el segmento extracelular de Notch (paso 2). Luego la subunidad de nicastrina del complejo de cuatro proteínas secretasa- γ se une al tocón generado por ADAM 10 y la proteasa supuesta, presenilina 1, cataliza una escisión intramembrana que libera el segmento citosólico de Notch (paso 3). Después de la translocación al núcleo, este segmento Notch interactúa con varios factores de transcripción para afectar la expresión de los genes que, a su vez, influyen en la determinación del destino celular durante el desarrollo (paso 4). (Véase M. S. Brown y cols., 2000, *Cell* 100:391 y D. Seals y S. Courtneidge, 2003, *Genes Dev.* 17:7.)



tegrin and metalloprotease, lo que en español significa una desintegrina y una metaloproteasa; una desintegrina es un dominio de proteína conservado que une integrinas y rompe las interacciones célula-matriz; véase el Cap. 20). La segunda escisión ocurre dentro de la región hidrofóbica que se extiende en la membrana de Notch y está catalizada por un complejo transmembrana de cuatro proteínas llamado *secretasa-γ*. Esta escisión libera el segmento citosólico de Notch que de inmediato se transloca al núcleo, donde afecta la transcripción de varios genes diana. Aún no se comprende bien de qué manera la hidrólisis del enlace peptídico puede ocurrir dentro del ambiente hidrofóbico del interior de la membrana. Esta *proteólisis intramembrana regulada (RIP)* inducida por la señal se emplea en una variedad de sistemas de señalización, que incluyen la respuesta de las células al bajo colesterol (véase más adelante) y a la presencia de proteínas no plegadas en el retículo endoplasmático (véase el Cap. 13).

El complejo de secretasa- γ contiene una proteína llamada *presenilina 1* y otras tres subunidades esenciales, *aph-1*, *pen-2* y *nicastrina*. La presenilina 1 (PS1) fue identificada inicialmente como el producto de un gen que por lo general se encuentra mutado en pacientes con una forma autosómica dominante de la enfermedad de Alzheimer. Los estudios realizados en células que carecen de nicastrina mostraron que la secretasa- γ puede escindir proteínas solo que han sido primero hidrolizadas por ADAM u otra metaloproteasa de la matriz. La nicastrina se une al tocón extracelular N-terminal de la proteína de membrana generado por la primera proteasa (véase la Fig. 16-35). Sin este tocón, la nicastrina, y así el complejo de la secretasa- γ completo, no puede interactuar con su proteína diana. Más adelante, examinamos el papel de las proteínas ADAM y la secretasa- γ en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer.

La localización de Notch y Delta en células distintas, adyacentes, es esencial porque participan en un proceso de diferenciación celular muy conservado e importante tanto en invertebrados como en vertebrados, llamado **inhibición lateral**. En este proceso, células adyacentes e inicialmente equivalentes en el desarrollo asumen destinos totalmente distintos. En efecto, una célula en un grupo de células equivalentes instruye a las otras que se encuentran alrededor a elegir un destino dis-

tinto. Como ejemplo de cómo ocurre esto en la *Drosophila*, el segmento intracelular liberado de Notch forma un complejo con una proteína que se une al DNA, llamada supresora de la ausencia de pelo (Supresor of Hairless) o Su (H). Este complejo estimula la transcripción de muchos genes cuyo efecto neto es influenciar la determinación del destino celular durante el desarrollo. Una de las proteínas aumentadas de este modo es la propia Notch, y la producción de Delta se reduce en consecuencia. Así, una célula que debe tener un poco más de Notch que sus vecinas será estimulada para producir aún más Notch y menos Delta y para asumir un destino en el desarrollo distinto del de las células adyacentes ricas en Delta. De este modo, la regulación recíproca de receptor y ligando es una característica esencial de la interacción entre las células inicialmente equivalentes que hace que adopten diferentes destinos celulares.

Las metaloproteasas de la matriz catalizan la escisión de muchas proteínas de señalización desde la superficie celular

Muchas moléculas de señalización son sintetizadas como proteínas transmembrana cuyo dominio señal se extiende dentro del espacio extracelular. Estas proteínas de señalización, como la Delta descrita más arriba, con frecuencia tienen actividad biológica, pero solo pueden emitir señales al unirse a receptores de células adyacentes. Sin embargo, muchos factores de crecimiento y otras proteínas señal son sintetizados como precursores transmembrana cuya escisión libera la molécula soluble de señalización activa al espacio extracelular. Con frecuencia, esta escisión es llevada a cabo por metaloproteasas de la matriz (MMP), que son enzimas que contienen metal y escinden los segmentos extracelulares de proteínas diana cercanas a la superficie externa de la membrana plasmática. El genoma humano codifica 19 metaloproteasas de la familia ADAM, y muchas están involucradas en la escisión de los precursores de proteínas de señalización justo por fuera de su segmento transmembrana. Esta proteólisis mediada por ADAM de tales precursores es similar a la escisión de Notch por

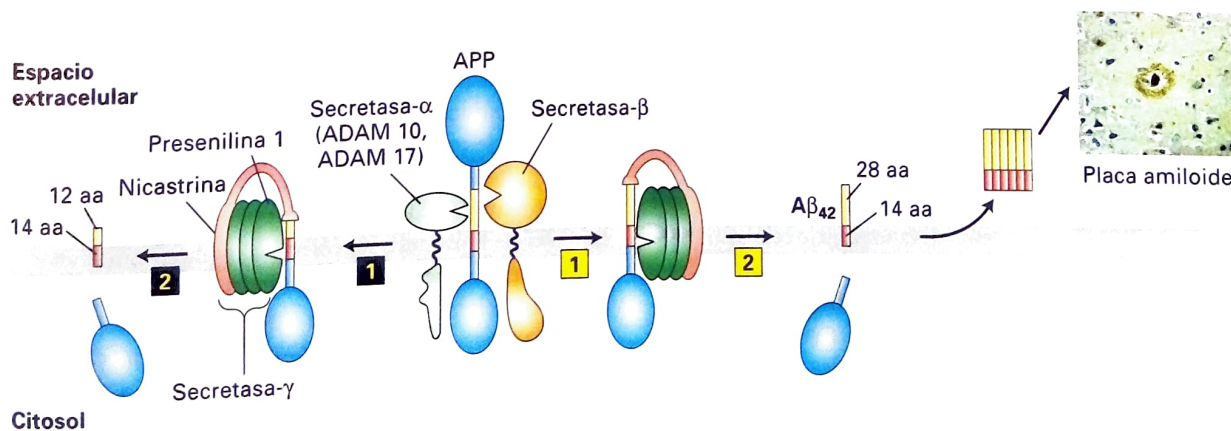


FIGURA 16-36 Escisión proteolítica de la APP y la enfermedad de Alzheimer. (Izquierda) La escisión proteolítica secuencial por la secretasa- α (ADAM 10 o ADAM 17) (1) y secretasa- γ (2) produce un péptido de 26 aminoácidos inocuo inserto en la membrana. (Derecha) Escisión en el dominio extracelular por una secretasa- β (1) seguida de la escisión dentro de la membrana por la secretasa- γ (2) que genera el péptido de 42 residuos de la membrana por la secretasa- γ

$A\beta_{42}$, que espontáneamente forma oligómeros y luego, las placas amiloides de mayor tamaño presentes en el cerebro de los pacientes con enfermedad de Alzheimer. En ambas vías, el segmento citosólico de la APP se libera en el citosol, pero su función es desconocida. (Véase S. Lichtenthaler y C. Haass, 2004. *J. Clin. Invest.* 113:1384, y V. Wilquet y B. De Strooper, 2004. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14:582. Inset © ISM/Phototake.)

ADAM 10 (véase la Fig. 16-35), excepto que el segmento extracelular liberado tiene actividad de señalización. La actividad de ADAM, y así la liberación de las proteínas de señalización activas, debe estar estrechamente regulada por la célula, pero aún no queda claro cómo ocurre esto. Una interrupción en los mecanismos de la regulación de las proteasas ADAM puede conducir a la proliferación anormal de las células.

 Ejemplos de importancia médica de la escisión regulada de los precursores de las proteínas señal son los miembros de la familia EGF, que incluyen EGF, HB-EGF, TGF- α , NRG1 y NRG2 (véase la Fig. 16-7). La actividad aumentada de un ADAM o más que se observa en muchos cánceres puede promover el desarrollo cancerígeno de dos modos. En primer lugar, la actividad aumentada de ADAM puede conducir a altos niveles de factores de crecimiento de la familia de EGF, que estimulan a las células secretoras (señalización autocrina) o a las células adyacentes (señalización paracrina) a proliferar inadecuadamente. En segundo lugar, al destruir los componentes de la matriz extracelular, se piensa que la actividad incrementada de ADAM facilita las metástasis, el movimiento de las células tumorales a otras localizaciones corporales.

Las proteasas ADAM también son un factor importante en las cardiopatías. Como aprendimos en el capítulo anterior, la estimulación por epinefrina (adrenalina) de los receptores β -adrenérgicos en el músculo cardíaco provoca la glucogenólisis y un incremento en la frecuencia de la contracción muscular. Sin embargo, el tratamiento prolongado en las células de músculo cardíaco con epinefrina conduce a la activación de la ADAM 9 por un mecanismo desconocido. Esta metaloproteasa de la matriz escinde al precursor transmembrana de HB-EGF. Entonces, el HB-EGF liberado se une a los receptores EGF sobre las células de músculo cardíaco señalizadas y estimula su crecimiento inadecuado. Esta proliferación excesiva puede llevar a un corazón agrandado pero debilitado (una afección conocida como hipertrofia cardíaca, que puede provocar la muerte prematura). ■

La escisión inadecuada de la proteína precursora amiloide puede llevar a la enfermedad de Alzheimer

 La enfermedad de Alzheimer es otra afección provocada por la actividad inadecuada de las metaloproteasas de la matriz. Un cambio patológico central asociado con la enfermedad de Alzheimer es la acumulación cerebral de las *placas amiloides* que contiene agregados de un péptido pequeño (que contiene 42 residuos) llamado $A\beta_{42}$. Este péptido deriva por escisión proteolítica de la *proteína precursora amiloide (PPA)*, una proteína de la superficie celular transmembrana de función aún misteriosa expresada por las neuronas.

Al igual que la proteína Notch, la PPA sufre una escisión extracelular y una escisión intramembrana (Fig. 16-36). En primer lugar, el dominio extracelular es escindido en uno o dos sitios en el dominio extracelular: por ADAM 10 (con frecuencia llamada colectivamente *secretasa- α*) o por otra proteasa de la matriz llamada *secretasa- β* . En cada caso, la secretasa- γ cataliza luego una segunda escisión en un sitio único intramembrana y libera el mismo dominio citosólico PPA pero diferentes péptidos pequeños, dependiendo de cuál sitio celular fue cortado inicialmente. La vía iniciada por la secretasa- α genera un péptido de 26 residuos que en apariencia no daña. Por el contrario, la

vía iniciada por la secretasa- β genera el péptido patológico $A\beta_{42}$, que forma espontáneamente oligómeros y luego las placas amiloides de mayor tamaño presentes en el cerebro de los pacientes con enfermedad de Alzheimer.

La PPA fue reconocida como un actor central en la enfermedad de Alzheimer a través de análisis genéticos del pequeño porcentaje de pacientes con antecedentes familiares de la enfermedad. Muchos tenían mutaciones en la proteína PPA, y resultó intrigante que estas mutaciones estuvieran agrupadas alrededor de los sitios de corte de la secretasa- α , β o γ que se muestran en la Figura 16-36. Otros casos de enfermedad de Alzheimer familiar involucran mutaciones con pérdida de sentido en la presenilina 1, una subunidad de la secretasa- γ que incrementa la formación del péptido $A\beta_{42}$, lo que conduce a la formación de placas y, por último, a la muerte de las neuronas.

En cierta época se propuso que los inhibidores químicos de la actividad de la secretasa- γ serían el tratamiento ideal para la enfermedad de Alzheimer, pero como podría esperarse tuvieron muchos efectos colaterales graves debido a la inhibición concomitante de la escisión de Notch y de otras proteínas transmembrana. La reciente descubierta *proteína activadora de la secretasa- γ (GSAP)* incrementa de modo notable y selectivo la producción de la $A\beta_{42}$ amiloidea a través de un mecanismo que involucra sus interacciones con la secretasa- γ y su sustrato, el fragmento carboxi-terminal PPA generado por la secretasa- β . Dado que GSAP no afecta la escisión de Notch efectuada por la secretasa- γ , las sustancias químicas que se unen selectivamente a GRASP e inhiben sus interacciones con la secretasa- γ o su sustrato, el fragmento carboxi-terminal PPA resulta una terapia promisoriosa para el Alzheimer. ■

La proteólisis intramembrana regulada de la SREBP libera un factor de transcripción que actúa para mantener los niveles de fosfolípidos y colesterol

Si bien este capítulo está enfocado en las vías de señalización iniciadas por moléculas extracelulares (p. ej., factores de crecimiento), en ocasiones las vías de señalización *intracelular* que registran los niveles de moléculas internas y responden de acuerdo con ellos comparten principios de la regulación molecular e incluso mecanismos con las vías iniciadas desde el exterior de la célula. Uno de tales casos es el control de los lípidos de la membrana celular. Una célula enfrentaría una crisis rápidamente si no tuviese suficientes fosfolípidos para fabricar cantidades adecuadas de membrana o si tuviese demasiado colesterol, de modo que se formaran grandes cristales que dañaran las estructuras celulares. Las células detectan las cantidades relativas de colesterol y fosfolípidos de sus membranas; responden ajustando las tasas de biosíntesis de colesterol e importan de modo tal que el cociente colesterol:fosfolípidos se mantenga dentro de un rango deseable estrecho. La proteólisis regulada dentro de la membrana, que ocurre en la vía Notch, también desempeña un papel importante en esta respuesta celular a los niveles de colesterol alterados.

Como aprendimos en el Capítulo 14, la lipoproteína de bajo densidad (LDL) es rica en colesterol y funciona transportando este lípido a través del aparato circulatorio acuoso (véase la Fig. 14-27). Tanto la vía biosintética del colesterol (véase la Fig. 10-26) como los niveles de receptores celulares de la LDL que median la captación de LDL a la célula están regulados en menos cuando los niveles de colesterol celular son los adecuados. Dado que la LDL se impor-

ta a las células vía endocitosis mediada por receptor (véase la Fig. 14-20), un descenso en el número de receptores de LDL conduce a la importación celular disminuida de colesterol. Tanto la biosíntesis de colesterol como su importación están reguladas a nivel de la transcripción génica. Por ejemplo, cuando las células en cultivo de tejido en crecimiento que requieren nueva membrana para la división sostenida se incuban con una fuente externa de colesterol, por ejemplo la LDL añadida al medio de cultivo, el nivel de actividad de la HMG-CoA reductasa, la enzima que controla la velocidad en la biosíntesis de colesterol, se suprime, mientras que la actividad de la acil:colesterol acil transferasa (ACAT), que convierte el colesterol a la forma de almacenamiento esterificada, aumenta. Así, la energía no se desperdicia, y esto hace innecesario colesterol adicional y se logra la homeostasis del colesterol.

Los genes cuya expresión está controlada por el nivel de esteroides, tales como el colesterol, con frecuencia contienen uno o más *elementos reguladores de esteroides (SRE)*, o de diez pares de bases o hemisitios SRE en sus promotores. (Estos SRE difieren de los *elementos respondedores del suero*, de su nombre en inglés *serum responder elements*, que controlan muchos genes de respuesta temprana analizados en la Sec-

ción 16.2). La interacción de los factores de transcripción dependientes del colesterol llamados **proteínas de unión a SRE (SREBP)** con estos elementos de respuesta modula la expresión de los genes diana. ¿De qué manera estas células detectan cuánto colesterol tienen y cómo esta “señal” se usa para controlar el nivel de las SREBP en el núcleo y en la expresión de los genes? La vía mediada por las SREBP comienza en las membranas del retículo endoplasmático (RE) e incluye al menos otras dos proteínas además de las SREBP.

Cuando las células tienen concentraciones adecuadas de colesterol, las SREBP se encuentran en la membrana del RE formando un complejo con la SCAP (la proteína que activa la escisión de la SREBP), la insig-1 (o su homóloga cercana, la insig-2) y quizás otras proteínas (Fig. 16-37a). La SREBP tiene tres dominios distintos: un dominio citosólico N-terminal, que contiene un motivo de unión al DNA básico hélice-bucle-hélice (bHLH) (véase la Fig. 7-29) que funciona como un factor de transcripción cuando se lo escinde del resto de la SREBP; un dominio central de anclaje a la membrana que contiene dos hélices α transmembrana y un dominio regulador citosólico C-terminal, que interactúa con el dominio regulador de la SREBP. La SCAP tiene ocho hélices α transmembrana y un dominio

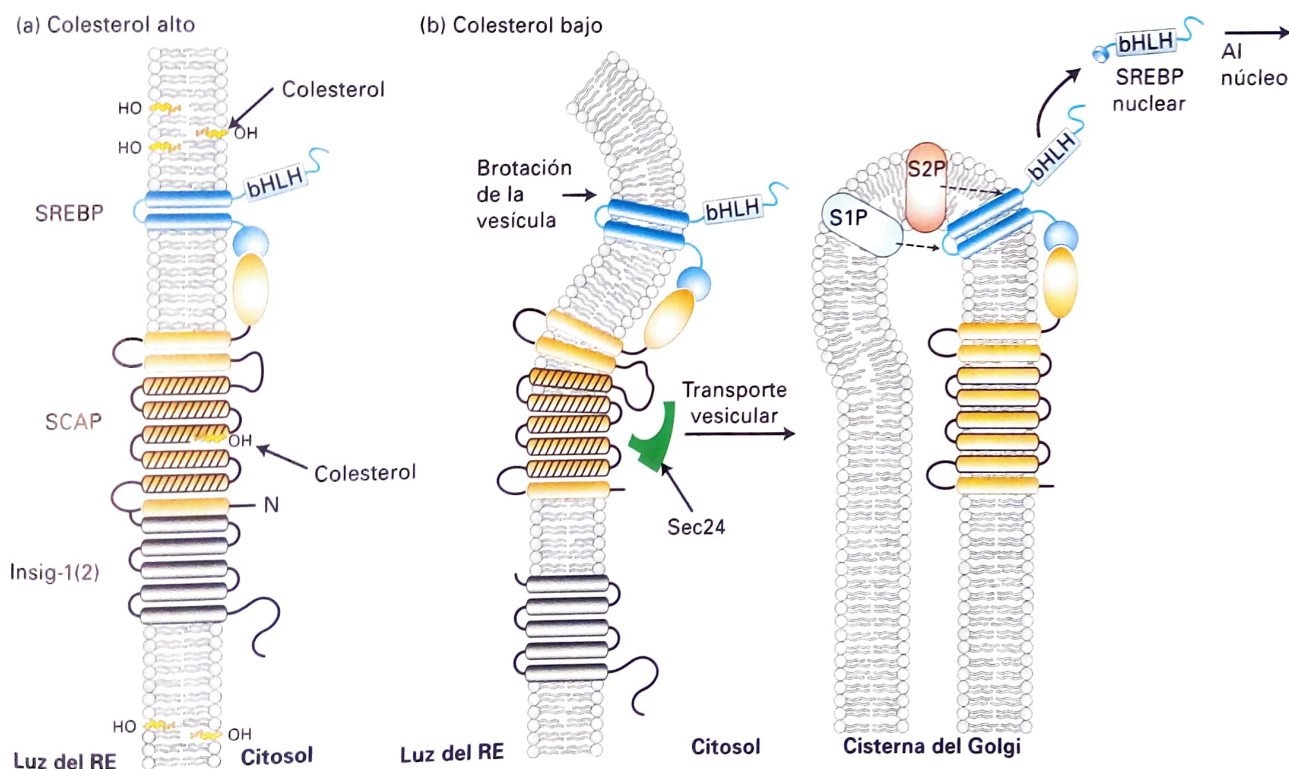


FIGURA 16-37 Control sensible al colesterol de la activación de la SREBP. El depósito intracelular de colesterol es controlado por la acción combinada de insig-1(2) y SCAP, ambas proteínas transmembrana localizadas en la membrana del RE. Las hélices que se expanden en la membrana 2-6 de SCAP (anaranjada con líneas negras) forman un dominio que une esteroides y un segmento C-terminal se une a la SREBP. (a) Cuando los niveles de colesterol son elevados, tal como cuando el colesterol del RE excede 5 por ciento de los lípidos totales del RE, este se une al dominio que detecta colesterol en el SCAP y desencadena un cambio de conformación que permite que el dominio N-terminal de SCAP se una a insig-1(2), y ancla el complejo SCAP-SREBP en la membrana del RE. (b) A bajos niveles de colesterol, este se disocia del dominio

SCAP que detecta esteroles, lo cual desencadena un cambio de conformación inverso que disocia el SCAP de insig-1(2) y capacita a SCAP para que se una a Sec24, una subunidad del complejo COPII (véase la Fig. 14-8). Esto inicia el movimiento del complejo SCAP-SREBP al complejo de Golgi por transporte vesicular. En el Golgi, la escisión secuencial de SREBP por las proteasas del sitio 1 y del sitio 2 (S1P, S2P) libera el dominio N-terminal bHLH de la SREBP. Después de que este dominio liberado, llamado SREBP nuclear (nSREBP), se transloca al núcleo, controla la transcripción de los genes que contienen elementos que regulan los esteroides (SRE) en los promotores. (Adaptado de A. Radhakrishnan, 2008, *Cell Metab.* 8:451 y M. Brown y J. Goldstein, 2009, *J. Lipid. Res.* 50:S15.)

citosólico C-terminal grande regulador. Cinco de las hélices α transmembrana de la SCAP forman un *dominio que detecta esterol* similar al presente en la HMG-CoA reductasa (Fig. 16-37a; véase la Sección 10.3). Cuando el dominio que detecta esterol de la SCAP se une al colesterol, la proteína también se une a la insig-1 (2). Cuando la insig-1 (2) está fuertemente unida al complejo SCAP-colesterol, bloquea la unión de la SCAP a la subunidad de la proteína de cubierta Sec24 de las vesículas COPII, y evita así la incorporación del complejo SCAP-SREBP a las vesículas de transporte del RE al Golgi (véase el Cap. 14). Esto ocurre cuando las concentraciones de colesterol en la membrana del RE exceden el 5% de los lípidos totales de la membrana del RE. Así, la unión dependiente de colesterol de la insig al complejo SCAP-colesterol-SREBP atrapa ese complejo en el RE.

El colesterol unido a la SCAP se libera cuando los niveles de colesterol celular caen por debajo del 5% de los lípidos del RE, un valor que refleja los niveles de colesterol celular totales. En consecuencia, la insig-1 (2) ya no se une a la SCAP libre de colesterol y el complejo SCAP-SREBP se mueve desde el RE al aparato de Golgi a través de las vesículas COPII (Fig. 16-37b). En el Golgi, la SREBP es escindida de modo secuencial en dos sitios por dos proteasas unidas a la membrana, la S1P y S2P; esta última es un ejemplo adicional de proteólisis regulada dentro de la membrana. La segunda escisión en el sitio 2 libera el dominio N-terminal que contiene bHLH al interior del citosol. Este fragmento, llamado *nSREBP* (*SREBP nuclear*), se transloca rápidamente al núcleo. Allí, activa genes de transcripción que contiene *elementos reguladores de los esteroides* (SRE) en sus promotores, como aquellos que codifican el receptor de LDL y la HMG-CoA reductasa. Así, una disminución del colesterol celular por la activación de la *vía insig-1 (2)/SCAP/SREBP* desencadena la expresión de los genes que codifican proteínas que, a la vez, importan colesterol a la célula (el receptor LDL) y sintetizan colesterol a partir de pequeñas moléculas precursoras (HMG-CoA reductasa).

Después de la escisión de la SREBP en el Golgi, en apariencia la SCAP se recicla al RE, donde puede interactuar con la insig-1 (2) y otra molécula de SREBP intacta. El alto nivel de transcripción de genes controlados por los SRE requiere la generación en curso de nuevos *nSREBP* porque se degradan bastante rápido por la vía proteasómica mediada por ubiquitina (véase el Cap. 3). La rápida generación y degradación del *nSREBP* ayuda a las células a responder velozmente a los cambios en los niveles de colesterol intracelular.

En ciertas circunstancias (p. ej., durante el crecimiento celular), las células necesitan un suministro aumentado de todos los lípidos esenciales de la membrana y de sus ácidos grasos precursores (regulación coordinada). Pero en ocasiones las células necesitan una cantidad mayor de algunos lípidos como el colesterol para sintetizar hormonas esteroideas que otros como los fosfolípidos (regulación diferencial). ¿Cómo se logra esta producción diferencial? Los mamíferos expresan tres isoformas conocidas de SREBP: la SREBP-1a, la SREBP-1c, que son generadas de RNA cortados y empalmados alternativamente, producidos a partir del mismo gen, y la SREBP-2, codificada por un gen distinto. En conjunto, estos factores de transcripción regulados por RIP controlan la expresión de proteínas que regulan la disponibilidad no solo del colesterol, sino también de los ácidos grasos, los triglicéridos y fosfolípidos sintetizados a partir de los ácidos grasos. En las células de mamífero, la SREBP-1a y la SREBP-1c ejercen una mayor influencia en el metabolismo de los ácidos grasos que sobre el metabolismo del colesterol, y lo inverso resulta cierto para la SREBP-2.



Dado que el riesgo de aterosclerosis, la causa principal de los infartos, es directamente proporcional a los niveles plasmáticos de colesterol LDL (el llamado colesterol malo) e inversamente proporcional al del colesterol HDL, un objetivo central de salud pública ha sido lograr el descenso de los niveles de colesterol LDL y elevar los de HDL. Los fármacos más exitosos para controlar el cociente LDL:HDL son las estatinas, que provocan reducciones en la LDL plasmática. Como analizamos en el Capítulo 10, estos fármacos se unen a la HMG-CoA reductasa e inhiben de modo directo su actividad; por lo tanto, reducen la biosíntesis de colesterol y de los depósitos de colesterol hepático. La activación de la SREBP en respuesta a este vaciamiento de colesterol promueve el aumento de la síntesis de la HMG-CoA reductasa y del receptor de LDL. Aquí, es de máxima importancia el número resultante aumentado de receptores hepáticos de LDL, que media la importación aumentada de colesterol LDL desde la sangre y así el descenso de nivel de colesterol LDL en la circulación. Por lo tanto, las estatinas pueden inhibir la aterosclerosis y los infartos por mecanismos independientes de su inhibición sobre la biosíntesis del colesterol, pero estos mecanismos no se comprenden bien. ■

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 16.6

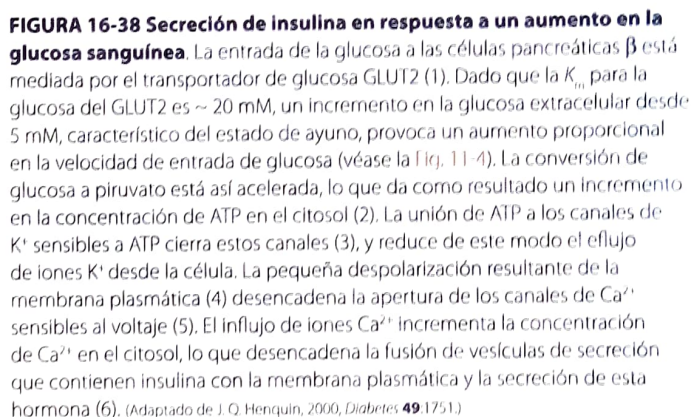
Vías de señalización controladas por la escisión proteica: Notch/Delta, SREBP

- Muchos factores de crecimiento importantes y otras proteínas de señalización, como los EGF, son sintetizados como proteínas transmembrana; la escisión regulada de los precursores cerca de la membrana plasmática por miembros de la familia de las metaloproteasas de la matriz (MMP) libera la molécula activa al espacio extracelular para emitir señales a células distantes.
- Al unirse a su ligando Delta sobre la superficie de una célula adyacente, la proteína receptora Notch sufre dos escisiones proteolíticas (véase la Fig. 16-35). Luego, el segmento citosólico Notch liberado se transloca al núcleo y modula la transcripción de los genes diana críticos en la determinación del destino celular durante el desarrollo.
- La escisión de los precursores unidos a la membrana de los miembros de la familia EGF de moléculas de señalización es catalizada por las metaloproteasas ADAM. La escisión inadecuada de estos precursores puede resultar en la proliferación celular anormal y, potencialmente, llevar al cáncer, la hipertrofia cardíaca y otras enfermedades.
- La secretasa-g, que cataliza la proteólisis intramembrana regulada de Notch, participa también en la escisión de la proteína precursora amiloide (PPA) en un péptido que forma placas características de la enfermedad de Alzheimer (véase la Fig. 16-36).
- En la vía insig-1(2)/SCAP/SREBP, el factor de transcripción activo *nSREBP* es liberado desde la membrana del Golgi por proteólisis intramembrana cuando el colesterol celular es bajo (véase la Fig. 16-37). Luego, estimula la expresión de los genes que codifican proteínas que funcionan en la biosíntesis del colesterol (p. ej., HMG-CoA reductasa) y la importación celular de colesterol (p. ej., receptor LDL). Cuando el colesterol es alto, la SREBP queda retenida en la membrana del RE y forma un complejo con insig-1(2) y SCAP.

En esta sección, consideramos el modo en que interactúan múltiples vías de transducción de las señales. Nos enfocamos no solo en un sistema de la miríada de los controlados por múltiples vías de señalización (la regulación de las necesidades del organismo por los metabolitos glucosa y ácidos grasos). En primer término, consideramos varias respuestas celulares centrales a las variaciones en la demanda del metabolito clave glucosa. Luego, nos enfocamos en el control de la producción de un tipo de célula en el organismo adulto que incrementa su masa y número casi ilimitadamente, la célula adiposa o almacenadora de grasa. Las respuestas celulares a los cambios de otros nutrientes y al oxígeno que se reflejan en gran medida en las alteraciones de la expresión génica están cubiertas en el **Capítulo 7**.

Durante la vida diaria normal, el mantenimiento de las concentraciones normales de glucosa en la sangre depende del equilibrio entre dos hormonas peptídicas, la **insulina** y el **glucagón**, que son sintetizadas en diferentes células de los islotes pancreáticos y provocan distintas respuestas celulares. La insulina, que contiene dos cadenas polipeptídicas vinculadas por puentes disulfuro, es sintetizada por las células β de los islotes (véanse las Figs. 14-23 y 14-24); el glucagón, un péptido monomérico, es producido por las células de los islotes α . La insulina *reduce* el nivel de glucosa en sangre, mientras que el glucagón *incrementa* la glucosa sanguínea. La disponibilidad de glucosa en sangre está regulada durante períodos de abundancia (después de una ingesta) o de escasez (después del ayuno), lo que ajusta las concentraciones de insulina y glucagón en la sangre.

La estimulación por insulina de las células musculares aumenta en el lapso de minutos la conversión de glucosa a glucógeno, y la PKB, activada corriente abajo del receptor de insulina, nuevamente desempeña un papel crucial. La PKB activa fosforila la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3, la misma enzima que funciona en las vías Wnt y Hh). Aunque la GSK de las células no estimuladas por insulina puede fosforilar la glucógeno sintasa e inhibir de este modo su actividad, en el músculo tratado con insulina la GSK3 fosforilada por la PKB no puede fosforilar la glucógeno sintasa; así, la activación de la PKB estimulada por insuli-



A medida que el nivel de glucosa sanguínea cae, la secreción de insulina y los niveles en sangre también lo hacen, y los receptores de insulina ya no se activan de modo tan intenso. En los músculos, la respuesta es que la GLUT4 de la superficie celular se internaliza por endocitosis y disminuye el nivel de GLUT4 de la superficie celular y, así, la importación de glucosa. Si el nivel de glucosa sanguínea cae por debajo de aproximadamente 5 mM, por ejemplo por actividad muscular repentina, la secreción de insulina reducida desde las células pancreáticas β induce a las células pancreáticas a incrementar su secreción de glucagón a la sangre. Como ocurre con el receptor de adrenalina, el receptor de glucagón, presente primariamente en

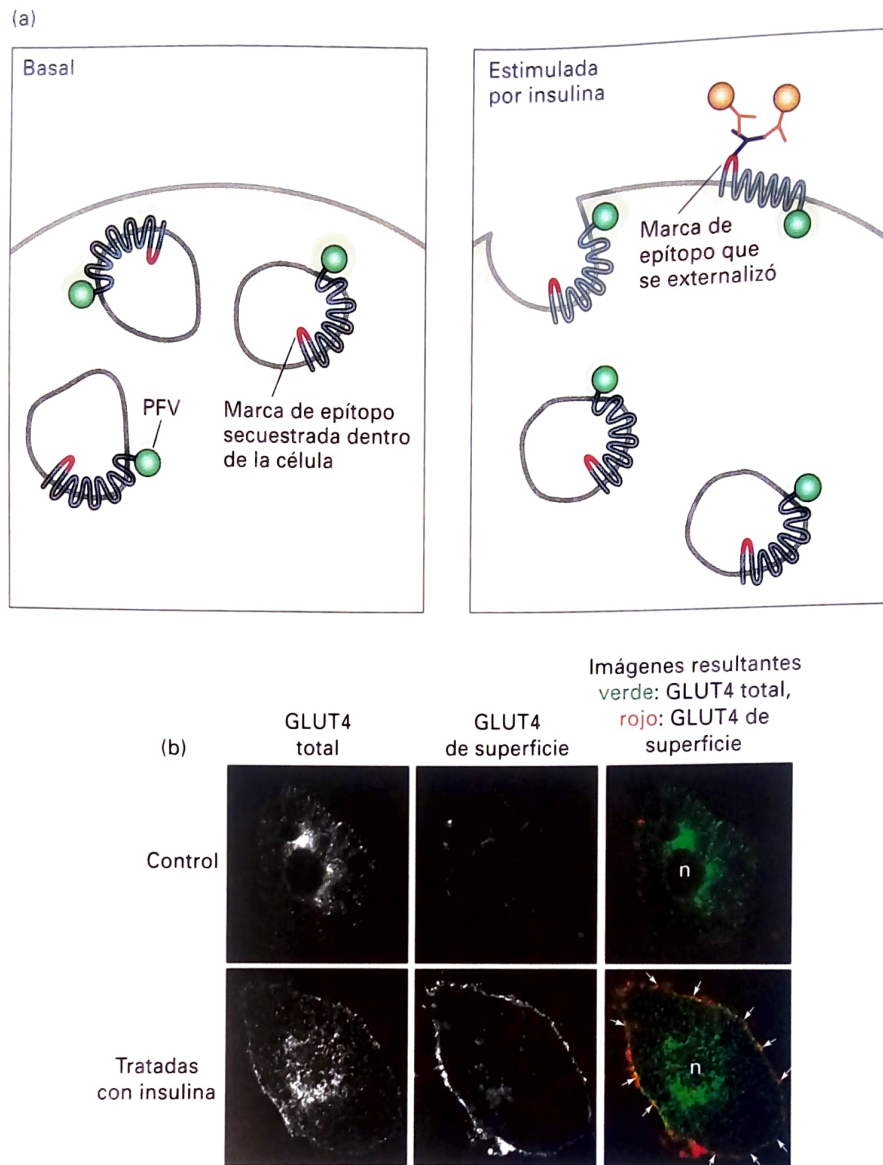


FIGURA EXPERIMENTAL 16-39 La estimulación de insulina de las células grasas induce la translocación de GLUT4 desde las vesículas intracelulares a la membrana plasmática. (a) Esquematación del experimento: células adiposas en cultivo fueron diseñadas por ingeniería genética para expresar una proteína quimérica cuyo extremo N-terminal correspondiera a la secuencia de GLUT4, seguido de la secuencia completa de la PFV; insertada en un bucle extracelular de GLUT4 entre las hélices 1 y 2 se encuentra un epítipo "myc" reconocido por un anticuerpo monoclonal antiepítipo que fluoresce en el rojo, añadido al exterior de la célula. Así, la fluorescencia verde controla la cantidad celular total de GLUT4, mientras que la roja mide solo la GLUT4 de superficie. (b) Los adipocitos cultivados que expresan esta proteína GLUT4 recombinante fueron no tratados (*arriba*)

o tratados con insulina (*abajo*), se hicieron reaccionar con un anticuerpo fluorescente rojo antiepítipo, luego se fijaron y se vieron con microscopia de fluorescencia confocal. En ausencia de insulina, virtualmente toda la GLUT4 está en las membranas intracelulares y no se encuentra conectada con la membrana plasmática; hay poca tinción superficial. La insulina desencadena la fusión de las membranas que contienen GLUT4 con la membrana plasmática, movilizandole la GLUT4 a la superficie celular y permitiéndole que transporte glucosa desde la sangre a la célula. Las células musculares también contienen transportadores de GLUT4 que responden a la insulina. Las flechas resaltan la GLUT4 presente en la membrana plasmática; N indica la posición de los núcleos. (Cortesía de J. Bogan; véase C. Yu y cols., 2007, *J. Biol. Chem.* **282**:7710.)

los hepatocitos, está acoplado a la proteína G_{as} , cuya proteína efectora es la adenilciclase. La estimulación por glucagón de las células hepáticas induce un incremento en el cAMP, lo que conduce a la activación de la proteína cinasa A, que inhibe la síntesis de glucógeno y promueve la glucogenólisis, lo cual lleva a la formación de glucosa 1-fosfato (véanse las Figs. 15-31a y 15-38b). Los hepatocitos

convierten la glucosa 1-fosfato a glucosa, que se libera a la sangre y eleva nuevamente la glucosa sanguínea a su nivel de ayuno normal.



Desafortunadamente, estos sistemas de control poderosos e intrincados en ocasiones fallan y provocan enfermedades graves que incluso ponen en peligro la vida. La *diabetes mellitus* resulta de

una deficiencia en la cantidad de insulina liberada desde el páncreas en respuesta a los niveles crecientes de glucosa en sangre (tipo I) o de una disminución en la capacidad de las células musculares y grasas de responder a la insulina (tipo II). En ambos tipos, la regulación de la glucemia es deficitaria, lo que conduce a concentraciones de glucosa sanguínea persistentemente elevadas (hiperglucemia) y otras complicaciones posibles si no se la trata. La diabetes tipo I es causada por un proceso autoinmune que destruye las células β productoras de insulina en el páncreas. También llamada diabetes insulino dependiente, esta forma de enfermedad en general responde al tratamiento con insulina. La mayoría de los estadounidenses con diabetes mellitus tienen la forma tipo II, o diabetes no insulino dependiente. Mientras que la causa subyacente de esta forma de la enfermedad no se comprende bien, la obesidad se correlaciona con un enorme incremento en la incidencia de diabetes. Se cree que la identificación adicional de las vías de señalización que controlan el metabolismo energético proporcionará mayor conocimiento acerca de la fisiopatología de la diabetes y se espera que conduzca a nuevos métodos para prevenirla y tratarla. ■

Múltiples vías de transducción de las señales interactúan para regular la diferenciación de los adipocitos a través del PPAR γ , el regulador maestro de la transcripción

Los adipocitos blancos, comúnmente llamados “células grasas”, son los principales depósitos para almacenar las grasas; los adipocitos maduros tienen unos pocos glóbulos de triglicéridos que ocupan la mayor parte de la célula. Los adipocitos son también células endocrinas y secretan varias proteínas de señalización que afectan las funciones metabólicas del músculo, el hígado y otros órganos. Los adipocitos son el único tipo celular en el organismo que puede incrementar tanto en número como en tamaño casi de modo ilimitado. Los lectores de cada país no necesitan recordar que la obesidad —la sobreabundancia de adipocitos— es un problema de salud pública creciente y un factor de riesgo central no solo para la diabetes, sino también para las enfermedades cardiovasculares como los infartos y los accidentes cerebrovasculares y cierto tipo de cánceres. Por lo tanto, se están destinando esfuerzos importantes para comprender los factores que regulan la formación de las células grasas con la esperanza de desarrollar fármacos que puedan lentificar o revertir este proceso.

Como analizaremos en el Capítulo 21, varios tipos de células madre residen en los vertebrados y se emplean para generar tipos específicos de células diferenciadas. La **célula madre mesenquimatosa** reside en la médula ósea y en otros órganos y origina células progenitoras que, a su vez, pueden formar adipocitos, células productoras de cartílago u osteoblastos formadores de hueso. El progenitor de los adipocitos, llamado preadipocito, ha perdido el potencial de diferenciarse a otros tipos celulares. Cuando se lo trata con hormonas específicas, los preadipocitos se diferencian de modo terminal; adquieren proteínas que son necesarias para el transporte y síntesis de lípidos, la respuesta a la insulina y la secreción de proteínas específicas de los adipocitos. Varias líneas de preadipocitos en cultivo pueden diferenciarse a adipocitos y expresar mRNA y proteínas específicos de estos, tales como las enzimas necesarias para la síntesis de triglicéridos.

El factor de transcripción PPAR γ , un miembro de la superfamilia de receptores nucleares, es el regulador maestro de la transcripción en

la diferenciación de los adipocitos. Como evidencia de ello, la expresión del PPAR γ recombinante en muchas líneas de fibroblastos es suficiente para desencadenar su diferenciación a adipocitos. Por el contrario, el silenciamiento (*knocking down*) del gen para PPAR γ en preadipocitos evita por completo su diferenciación a adipocitos. La mayor parte de las hormonas que promueven la adipogénesis, tales como la insulina, lo hacen al menos parcialmente activando la expresión del PPAR γ . A su vez, este se une a los promotores de la mayoría de los genes específicos de los adipocitos e induce su expresión, incluyendo a aquellos que codifican proteínas necesarias en la vía de señalización de la insulina, como el receptor de esta hormona y GLUT4. Al igual que otros miembros de la superfamilia de los receptores nucleares, tales como los receptores de hormonas esteroides (véase el Cap. 7), que se activan cuando se unen a su ligando, se piensa que el PPAR γ también se une a un ligando, probablemente un derivado oxidado de un ácido graso.

Otro factor de transcripción, el C/EBP α , es inducido durante la diferenciación de los adipocitos y también induce en forma directa muchos de sus genes. Es importante que el C/EBP α induzca la expresión del gen de PPAR γ y que este induzca la expresión del C/EBP α , ya que esto lleva a un rápido incremento de ambas proteínas durante los primeros dos días de la diferenciación. El PPAR γ , junto con el C/EBP α , induce la expresión de todos los genes requeridos para la diferenciación de los preadipocitos a células grasas maduras.

Muchas proteínas de señalización, como Wnt y TGF- β , se oponen a la acción de la insulina y evitan la diferenciación de los preadipocitos a adipocitos. Como muestra la Figura 16-40, los factores de transcripción activados por receptores para estas hormonas evitan la expresión del gen de PPAR γ , lo que bloquea en parte la capacidad del C/EBP α de inducir la expresión del gen PPAR γ . Así, múltiples señales extracelulares actúan de modo concertado para regular la adipogénesis, y las vías de transducción de la señal activadas por ellas se interceptan en la regulación de la expresión de un gen “maestro” clave que codifica PPAR γ .

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 16.7

Integración de las respuestas celulares a múltiples vías de señalización

- Un incremento en la glucosa sanguínea estimula la liberación de insulina desde las células pancreáticas β (véase la Fig. 16-38). La unión posterior de insulina a su receptor en las células musculares y los adipocitos conduce a la activación de la proteincinasa B, que promueve la captación de glucosa y la síntesis de glucógeno, lo que resulta en un descenso de la glucemia (véase la Fig. 16-39).
- Un descenso de la glucemia estimula la liberación de glucagón desde las células pancreáticas α . La unión de glucagón a su receptor acoplado a proteínas G en las células del hígado promueve la glucogenólisis por la cascada de cinasa desencadenada por cAMP (similar a la estimulación por adrenalina en condiciones de estrés) y un incremento en la glucemia (véanse las Figs. 15-31a y 15-38b).
- El PPAR γ , un miembro de la superfamilia de receptores nucleares, es el regulador transcripcional maestro de la diferenciación de los adipocitos.

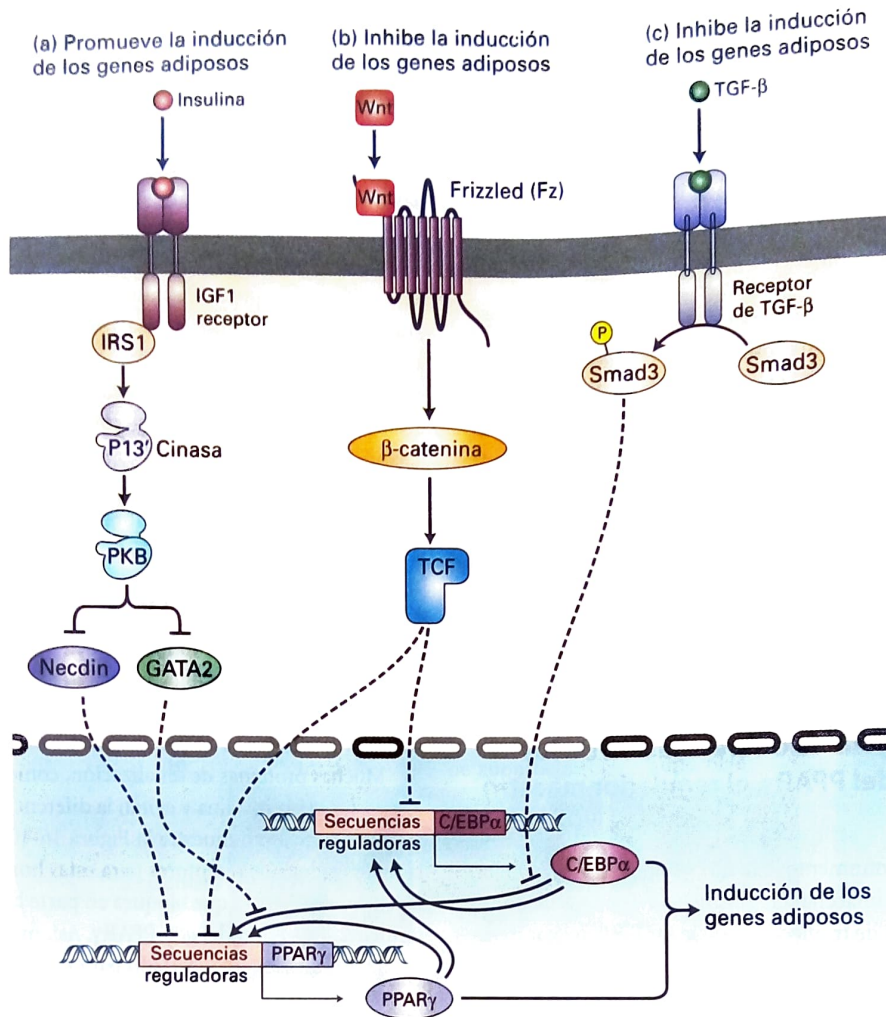


FIGURA 16-40 Múltiples vías de la transducción de las señales interactúan para regular la diferenciación de los adipocitos. El factor de transcripción PPARγ (óvalo púrpura) es el regulador maestro de la diferenciación de los adipocitos; junto con el C/EBPα, induce la expresión de todos los genes necesarios para la diferenciación de los preadipocitos a las células grasas maduras. Tanto PPARγ como C/EBPα son inducidos tempranamente en la adipogénesis; cada uno de ellos aumenta la transcripción del gen del otro (una flecha al final de una línea significa aumento de la expresión de los genes diana), lo que lleva a un rápido incremento de la expresión de ambas proteínas durante los primeros dos días de la diferenciación. Las señales provenientes de hormonas, como la insulina, y factores de crecimiento, como Wnt y TGF-β, que activan o reprimen la adipogénesis, están integradas en el núcleo por los factores de transcripción que regulan (directa o indirectamente) la expresión de los genes de PPARγ y C/EBPα. Una T al final de una línea indica inhibición de la expresión del gen diana. (a) La insulina activa la adipogénesis por varias vías que conducen a la activación de la expresión de PPARγ, dos de las cuales se muestran aquí. La

activación de la proteína cinasa B (PKB) corriente abajo del receptor IGF1 de tirosina-cinasa e IRS1 conduce a la represión de la expresión de Necdin; Necdin, por modulación de otros factores de transcripción, de otro modo reprimiría la expresión del gen PPARγ. La PKB también fosforila, y de este modo inactiva, al factor de transcripción GATA2, que cuando está desfosforilado se une a la proteína C/EBPα y evita que active la expresión del gen PPARγ. Al inhibir dos represores del gen PPARγ, la insulina estimula así la expresión de PPARγ. (b) Wnt y TGF-β inhiben la adipogénesis al reducir la expresión del gen PPARγ. La señalización de Wnt desencadena la liberación de β-catenina desde un complejo citoplasmático y la β-catenina libre une el factor de transcripción TCF (véase la Fig. 16-30). El TCF activo bloquea la expresión de los genes de PPARγ y C/EBPα probablemente uniéndose a sus secuencias reguladoras. (c) Smad3, activado por la fosforilación después de la unión de TGF-β a los receptores tipos I y II de TGF-β se une a la proteína C/EBPα y evita que active la expresión del gen PPARγ. (Tomado de E. Rosen y O. MacDougald, 2006, *Nature Rev. Mol. Cell. Biol.* 7:885)

• Las hormonas extracelulares como la insulina, que promueven la diferenciación de los adipocitos, inducen vías de transducción de las señales que llevan a la producción aumentada del PPARγ. Por el contrario, las proteínas de señalización tales como la Wnt y el TGF-β, que evitan la diferenciación de los preadipocitos, activan vías de señalización que evitan la expresión del gen PPARγ (véase la Fig. 16-40).

Perspectivas para el futuro

La confluencia de la genética, la bioquímica y la biología estructural nos ha proporcionado un panorama cada vez más detallado del modo en que las señales son transmitidas desde la superficie celular y transducidas a cambios en la conducta de las células. La multitud de diferentes señales extracelulares, receptores para ellas y vías

intracelulares de transducción de las señales caen en un número relativamente pequeño de clases y un logro central es comprender de qué manera vías de señalización similares con frecuencia regulan procesos celulares muy distintos. Por ejemplo, STAT5 activa conjuntos muy distintos de genes en las células precursoras eritroides después de la estimulación del receptor de la eritropoyetina que en las células epiteliales de las mamas después de la estimulación de la prolactina. Supuestamente, la STAT5 se une a diferentes grupos de factores de transcripción en estos y en otros tipos celulares, pero la naturaleza de estas proteínas y el modo en que colaboran para inducir patrones de expresión génica específicos de las células aún no se ha descubierto.

Por el contrario, con frecuencia la activación del mismo componente de transducción de las señales en la misma célula a través de receptores distintos genera diferentes respuestas celulares. Un punto de vista que se sostiene usualmente es que la duración de la activación de la MAP cinasa y de otras vías de señalización afecta el patrón de expresión génica. Sin embargo, el modo en que esta especificidad está determinada sigue siendo una pregunta sobresaliente en el tema de transducción de las señales. Los estudios genéticos y moleculares en moscas, gusanos y ratones contribuirán a nuestra comprensión acerca de la interrelación entre los componentes de las distintas vías y los principios reguladores subyacentes que controlan la especificidad en los organismos multicelulares.

Los investigadores han determinado las estructuras tridimensionales de varias proteínas de señalización durante los recientes años, lo que permitió análisis más detallados de varias vías de transducción de la señal. Por ejemplo, las estructuras moleculares de diferentes cinasas exhiben similitudes sorprendentes y variaciones de importancia que les imparten características de regulación novedosas. La actividad de varias cinasas, como la Raf y la proteincinasa B (PKB), está controlada por dominios inhibitorios, así como por otras múltiples fosforilaciones catalizadas por otras varias cinasas. Nuestra comprensión del modo en que la actividad de estas y otras cinasas están reguladas con precisión para satisfacer las necesidades celulares requerirá estudios adicionales estructurales y de biología celular.

Las anomalías en la transducción de las señales son la base de muchas enfermedades distintas, incluyendo la mayoría de los cánceres y diversas afecciones inflamatorias. El conocimiento detallado de las vías de señalización implicadas y de la estructura de sus componentes proteicos continuará proporcionando pistas moleculares importantes para el diseño de tratamientos específicos. A pesar de la relación estructural cercana entre diferentes moléculas de señalización (p. ej., cinasas), estudios recientes sugieren que los inhibidores selectivos para subclases específicas podrían diseñarse. En muchos tumores de origen epitelial, el receptor EGF ha sufrido una mutación específica que aumenta su actividad. Resulta notable que un fármaco consistente en una molécula pequeña (Iressa) inhiba la actividad cinasa del receptor EGF mutante pero carezca de efecto sobre el receptor EGF normal o sobre otros receptores. Así, este fármaco hace más lento el crecimiento de los cánceres solo en pacientes con esta mutación particular. De modo semejante, los anticuerpos monoclonales o los receptores decoy (proteínas solubles que contienen el dominio de unión al ligando de un receptor y, de este modo, secuestran al ligando) que evitan que las citocinas proinflamatorias como la IL-1 y el TNF- α se unan a sus receptores cognados están empleándose ahora para tratar varias enfermedades inflamatorias como la artritis.

Palabras clave

cascada de cinasa 735	proteína adaptadora 737
cilio primario 756	proteína Ras 734
citocinas 721	proteínas plataforma 744
constitutiva 749	Proteínas que unen
diabetes mellitus 767	SRE (SREBP) 763
dominio PTB (de unión a la	proteincinasa B (PKB) 746
fosfotirosina) 730	proteólisis intramembrana
dominios SH2 730	regulada (RIP) 761
eritropoyetina (Epo) 728	receptores tirosincinasas
factor de crecimiento	(RTK) 723
transformante β (TGF- β) 748	señal de localización
familia de metaloproteasa	nuclear (SLN) 749
de la matriz (MMP) 760	Smad 749
familia HER 726	vía de la cinasa PI-3 745
fosfatasa PTEN 747	vía Hedgehog (Hh) 753
fosfoinosítidos 745	vía insig-1 (2)/SCAP/SREBP 764
insulina 765	vía JAK/STAT 734
labio de activación 724	vía NF- κ B 752
MAP cinasa 735	vía Notch/Delta 760
PPAR γ 767	vía Wnt 752
presenilina 1 761	

Revisión de los conceptos

1. Nombre tres características comunes a la activación de los receptores de citocina y los receptores tirosincinasa. Nombre una diferencia respecto de la actividad enzimática de estos receptores.
2. La eritropoyetina (Epo) es una hormona producida naturalmente en el organismo en respuesta a bajos niveles de O₂ en sangre. Los eventos intracelulares que ocurren en respuesta a la unión de Epo a su receptor de la superficie celular están bien caracterizados. ¿Qué molécula se transloca desde el citosol al núcleo después de que (a) JAK2 activa STAT5 y (b) GRB2 se une al receptor de Epo? ¿Por qué algunos atletas de resistencia empleaban Epo para aumentar su desempeño ("dopaje con sangre") hasta que fue prohibido en muchos deportes?
3. Explique por qué la expresión de una mutante dominante negativa de JAK bloquea la vía de señalización de eritropoyetina (Epo)-citocina.
4. Aunque GRB2 carece de actividad enzimática intrínseca, es un componente esencial de la vía de señalización del factor de crecimiento epidérmico (EGF) que activa la MAP cinasa. ¿Cuál es la función de GRB2? ¿Qué papel juegan los dominios SH2 y SH3 en la función de la GRB2? Muchas otras proteínas de señalización poseen dominios SH2, ¿qué determina la especificidad de las interacciones SH2 con otras moléculas?
5. Una vez que una vía de señalización activada ha generado los cambios adecuados en la expresión del gen diana, la vía debe inactivarse. De otro modo, podrían resultar consecuencias patológicas, como se ejemplificó por la señalización persistente iniciada por el factor de crecimiento en muchos cánceres. Muchas vías de señalización poseen una retroalimentación negativa intrínseca mediante la cual un evento corriente abajo en una vía apaga un evento corriente arriba. Describa la retroalimentación negativa que regule en menos señales inducidas por (a) eritropoyetina y (b) TGF- β .

6. Una mutación en la proteína Ras la hace constitutivamente activa (Ras^P). ¿Qué es la activación constitutiva? ¿De qué manera la Ras constitutivamente activa promueve el cáncer? ¿Qué tipo de mutación tornaría a las siguientes proteínas constitutivamente activas: (a) Smad3, (b) MAP cinasa y (c) NF- κ B?

7. La enzima Ste11 participa en varias vías de señalización de la MAP cinasa en la levadura en brotación *S. cerevisiae*. ¿Cuál es el sustrato para Ste11 en la vía de señalización del factor de apareamiento? Cuando una levadura es estimulada por un factor de apareamiento, ¿qué evita la inducción de los osmolitos requeridos para la supervivencia en un medio de alta fuerza osmótica dado que Ste11 participa también en la vía de la MAP cinasa iniciada por alta osmolaridad?

8. Describa los eventos necesarios para la activación completa de la proteincinasa B. Nombre dos efectos de la insulina mediados por la proteincinasa B en las células musculares.

9. Describa la función de la fosfatasa PTEN en la vía de señalización de la cinasa PI-3. ¿Por qué una mutación con pérdida de la función en la PTEN es promotora del cáncer? Prediga el efecto de la PTEN constitutivamente activa en el crecimiento y supervivencia celular.

10. La unión de la TGF- β a sus receptores puede provocar una variedad de respuestas en diferentes tipos celulares. Por ejemplo, la TGF- β induce al inhibidor del activador del plasminógeno en las células epiteliales y a inmunoglobulinas específicas de las células B. En ambos tipos celulares, la Smad3 se activa. Dada la conservación de las vías de señalización, ¿qué da cuenta de la diversidad de la respuesta a TGF- β en varios tipos celulares?

11. ¿Cómo la señal generada por la unión del TGF- β a los receptores de la superficie celular se transmite al núcleo, donde ocurren los cambios en la expresión del gen diana? ¿Qué actividad del núcleo asegura que la concentración de las Smad activas refleja cercanamente el nivel de receptores TGF- β activados en la superficie celular?

12. La proteína de señalización extracelular Hedgehog puede permanecer anclada a las membranas celulares. ¿Qué modificaciones a la Hedgehog permiten que esté unida a la membrana? ¿Por qué esta propiedad es útil?

13. Explique por qué las mutaciones con pérdida de la función de *hedgehog* y *smoothened* dan el mismo fenotipo, pero la mutación *patched* con pérdida de la función da el fenotipo opuesto en las moscas.

14. La mayoría de las células de mamífero tienen un cilio inmóvil único llamado cilio primario, en el cual las proteínas motoras de los microtúbulos (que se tratan con más detalle en el Cap. 18) del transporte intraflagelar (TIF) mueven elementos de la vía de señalización Hedgehog (Hh). ¿Qué partes de la vía de señalización Hh interrumpirían las mutaciones en las proteínas motoras Kif3A y Kif7 y dineína del TIP?

15. ¿Por qué se considera que la vía de señalización que activa NF- κ B considerada es relativamente irreversible en comparación con las vías de señalización de las citocinas o los RTK? Sin embargo, la vía NF- κ B debe ser regulada en menos finalmente. ¿Cómo se apaga la vía de señalización NF- κ B?

16. Describa dos funciones para la poliubiquitinación en la vía de señalización NF- κ B.

17. ¿Qué característica de Delta asegura que solo las células vecinas reciban señales?

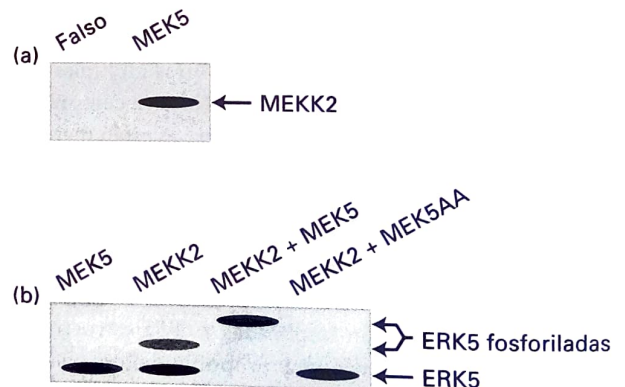
18. ¿Qué reacción bioquímica es catalizada por la secretasa- γ ? ¿Por qué se propuso que un inhibidor químico de su actividad debería ser un

fármaco útil para tratar la enfermedad de Alzheimer? ¿Qué posibles efectos secundarios de este fármaco complicarían su uso?

Análisis de los datos

1. G. Johnson y cols. han analizado la cascada de la MAP cinasa en la cual participa la MEKK2 en las células de los mamíferos. Por una detección sistemática hecha en un híbrido de dos levaduras (véase el Cap. 7), se encontró que la MEKK2 se une a MEK5, que puede fosforilar una MAP cinasa. Para dilucidar la vía de señalización transducida por la MEKK2 in vivo, se llevaron a cabo los siguientes estudios en las células embrionarias de riñón humano (HEK293) en cultivo.

a. Las células HEK293 se transfectaron con un plásmido recombinante que codificaba MEKK2 marcado junto con un plásmido que codificaba MEK5 o un vector control que no codificaba para una proteína (falso). El MEK5 recombinante se precipitó desde el extracto celular por absorción mediante un anticuerpo específico. Luego, el material inmunoprecipitado se resolvió mediante electroforesis en gel de poliacrilamida, se transfirió a una membrana y se lo examinó por Western blotting con un anticuerpo que reconocía el MEKK2 marcado. Los resultados se muestran en la parte (a) de la figura que está más abajo. ¿Qué información acerca de la cascada MAP cinasa podemos aprender acerca de este experimento? ¿Los datos de la parte (a) de la figura prueban que MEKK2 activa el MEK5 o viceversa?



b. ERK5 es una MAP cinasa que previamente mostró que se activaba cuando era fosforilada por MEK5. Cuando ERK5 se fosforila por MEK5, su migración en el gel de poliacrilamida se retarda. En otro experimento adicional, las células HEK293 fueron transfectadas con un plásmido que codificaba la ERK5 junto con los plásmidos que codificaban MEK5, MEKK2, MEKK2 y MEK5 o MEKK2 y MEK5AA. MEK5AA es una versión mutante inactiva del MEK5 que opera como dominante negativa. La expresión de MEK5AA en las células HEK293 evita la señalización a través de la MEK5 endógena activa. Los lisados de las células transfectadas se analizaron por Western blotting con un anticuerpo contra la ERK5 recombinante. A partir de los datos obtenidos en la parte (b) de la figura, ¿qué podemos concluir acerca del papel de la MEKK2 en la activación de ERK5? ¿De qué manera los datos obtenidos cuando las células se cotransfectan con ERK5, MEKK2 y MEK5AA ayudan a dilucidar el orden de las participantes de esta cascada de cinasas?

2. Las proteínas plataforma pueden segregar diferentes MAPK que señalan vías que comparten componentes en común. En la vía de apareamiento de las levaduras, las MEK (MAPKK) Ste7 fosforila y activa la Fus3 MAPK, mientras que Ste7 fosforila y activa la Kss1 MAPK en el estado de inanición. El factor de apareamiento se activa por la activación de una proteína G del receptor del factor de apareamiento; la $G_{\beta\gamma}$ recluta la proteína plataforma Ste5, y la Ste11, Ste7 y Fus3 componentes de la cascada de cinasa. La mutación de los sitios de unión de Ste5 para Ste11 y Ste7 rompe la respuesta de apareamiento, demostrando claramente la importancia de Ste5 para una unión de las cinasas. La mutación del sitio de unión de Fus3 en Ste5 dio una respuesta más complicada, lo que sugiere que Ste5-Fus3 es una interacción que puede implicar más que simplemente una fijación. Esta posibilidad fue investigada con las proteínas de las levaduras expresadas como proteínas recombinantes en las bacterias o insectos y luego purificadas (véase Good y cols., 2009, *Cell* **136**:1085-1097).

a. Un ensayo de apagamiento de la fluorescencia fue empleado para medir la actividad de las MAP cinasas Fus3 y Kss1, empleando un péptido sustrato que podía ser fosforilado por ambas cinasas. El péptido fosforilado se une a galio acoplado a cuentas fluorescentes y apaga esta

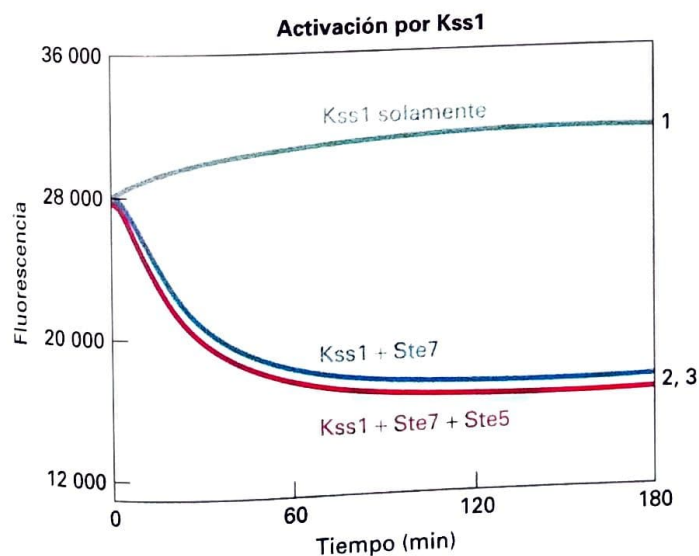
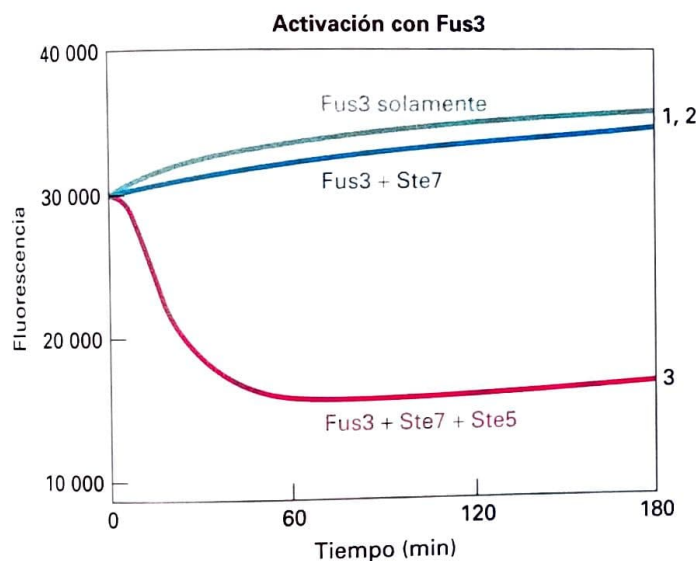
fluorescencia. La velocidad de apagamiento de la fluorescencia (pérdida de esta) corresponde a la actividad de la cinasa Kss1 o Fus3. Los resultados de la fosforilación de Ste7 y, por lo tanto, la activación de Kss1 y Fus3 en presencia y ausencia de Ste5 se muestran más abajo:

Curvas de apagamiento:

1. Fus3 o Kss1 sola (control)
2. Fus3 o Kss1 + Ste7
3. Fus3 o Kss1 + Ste7 + Ste5

¿Ste5 se necesita para la actividad de Ste7? ¿Ste7 activa la Fus3 y la Kss1 de modo equivalente? ¿Qué nos dice el efecto de la presencia o de la ausencia de Ste5 en el ensayo acerca de la fosforilación de Ste7 y de la activación de Fus3 y Kss1?

b. Las secuencias proteicas de Fus3 y Kss1 son 55% idénticas, pero cada una tiene un bucle de inserción MAPK único cerca del dominio de activación que es fosforilado por Ste7. La mutación de un residuo de isoleucina en el bucle de inserción Fus3 o el reemplazo del bucle de inserción Fus3 con la región equivalente de Kss1 dan como resultado curvas similares a la curva 2 de Kss1. ¿Qué sugiere esto acerca de la Fus3 y la Kss1 como sustratos para Ste7 y el papel de Ste5 en la estimulación de la fosforilación por Ste7 de Fus3?



Referencias

Receptores que activan las tirosincinasas proteicas

Brewer, M., 2009. The juxtamembrane region of the EGF receptor functions as an activation domain. *Mol. Cell* **34**:641-651.

Goh, K., et al. 2010. Multiple mechanisms collectively regulate clathrin-mediated endocytosis of the epidermal growth factor receptor. *J. Cell Biol.* **189**:871-883.

Jura, N., et al. 2009. Mechanism for activation of the EGF receptor catalytic domain by the juxtamembrane segment. *Cell* **137**:1293-1307.

Lazzara, M. J., and D. A. Lauffenburger. 2009. Quantitative modeling perspectives on the ErbB system of cell regulatory processes. *Exp. Cell Res.* **315**:717-725.

Lemmon, M. A., and J. Schlessinger. 2010. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* **141**:1117-1134.

Lodish, H. F., et al. 2009. *Intracellular Signaling by the Erythropoietin Receptor in Erythropoiesis and Erythropoietins*, 2d ed. G. Molineux, M. A. Foote, and S. G. Elliott, eds. Birkhauser, pp. 155-174.

Pfeifer, A. C., J. Timmer, and U. Klingmuller. 2008. Systems biology of JAK/STAT signalling. *Essays Biochem.* **45**:109-120.

Schindler, C, D. E. Levy, and T. Decker. 2007. JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *J. Biol. Chem.* **282**:20059-20063.

Wiley, H. S., S. Y. Shvartsman, and D. A. Lauffenburger. 2003. Computational modeling of the EGF-receptor system: a paradigm for systems biology. *Trends Cell Biol.* **13**:43-50.

La vía de la Ras/MAP cinasa

Chen, R., and J. Thorner. 2007. Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **1773**:1311-1340.

Chong, H., J. Lee, and K-L Guan. 2001. Positive and negative regulation of Raf kinase activity and function by phosphorylation. *EMBO J.* **20**:3716-3727.

- Delpire, E. 2009. The mammalian family of sterile 20p-like protein kinases. *Pflugers Arch.—Eur. J. Physiol.* **458**:953-967.
- Gastel, M. 2006. MAPKAP kinases—MKs—two's company, three's a crowd. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **7**:211-224.
- Nadal, E., and F. Posas. 2010. Multilayered control of gene expression by stress-activated protein kinases. *EMBO J.* **29**:4-13.
- Schwartz, M. A., and H. Madhani. 2004. Principles of MAP kinase signaling specificity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann. Rev. Genet.* **38**:725-748.
- Wiley, H. S., S. Y. Shvartsman, and D. A. Lauffenburger. 2003. Computational modeling of the EGF-receptor system: a paradigm for systems biology. *Trends Cell Biol.* **13**:43-50.

Las vías de señalización de los fosfoinosítidos

- Engelman, J. A., J. Luo, and L. C. Cantley. 2006. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat. Rev. Genet.* **7**:606-619.
- Fayard, E., et al. 2010. Protein kinase B (PKB/Akt), a key mediator of the PI3K signaling pathway. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **346**:31-56.
- Manning, B. D., and L. C. Cantley. 2007. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129**:1261-1274.
- Michell, R. H., et al. 2006. Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate: metabolism and cellular functions. *Trends Biochem. Sci.* **31**:52-63.
- Niggli, V. 2005. Regulation of protein activities by phosphoinositide phosphates. *Ann. Rev. Cell Devel. Biol.* **21**:57-79.
- Vogt, P. K., et al. 2010. Phosphatidylinositol 3-kinase: the oncoprotein. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **347**:79-104.

Las serina-cinasas receptoras que activan Smad

- Clarke, D., and X. Liu. 2008. Decoding the quantitative nature of TGF- β /Smad signalling. *Trends Cell Biol.* **18**:430-442.
- Deheuninck, J., and K. Luo. 2009. Ski and SnoN, potent negative regulators of TGF- β signalling. *Cell Res.* **19**:47-57.
- Moustakas, A., and C.-H. Heldin. 2009. The regulation of TGF β signal transduction. *Development* **136**:3699-3714.

Vías de señalización controladas por ubiquitinación: Wnt, Hedgehog y NF- κ B

- Bianchi, K., and P. Meier. 2010. A tangled web of ubiquitin chains: breaking news in TNF-R1 signaling. *Mol. Cell* **36**:736-742.
- Goetz, S., and K. Anderson. 2010. The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development. *Nature Rev. Genet.* **11**:331-344.

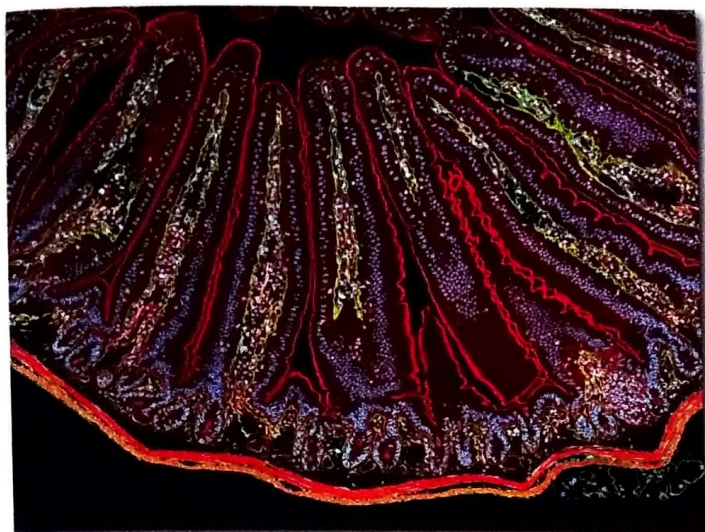
- Hayden, M., and S. Ghosh. 2008. Shared principles in NF- κ B signaling. *Cell* **132**:344-362.
- Iwai, K., and F. Tokunaga. 2009. Linear polyubiquitination: a new regulator of NF- κ B activation. *EMBO Reports* **10**:706-713.
- Skaug, B., X. Jiang, and Z. Chen. 2009. The role of ubiquitin in NF- κ B regulatory pathways. *Ann. Rev. Biochem.* **78**:769-796.
- Van Amerongen, R., and R. Nusse. 2009. Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development* **136**:3205-3214.
- Verheyen, E., and C. Gottardi. 2010. Regulation of Wnt/ β -catenin signaling by protein kinases. *Dev. Dyn.* **239**:34-44.
- Wan, F., and M. Lenardo. 2010. The nuclear signaling of NF- κ B: current knowledge, new insights, and future perspectives. *Cell Res.* **20**:24-33.
- Wu, D., and W. Pan. 2009. GSK3: a multifaceted kinase in Wnt signaling. *Trends Biochem. Sci.* **35**:161-168.

Vías de señalización controladas por la escisión proteica: Notch/Delta, SREBP

- Blobel, C. G., G. Carpenter, and M. Freeman. 2009. The role of protease activity in ErbB biology. *Exp. Cell Res.* **315**:671-682.
- Brown, M. S., and J. L. Goldstein. 2009. Cholesterol feedback: from Schoenheimer's bottle to Scap's MELADL. *J. Lipid Res.* **50**:S15-S27.
- De Strooper, B. 2005. Nicastrin: gatekeeper of the γ -secretase complex. *Cell* **122**:318-320.
- Goldstein, J., R. DeBose-Boyd, and M. Brown. 2006. Protein sensors for membrane sterols. *Cell* **124**:35-46.
- He, G., et al. 2010. Gamma-secretase activating protein is a therapeutic target for Alzheimer's disease. *Nature* **467**:95-98.
- Seals, D., and S. A. Courtneidge. 2003. The ADAMs family of metalloproteases: multidomain proteins with multiple functions. *Genes Dev.* **17**:7-30.

Integración de las respuestas celulares a múltiples vías de señalización

- Bogan, J., and K. Kandror. 2010. Biogenesis and regulation of insulin-responsive vesicles containing GLUT4. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**:506-512.
- Boura-Halfon, S., and Y. Zick. 2008. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **296**:E581-E591.
- Rosen, E., and O. MacDougald. 2006. Adipocyte differentiation from the inside out. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **7**:885-896.
- Wang, Z., and D. Thurmond. 2009. Mechanisms of biphasic insulin-granule exocytosis—roles of the cytoskeleton, small GTPases and SNARE proteins. *J. Cell Sci.* **122**:893-903.



Corte de intestino de ratón teñido para actina (rojo), la proteína de la matriz extracelular laminina (verde) y DNA (azul). Cada punto azul de DNA indica la presencia de una célula. La actina de las microvellosidades del extremo apical de las células epiteliales puede verse cubriendo la superficie que enfrenta la luz (*parte superior*). La actina puede verse también de modo prominente en el músculo liso que rodea al intestino (*parte inferior*). (Fotomicrografía cortesía de Thomas Deerinck y Mark Ellisman.)

Organización y movimiento celular I: microfilamentos

Cuando miramos a través de un microscopio la maravillosa diversidad de células de la naturaleza, la variedad de formas y movimientos celulares que podemos discernir es asombrosa. En primera instancia, podemos notar que algunas células, como los espermatozoides de los vertebrados, los ciliados como *Tetrahymena* o los flagelados como *Chlamydomonas*, nadan rápidamente, impulsados por cilios y flagelos. Otras células, como las amebas y los macrófagos humanos, se mueven más suavemente, impulsadas no por apéndices externos sino por el movimiento coordinado de la propia célula. También podemos notar que algunas células en los tejidos se unen entre sí formando una lámina pavimentosa, mientras que otras —por ejemplo, las neuronas— tienen prolongaciones largas, de hasta unos 90 cm de longitud y establecen contactos selectivos entre ellas. Al mirar más de cerca la organización interna de las células, vemos que los orgánulos tienen localizaciones características; por ejemplo, el aparato de Golgi generalmente se encuentra cerca del núcleo central. ¿De qué modo se logra esta diversidad de forma, organización celular y movilidad? ¿Por qué es importante que las células tengan una forma característica y una organización interna clara? Consideremos en primer término dos ejemplos de células con funciones y organizaciones muy distintas.

Las células epiteliales que recubren el intestino forman una capa pavimentosa apretada de células con forma de ladrillo, conocidas como epitelio (Fig. 17-1a, b). Su función es importar nutrientes (como la glucosa) desde la luz del intestino a través de la membrana plasmática apical (superior) y exportarlos a través de la membrana plasmática basolateral (inferior y de lado) hacia el torrente sanguíneo. Para llevar a cabo este transporte direccional, las membranas plasmáticas apical y basolateral de las células epiteliales deben tener diferentes composiciones proteicas. Las células epiteliales están unidas y selladas entre sí por uniones celulares (analizadas en el Cap. 20), que crean una barrera física entre los dominios apical y basolateral de la membrana. Esta separación permite que la célula ubique las proteínas de transporte correctas en las membranas plasmáticas de ambas superficies. Además, la membrana apical tiene una morfología única, con numerosas proyecciones con forma de dedos llamadas **microvellosidades** que incrementan el área de la membrana plasmática disponible para la absorción de nutrientes. Para lograr esta organización, las células epiteliales deben tener una estructura interna que les dé forma y entregue las proteínas apropiadas a la superficie correcta de la membrana.

CONTENIDO

17.1	Microfilamentos y estructuras de actina	776	17.5	Las miosinas: proteínas motoras basadas en actina	793
17.2	Dinámica de los filamentos de actina	779	17.6	Movimientos impulsados por la miosina	801
17.3	Mecanismos de ensamblaje de los filamentos de actina	784	17.7	Migración celular: mecanismo, señalización y quimiotaxis	808
17.4	Organización de las estructuras celulares basadas en actina	790			

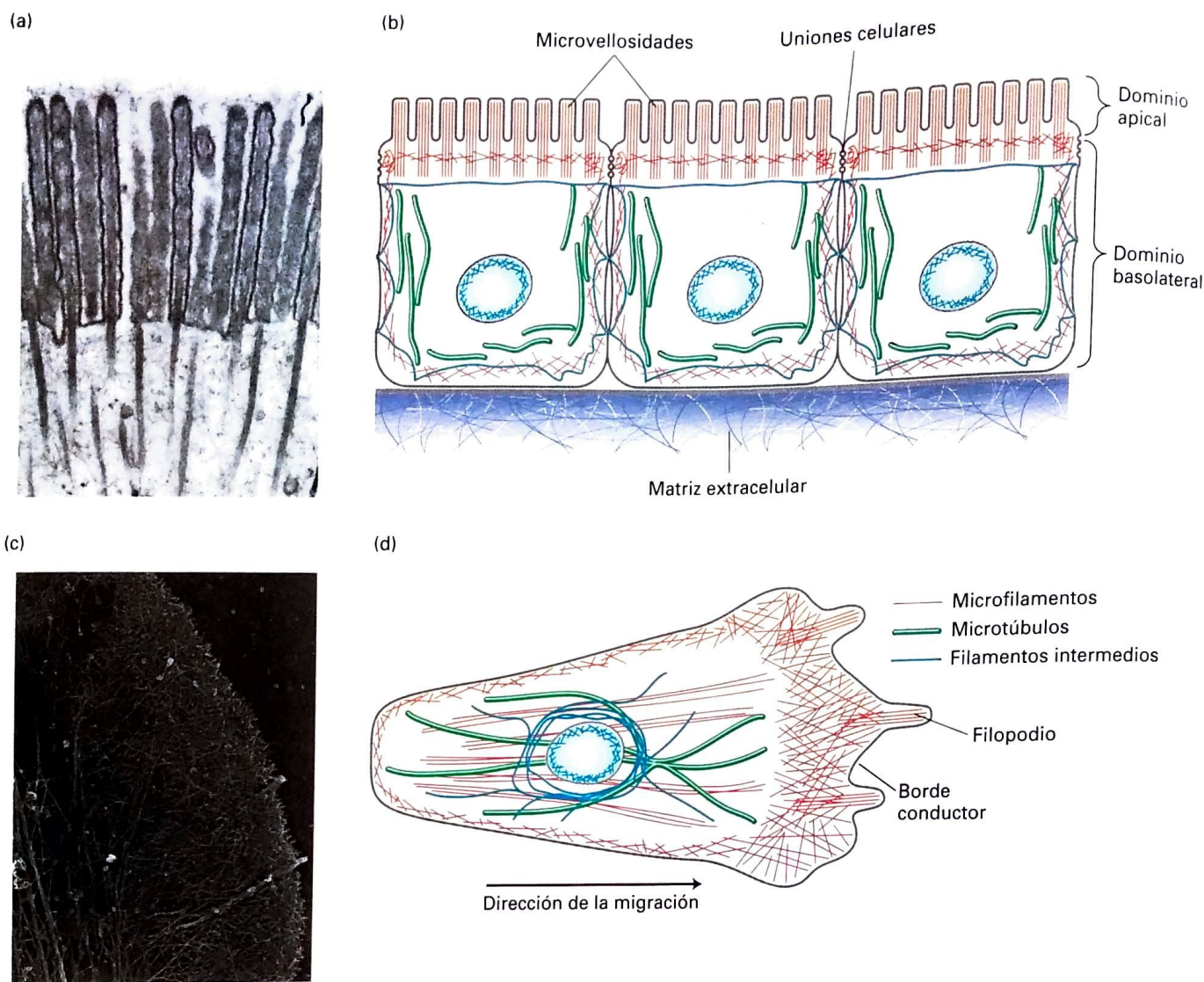


FIGURA 17-1 Panorama general de los citoesqueletos de una célula epitelial y una célula en migración. (a) Fotomicrografía electrónica de transmisión de un corte fino de una célula epitelial del intestino delgado que muestra los componentes del citoesqueleto de las microvellosidades. (b) Las células epiteliales están muy polarizadas, con dominios apical y basolateral distintos. Una célula epitelial del intestino transporta nutrientes a su interior a través del dominio apical y hacia el exterior a través del dominio basolateral. (c) Fotomicrografía electrónica de transmisión de parte del borde conductor de una célula en migración. La célula fue tratada con un detergente suave para disolver las membranas, lo que también permite la solubilización de la

mayoría de los componentes del citoplasma. El citoesqueleto remanente fue sombreado con platino y visto al microscopio electrónico. Nótese la red de filamentos de actina visible en esta fotomicrografía. (d) Una célula en migración, como un fibroblasto o un macrófago, tiene dominios morfológicamente distintos, con un borde conductor en el frente. Los microfilamentos se indican en rojo, los microtúbulos en verde y los filamentos intermedios en azul oscuro. La posición del núcleo (azul claro oval) se muestra también. (Parte [a] cortesía de Mark Mooseker; parte [c] de T. M. Svitkina y cols., 1999, *J. Cell Biol.* 145 1009, cortesía de Tatyana Svitkina.)

Consideramos ahora a los macrófagos, un tipo de glóbulo blanco que sale a la búsqueda de los agentes infecciosos y los destruye por un proceso de englobamiento llamado fagocitosis. Las bacterias liberan sustancias químicas que atraen al macrófago y lo guían hacia la infección. A medida que el macrófago sigue el gradiente químico, retorciéndose y girando para obtener las bacterias y fagocitarlas, debe reorganizar constantemente su maquinaria de locomoción celular. Como veremos, la maquinaria móvil interna de los macrófagos y otras células que se arrastran siempre está orientada hacia la dirección hacia la cual se desplazan (Fig. 17-1c, d).

Éstos son solamente dos ejemplos de **polaridad celular**—la capacidad de las células de generar regiones funcionalmente distintas—. De hecho,

cuando uno piensa acerca de todos los tipos de células, se da cuenta de que la mayoría tiene alguna forma de polaridad celular. Un ejemplo adicional y fundamental de polaridad celular es la capacidad de las células de dividirse: primero deben elegir un eje para la división celular y luego establecer la maquinaria para segregar sus orgánulos a lo largo de ese eje.

La forma, la organización interna y la polaridad funcional de una célula están provistas por una red proteica filamentosa tridimensional llamada **citoesqueleto**. El citoesqueleto puede ser aislado y visualizado después de tratar las células con detergentes suaves que solubilizan la membrana plasmática y los orgánulos internos, lo que libera la mayor parte del citoplasma (Fig. 17-1c). El citoesqueleto se extiende a lo largo de toda la célula y está unido a la membrana plasmática y los orgánulos

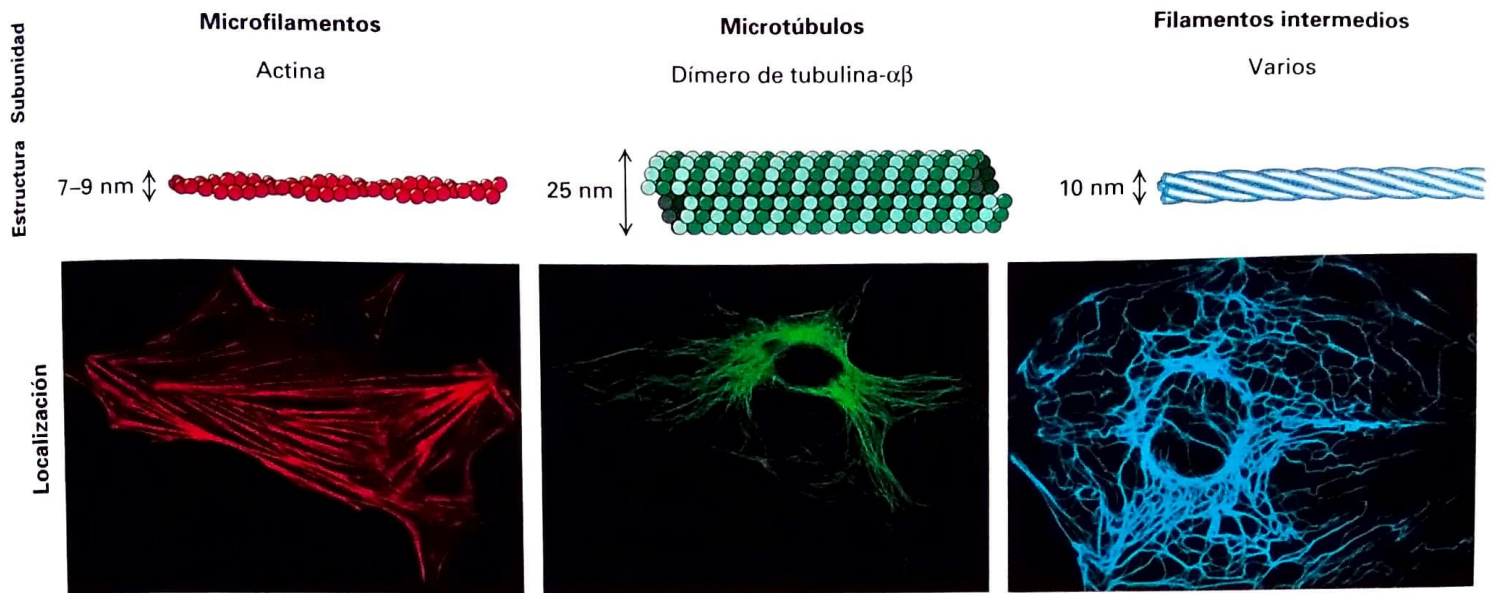


FIGURA 17-2 Los componentes del citoesqueleto. Cada tipo de filamento se ensambla a partir de subunidades específicas en un proceso reversible, de modo tal que las células pueden ensamblar y desensamblar filamentos según sus necesidades. Los paneles inferiores muestran la localización de los tres

sistemas de filamentos en las células en cultivo, como se ven en microscopía de inmunofluorescencia para actina, tubulina y una proteína de los filamentos intermedios respectivamente. (Actina y tubulina cortesía de D. Garbett y A. Bretscher; filamentos intermedios Copyright Molecular Expressions, Nikon & FSU)

internos, proporcionando así un armazón para la organización celular. El término *citoesqueleto* puede implicar una estructura fija como un esqueleto óseo. De hecho, el citoesqueleto puede ser muy dinámico, con componentes capaces de reorganizarse en menos de un minuto, o puede ser bastante estable durante horas. Como resultado, las longitudes y dinámicas de los filamentos pueden variar ampliamente, los filamentos pueden ensamblarse en diferentes tipos de estructuras y pueden estar localmente regulados en la célula.

El citoesqueleto está compuesto por tres sistemas de filamentos principales, que se muestran en la Figura 17-1b, d, como también en la Figura 17-2, todos los cuales están organizados y regulados en tiempo y espacio. Cada sistema de filamentos está compuesto por un polímero de subunidades ensambladas. Las subunidades que constituyen los filamentos sufren un ensamblaje y desensamblaje regulado, lo que da a la célula la flexibilidad de ensamblar y desensamblar diferentes estructuras según sea necesario.

- Los **microfilamentos** son polímeros de la proteína *actina* organizados en haces funcionales y redes mediante proteínas que unen actina. Los microfilamentos son de especial importancia en la organización de la membrana plasmática, y dan forma a estructuras superficiales como las microvellosidades. Los microfilamentos pueden funcionar por sí mismos o servir como senderos para **proteínas motoras** como la miosina impulsada por ATP, que sirve a una función contráctil (como en el músculo) o como transportadores de carga a lo largo de los microfilamentos.

- Los **microtúbulos** son tubos largos formados por la proteína *tubulina* y organizados por proteínas asociadas con los microtúbulos. Con frecuencia se extienden a lo largo de toda la célula y proveen un armazón para la organización de para orgánulos asociados y para el sostén estructural de los cilios y los flagelos. También constituyen la estructura del huso mitótico, la maquinaria empleada para separar los cromosomas duplicados durante la mitosis. Los motores moleculares llamados kinesinas y

dineínas transportan carga a lo largo de los microtúbulos y, al igual que la miosina, también son impulsados por la hidrólisis de ATP.

- Los **filamentos intermedios** son estructuras filamentosas específicas de los tejidos que cumplen con una diversidad de funciones, que incluyen el prestar soporte estructural a la membrana nuclear, proporcionar integridad estructural a las células y los tejidos y cumplir con funciones estructurales y de barrera en la piel, el pelo y las uñas. A diferencia de la situación para los microfilamentos y los microtúbulos, no hay motores que empleen a estos filamentos intermedios como vías.

Como podemos ver en la Figura 17-1, las células pueden construir conformaciones muy distintas de sus citoesqueletos. Para establecer estas conformaciones las células deben registrar señales —ya sea a partir de factores solubles que bañan a la célula, provenientes de células adyacentes o de la matriz extracelular— e interpretarlos (Fig. 17-3). Estas señales son detectadas por receptores de la superficie celular que activan vías de transducción de la señal que finalmente convergen en factores que regulan la organización del citoesqueleto.

La importancia del citoesqueleto para el funcionamiento normal de la célula y su movilidad es evidente cuando un defecto en un componente del citoesqueleto —o en la regulación de éste— provoca una enfermedad. Por ejemplo, aproximadamente 1 de cada 500 personas tiene un defecto que afecta al aparato contráctil del corazón, lo cual da como resultado miocardiopatías de diferente grado de gravedad. Muchas enfermedades de los glóbulos rojos afectan a los componentes del citoesqueleto que sostienen la membrana plasmática de estas células. Las células cancerosas metastásicas muestran una movilidad no regulada debida a la regulación defectuosa del citoesqueleto, por lo que se separan de su tejido de origen y migran a nuevas ubicaciones para formar nuevas colonias de crecimiento descontrolado.

En este capítulo y en el siguiente analizaremos la estructura, la función y la regulación del citoesqueleto. Veremos de qué manera una cé-

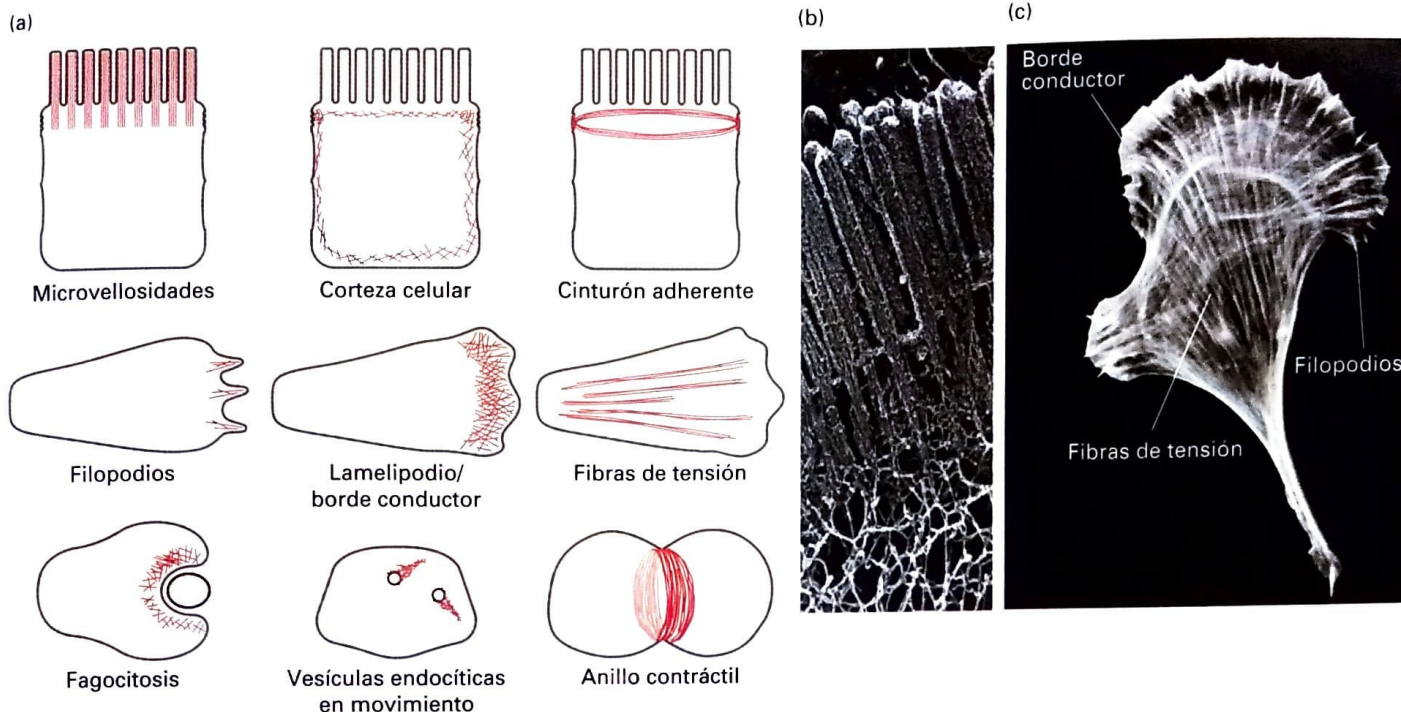


FIGURA 17-4 Ejemplos de estructuras basadas en los microfilamentos. (a) En cada panel, los microfilamentos se muestran en rojo. (b) Fotomicrografía electrónica de barrido de la región apical de una célula epitelial polarizada, que muestra los haces de los filamentos de actina que constituyen los núcleos de las microvellosidades. (c) Una célula que se mueve hacia la parte superior de la

en la síntesis de la pared celular bacteriana. Algunos de los eucariontes unicelulares, como las levaduras y las amebas, tienen uno o dos genes ancestrales de actina, mientras que los organismos multicelulares con frecuencia contienen múltiples genes de actina. Por ejemplo, los seres humanos tienen 6 genes de actina, y algunas plantas tienen más de 60 (aunque la mayoría son pseudogenes, que no codifican proteínas de actina funcionales). Cada gen de actina funcional codifica una isoforma distinta de la proteína. Las isoformas de actina pueden clasificarse en tres grupos: las actinas α , las actinas β y las actinas γ . En los vertebrados hay cuatro isoformas de actina presentes en tipos específicos de células musculares y dos isoformas en las células no musculares. Estas 6 isoformas difieren en solo aproximadamente 25 de los 375 residuos de la proteína completa o muestran una identidad de aproximadamente 93%. Aunque estas diferencias pueden parecer menores, las tres isoformas de actina tienen funciones distintas: la actina α está asociada con estructuras contráctiles, la actina γ da cuenta de los filamentos en las fibras de tensión y la actina β está enriquecida en toda la corteza celular y el borde conductor de las células móviles.

Los monómeros de G-actina se ensamblan en polímeros largos, helicoidales, de F-actina

La actina existe en forma de monómero globular llamado **G-actina** y como un polímero filamentoso llamado **F-actina**, que es una cadena lineal de subunidades de G-actina. Cada molécula de actina contiene un ion Mg^{2+} que forma un complejo con ATP o ADP. La importancia de la conversión entre las formas de ATP y ADP de la actina se analiza más adelante.

El análisis cristalográfico de rayos X revela que el monómero de G-actina está separado en dos lóbulos por un surco profundo (Fig. 17-5a). En la base del surco se encuentra el *pliegue de ATPasa*, el sitio en el que el ATP y el Mg^{2+} se encuentran unidos. El piso del surco actúa como una bisagra que permite que los lóbulos se flexionen entre sí. Cuando el ATP o el ADP se unen a la G-actina, el nucleótido afecta la conformación de la molécula; de hecho, sin un nucleótido unido, la G-actina se desnaturaliza muy rápidamente. La adición de los cationes $-Mg^{2+}$, K^+ o Na^+ a una solución de G-actina induce la polimerización de G-actina a filamentos de F-actina. El proceso es reversible: la F-actina se despolimeriza en G-actina cuando la fuerza iónica de la solución baja. Los filamentos de F-actina que se forman *in vitro* son indistinguibles de los que se ven en las células, lo que indica que la F-actina es un componente principal de los microfilamentos.

A partir de los resultados de los estudios de difracción de los rayos X de los filamentos de actina y la estructura del monómero de actina que se muestra en la Figura 17-5a, los científicos han determinado que las subunidades de un filamento de actina están dispuestas en una estructura helicoidal (Fig. 17-5b). En esta configuración, los filamentos pueden considerarse como dos hebras helicoidales enrolladas una alrededor de la otra. Cada subunidad en la estructura contacta con una subunidad por encima y con una por debajo en una hebra y las dos en la otra. Las subunidades de una hebra simple se enrollarán alrededor de la otra hebra y repetirán después de 72 nm o 14 subunidades de actina. Dado que hay dos hebras, el filamento de actina parece repetirse cada 36 nm (véase Fig. 17-5b). Cuando la F-actina se tiñe negativamente con acetato de uranilo para microscopía electrónica, aparece como una cinta retorcida cuyo diámetro varía entre 7 y 9 nm (Fig. 17-5c).

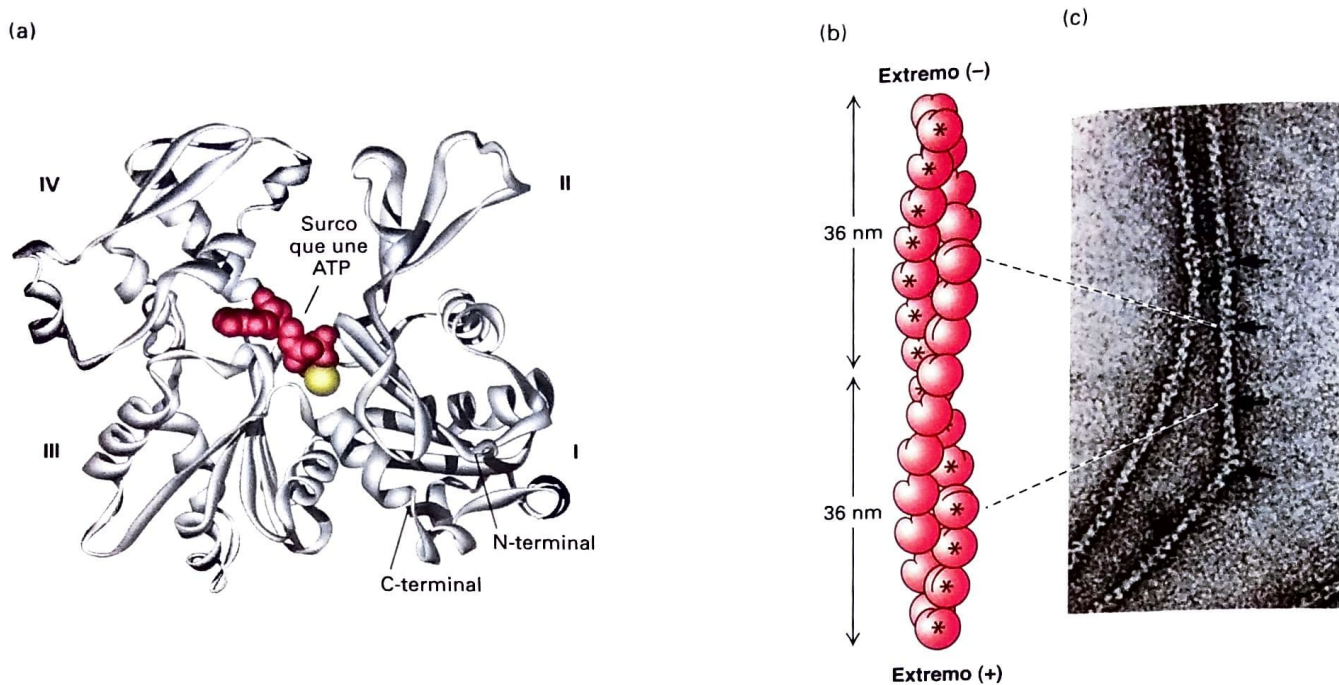


FIGURA 17-5 Estructuras de los filamentos monoméricos de G-actina y F-actina. (a) Modelo de monómero de actina (que mide $5,5 \times 5,5 \times 3,5$ nm) y muestra que está dividida por un surco central en dos lóbulos de aproximadamente el mismo tamaño y cuatro subdominios numerados de I a IV. El ATP (rojo) se une a la parte inferior del surco y contacta ambos lóbulos (la esfera amarilla representa al Mg^{2+}). Los extremos N-terminal y C-terminal se encuentran en el subdominio I. (b) Un filamento de actina aparece como dos hebras de subunidades. Una unidad repetida consiste en 28 subunidades (14 en cada hebra indicado por un * para cada hebra), que cubre una distancia de 72 nm. El surco que une ATP de cada subunidad de actina está orientado hacia

el mismo extremo del filamento. El extremo de un filamento con un surco de unión expuesto es el extremo (-); el extremo opuesto es el extremo (+). (c) Al microscopio electrónico, los filamentos de actina teñidos negativamente aparecen como hebras largas, flexibles y retorcidas de subunidades con forma de cuentas. A raíz de este giro, el filamento aparece alternativamente más delgado (7 nm de diámetro) y más grueso (9 nm de diámetro) (flechas). (Los microfilamentos vistos en una célula por microscopia electrónica son los de F-actina más cualquier proteína unida.) (Parte [a] adaptada de C. E. Schutt y cols., 1983, *Nature* 365:810, cortesía de M. Rozycki. Parte [c] cortesía de R. Craig.)

La F-actina tiene polaridad estructural y funcional

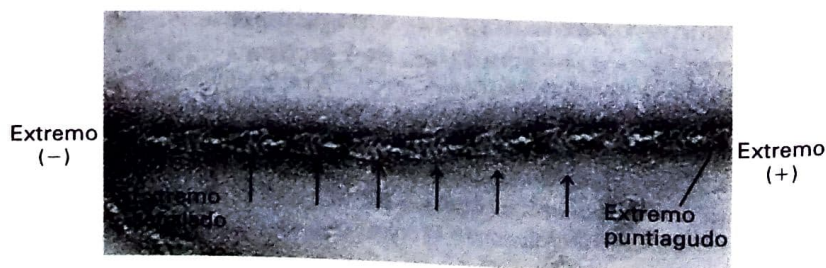
Todas las subunidades de un filamento de actina están orientadas del mismo modo. En consecuencia, un filamento muestra polaridad; es decir, un extremo es distinto del otro. Como veremos, un extremo del filamento se ve favorecido por la adición de subunidades de actina y se designa como extremo (+), mientras que el otro extremo se ve favorecido por la disociación de subunidades y es designado como extremo (-). En el extremo (+), el surco que une ATP de la subunidad de actina terminal contacta con la subunidad vecina, mientras que en el extremo (-), el surco está expuesto a la solución que lo rodea (véase Fig. 17-5b).

Sin la resolución atómica que provee la cristalografía de rayos X, el surco en una subunidad de actina y, por lo tanto, la polaridad de

un filamento, no resulta detectable. Sin embargo, la polaridad de los filamentos de actina puede demostrarse mediante microscopia electrónica en experimentos de “decoración” que explotan la capacidad de la proteína motora miosina de unirse específicamente a los filamentos de actina. En este tipo de experimento, un exceso de miosina S1, el dominio con la cabeza que une actina perteneciente a miosina, se mezcla con filamentos de actina y se permite que ocurra la unión. La miosina se une a los lados de un filamento con una ligera inclinación. Cuando todas las subunidades de actina han sido unidas por miosina, el filamento tiene un aspecto “decorado” con puntas de flecha que señalan todas hacia un extremo del filamento (Fig. 17-6).

La capacidad de la cabeza S1 de la miosina de unirse y cubrir a la F-actina es muy útil experimentalmente —ha permitido que los inves-

FIGURA EXPERIMENTAL 17-6 La decoración con miosina S1 demuestra la polaridad de un filamento de actina. Los dominios de la cabeza S1 de la miosina se unen a las subunidades de actina en una orientación particular. Cuando se unen a todas las subunidades de un filamento, S1 parece formar una espiral alrededor de éste. Esta cobertura de las cabezas de miosina produce una serie de decoraciones con forma de punta de flecha (flechas) que se ven con mayor facilidad en las vistas amplias del filamento. La polaridad en la decoración define un extremo puntiagudo (-) y un extremo con púas (+). (Cortesía de R. Craig.)



tigadores identifiquen la polaridad de los filamentos de actina tanto in vitro como en las células—. Las puntas de flecha señalan hacia el extremo (-) y, por lo tanto, este extremo con frecuencia se llama el extremo “señalado” de un filamento de actina; el extremo (+) se conoce como el extremo “punzante”. Dado que la miosina se une a los filamentos de actina y no a los microtúbulos o a los filamentos intermedios, la decoración con puntas de flecha es un criterio mediante el cual los filamentos de actina pueden ser identificados definitivamente entre otras fibras del citoesqueleto en las fotomicrografías electrónicas de las células.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 17.1

Microfilamentos y estructuras de actina

- Los microfilamentos pueden ensamblarse en diversas estructuras, muchas asociadas con la membrana plasmática (véase Fig. 17-4a).
- La actina, el bloque estructural básico de los microfilamentos, es una proteína principal en las células eucariontes y está altamente conservada.
- La actina puede ensamblarse de modo reversible en filamentos que consisten en dos hélices de subunidades de actina.
- Todas las subunidades de actina de un filamento están orientadas en la misma dirección, con el sitio de unión al nucleótido expuesto en el extremo (-) (véase Fig. 17-5).

17.2 Dinámica de los filamentos de actina

El citoesqueleto de actina no es una estructura estática, sin cambios, formada por haces y redes de filamentos. Aunque los microfilamentos pueden ser relativamente estáticos en algunas estructuras, en otras son muy dinámicos dado que crecen o se encogen en longitud. Estos cambios en la organización de los filamentos de actina pueden generar fuerzas que provocan grandes cambios en la forma de una célula o impulsan movimientos intracelulares. En esta sección consideraremos los mecanismos y la regulación de la polimerización de la actina, que es responsable en gran medida de la naturaleza dinámica de las células. Veremos que varias proteínas que unen actina son contribuciones importantes a estos procesos.

La polimerización de la actina in vitro procede en tres pasos

La polimerización in vitro de los monómeros de G-actina para formar filamentos de F-actina puede ser controlada mediante viscosimetría, sedimentación, espectroscopia de fluorescencia o microscopia de fluorescencia (Cap. 9). Cuando los filamentos de actina han crecido lo suficiente en longitud como para enredarse, la viscosidad de la solución aumenta, lo cual se mide como un descenso en la velocidad de flujo en un viscosímetro. La base del ensayo de sedimentación es la capacidad de la ultracentrifugación (100 000 g durante 30 minutos) de sedimentar F-actina pero no G-actina. El tercer ensayo hace uso de G-actina marcada covalentemente con un colorante fluorescente; el espectro

de fluorescencia del monómero marcado de G-actina cambia cuando se polimeriza a F-actina. Finalmente, el crecimiento de los filamentos marcados de modo fluorescente puede ser revelado con una videomicroscopia de fluorescencia. Estos ensayos son útiles para los estudios cinéticos de la polimerización de la actina y para la caracterización de las proteínas que unen actina, con el fin de determinar cómo afectan la dinámica de la actina o cómo entrecruzan los filamentos de actina.

El mecanismo de ensamblaje de actina se ha estudiado extensamente. Resulta notable que pueda purificarse G-actina a alta concentración proteica sin que forme filamentos —siempre que se mantenga en una solución amortiguadora con ATP y bajos niveles de cationes. Sin embargo, como vimos con anterioridad, si el nivel de cationes se incrementa (p. ej., a 100 mM K^+ y 2 mM Mg^{2+}), la G-actina se polimerizará y la cinética de la reacción dependerá de la concentración inicial de G-actina. La polimerización de la G-actina pura in vitro ocurre en tres fases secuenciales (Fig. 17-7a):

1. La *fase de nucleación* está marcada por un período de retardo en el cual las subunidades de G-actina se combinan en dos o tres subunidades. Cuando el oligómero alcanza tres subunidades de longitud, puede actuar como semilla, o núcleo, para la fase siguiente.
2. Durante la *fase de elongación*, el oligómero corto rápidamente incrementa su longitud por la adición de monómeros de actina a ambos extremos. A medida que los filamentos de F-actina crecen, la concentración de los monómeros de G-actina disminuye hasta que se logra el equilibrio entre los extremos de los filamentos y los monómeros y se alcanza un estado estacionario.
3. En la *fase de estado estacionario*, los monómeros de G-actina intercambian con subunidades en los extremos del filamento, pero no hay cambio neto en la longitud total de los filamentos.

Las curvas cinéticas de la Figura 17-7b, c muestran el estado de la masa de filamentos durante cada fase de la polimerización. En la Figura 17-7c vemos que el período de retardo se debe a la nucleación, porque puede ser eliminado por la adición de un número pequeño de núcleos de F-actina a la solución de G-actina.

¿Cuánta G-actina es necesaria para el ensamblaje espontáneo de los filamentos? Los científicos han colocado varias concentraciones de ATP-G-actina en condiciones de polimerización y han encontrado que, por debajo de cierta concentración, los filamentos no pueden ensamblarse (Fig. 17-8). Por encima de esta concentración, los filamentos comienzan a formarse y, cuando se alcanza el estado estacionario, la incorporación de más subunidades libres se equilibra con la disociación de subunidades a partir de los extremos de los filamentos para dar como resultado una mezcla de filamentos y monómeros. La concentración a la cual los filamentos se forman se conoce como *concentración crítica*, C_c , global. Por debajo de la C_c , los filamentos no se formarán; por encima de la C_c se forman filamentos. En estado estacionario, la concentración de la actina monomérica permanece en la concentración crítica (véase Fig. 17-8).

Los filamentos de actina crecen más rápidamente en los extremos (+) que en los extremos (-)

Vimos previamente que los experimentos de decoración con cabezas de miosina S1 muestran una polaridad estructural inherente en la F-actina (véase Fig. 17-6). Si se añade ATP-G-actina libre a un filamento previamente decorado con miosina, los dos extremos crecerán a velocidades muy distintas (Fig. 17-9). De hecho, la velocidad de la adición de

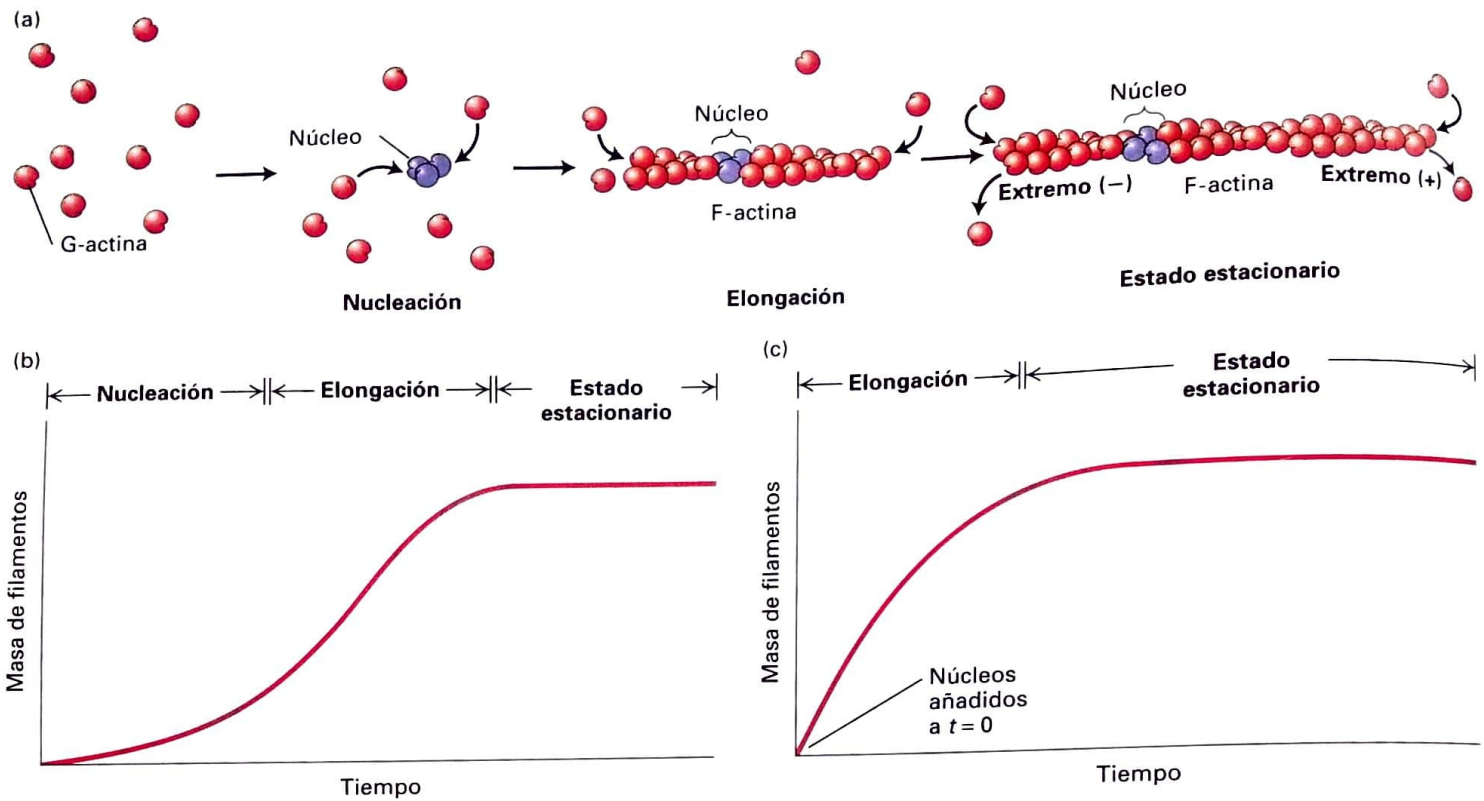


FIGURA 17-7 Las tres fases de la polimerización de G-actina in vitro. (a) En la fase de nucleación inicial, los monómeros de ATP-G-actina (rojo) forman lentamente complejos estables de actina (púrpura). Estos núcleos se alargan con rapidez en una segunda fase por la adición de subunidades a ambos extremos del filamento. En la tercera fase, los extremos de los filamentos de actina se encuentran en un estado estacionario con la G-actina monomérica.

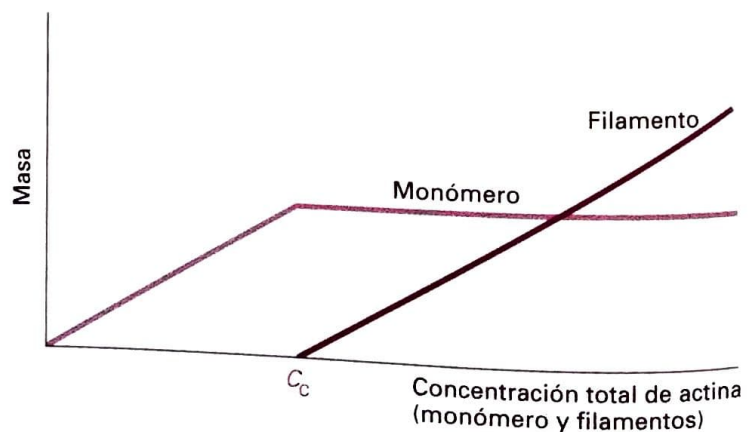
(b) Curso temporal de la reacción de polimerización in vitro que revela el período de retardo inicial asociado con la nucleación, la fase de elongación y el estado estacionario. (c) Si algunos fragmentos de filamentos de actina estables, cortos, se añaden al inicio de la reacción para actuar como núcleos, la elongación ocurre de inmediato, sin período de retardo.

ATP-G-actina es cerca de diez veces más rápida en el extremo (+) que en el extremo (-). La velocidad de adición, por supuesto, está determinada por la concentración de ATP-G-actina libre. Los experimentos cinéticos han mostrado que la velocidad de adición en el extremo (+) es de aproximadamente $12 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ y de aproximadamente $1,3 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ en el extremo (-) (Fig. 17-10a). Esto significa que si se añade $1 \mu\text{M}$ de ATP-G-actina libre a filamentos preformados, se añadirá un promedio de 12 subunidades al extremo (+) cada segundo, mientras que solo se añadirán 1,3 al extremo (-) en el mismo período. ¿Qué puede decirse acerca de la velocidad de pérdida de subunidades en cada extremo? Por el contrario, las velocidades de disociación de las subunidades de ATP-G-actina desde ambos extremos son bastante semejantes, de aproximadamente $1,4 \text{s}^{-1}$ desde el extremo (+) y de $0,8 \text{s}^{-1}$ desde el extremo

(-). Dado que esta disociación simplemente es la velocidad a la cual las subunidades abandonan los extremos, no depende de la concentración concomitante de ATP-actina libre.

¿Qué implicaciones tienen estas velocidades de asociación y disociación para la dinámica de la actina? En primer lugar, consideremos solo un extremo, el (+). Como vimos previamente, la velocidad de adición depende de la concentración de ATP-G-actina libre, mientras

FIGURA 17-8 Determinación de la formación de filamentos por la concentración de actina. La concentración crítica (C_c) es la concentración de los monómeros de G-actina en equilibrio con los filamentos de actina. A concentraciones de monómeros por debajo de la C_c no ocurre la polimerización. Cuando la polimerización se induce a concentraciones de monómeros superiores a la C_c , los filamentos se ensamblan hasta que se alcanza el estado estacionario y la concentración del monómero cae a la C_c .



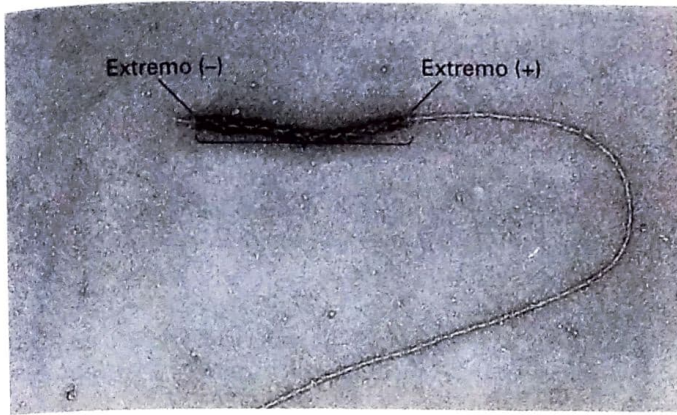


FIGURA EXPERIMENTAL 17-9 Los dos extremos de un filamento de actina decorado con miosina crecen en forma distinta. Cuando los filamentos cortos de actina son decorados con una cabeza S1 de miosina y luego empleados para nuclear la polimerización de la actina, las subunidades de actina resultantes se añaden de modo mucho más eficiente al extremo (+) que al extremo (-) del filamento en nucleación. Este resultado indica que los monómeros de G-actina se añaden mucho más rápido al extremo (+) que al extremo (-). (Cortesía de T. Pollard.)

que la velocidad de pérdida de subunidades no depende de ella. Así, se añadirán subunidades a altas concentraciones de ATP-G-actina libre pero a medida que la concentración disminuye se alcanzará un punto en el cual la velocidad de adición está equilibrada con la velocidad de pérdida y no ocurrirá crecimiento neto en ese extremo. Esto se llama la concentración crítica C_c^+ para el extremo (+), y podemos calcularla fijando la velocidad de ensamblaje como igual a la velocidad de des-

ensamblaje. Así, a la concentración crítica, la velocidad de ensamblaje es C_c^+ veces la velocidad medida de adición de $12 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ($C_c^+ 12 \text{s}^{-1}$), mientras que la velocidad de desensamblaje es independiente de la concentración de actina libre, es decir, $1,4 \text{s}^{-1}$. Al igualar estos términos, $C_c^+ = 1,4 \text{s}^{-1} / 12 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ o $0,12 \mu\text{M}$ para el extremo (+). Por encima de esta concentración de ATP-G-actina libre se produce la adición de subunidades al extremo (+) y el crecimiento neto, mientras que, por debajo de ella, hay una pérdida neta de subunidades y tiene lugar el acortamiento.

Consideremos ahora solamente el extremo (-). Dado que la velocidad de adición es mucho más baja, $1,3 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$, y la velocidad de disociación es, sin embargo, aproximadamente la misma, $0,8 \text{s}^{-1}$, esperamos que la concentración crítica C_c^- en el extremo (-) sea más alta que la C_c^+ . De hecho, tal como hicimos recientemente para el extremo (+), podemos calcular la C_c^- en aproximadamente $0,8 \text{s}^{-1} / 1,3 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ o $0,6 \mu\text{M}$. Así, a menos de $0,6 \mu\text{M}$ de ATP-G-actina libre, digamos $0,3 \mu\text{M}$, el extremo (-) perderá subunidades. Pero nótese que a esta concentración, el extremo (+) crecerá, ya que $0,3 \mu\text{M}$ está por encima de la C_c^+ . Dado que las concentraciones críticas son distintas en el estado estacionario, la ATP-G-actina libre será una intermedia entre C_c^+ y C_c^- , de modo que el extremo (+) crecerá y el extremo (-) perderá subunidades. Este fenómeno se llama *recambio rotatorio*, porque las subunidades particulares, como las que se muestran en azul en la Figura 17-10b, parecen moverse a lo largo del filamento.

La capacidad de los filamentos de actina de realizar este recambio rotatorio es impulsada por la hidrólisis de ATP. Cuando la ATP-G-actina se une a un extremo (+), el ATP es hidrolizado a ADP y P_i . El P_i se libera lentamente desde las subunidades del filamento, de modo tal que este se vuelve asimétrico, con las subunidades de ATP-actina en el extremo (+) del filamento seguidas de una región con ADP- P_i -actina y

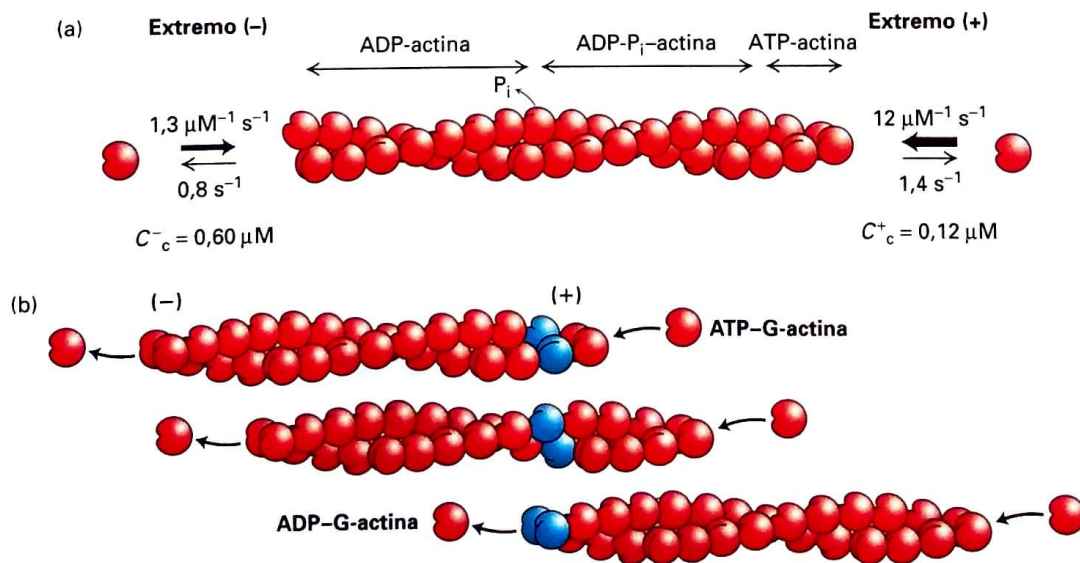


FIGURA 17-10 Recambio rotatorio de la actina. Las subunidades de ATP-actina se añaden más rápidamente al extremo (+) que al extremo (-) de un filamento de actina, lo que da como resultado una concentración crítica menor y un recambio rotatorio en el estado estacionario. (a) La velocidad de adición de ATP-G-actina es mucho más rápida en el extremo (+) que en el extremo (-), mientras que la velocidad de disociación de la ADP-G-actina es similar en ambos extremos. Esta diferencia resulta en una concentración crítica menor

en el extremo (+). En estado estacionario, la ATP-actina se añade de modo preferencial al extremo (+), dando lugar a una región corta del filamento que contiene ATP-actina y a regiones que contienen ADP- P_i -actina y ADP-actina hacia el extremo (-). (b) En el estado estacionario, las subunidades de ATP-G-actina se añaden de modo preferencial al extremo (+), mientras que las subunidades de ADP-G-actina se desensamblan del extremo (-) y dan origen a subunidades de recambio rotatorio.

luego, después de la liberación de P_i , las subunidades ADP-actina hacia el extremo (-) (véase Fig. 17-10a). Durante la hidrólisis de ATP y la liberación posterior de P_i desde las subunidades de un filamento, la actina sufre un cambio de conformación que es responsable de las diferentes velocidades de asociación y disociación en los dos extremos. Aquí, hemos considerado solamente la cinética de la ATP-G-actina, pero, en realidad, la ADP-G-actina se disocia del extremo (-). Nuestro análisis también depende de un suministro completo de ATP-G-actina, el cual veremos es el caso in vivo. Así, la actina puede usar el impulso generado por la hidrólisis de ATP para llevar a cabo el recambio rotatorio y los filamentos para el recambio rotatorio pueden operar in vivo, como veremos más adelante.

El recambio rotatorio de los filamentos de actina es acelerado por profilina y cofilina

Las mediciones de la velocidad de recambio rotatorio de la actina in vivo muestran que éste puede ser varias veces superior al logrado con actina pura in vitro en condiciones fisiológicas. Compatible con este modelo de un recambio rotatorio o movimiento de noria, el crecimiento de los filamentos de actina in vivo solo ocurre en el extremo (+). ¿De qué manera se logra este recambio rotatorio y de qué manera la célula recarga la ADP-actina que se disocia del extremo (-) a la ATP-actina para ensamblarlo en el extremo (+)? Hay dos proteínas distintas que unen actina que hacen contribuciones importantes a estos procesos.

La primera es la *profilina*, una proteína pequeña que une G-actina en el lado opuesto al surco que une al nucleótido. Cuando la profilina se une a la ADP-actina, abre el surco e incrementa en gran medida la pérdida de ADP, que es reemplazado por el ATP celular más abundante, lo cual da como resultado un complejo profilina-ATP-actina. Este complejo no puede unirse al extremo (-) porque la profilina bloquea los sitios presentes en la G-actina para el ensamblaje del extremo (-). Sin embargo, el complejo profilina-ATP-actina puede unirse de modo eficiente al extremo (+), y la profilina se disocia después de que la nueva subunidad de actina está unida (Fig. 17-11). Esta función de la profilina por sí misma no aumenta la velocidad del recambio rotatorio, pero proporciona un suministro de ATP-actina a partir de la ADP-actina liberada; en consecuencia, esencialmente toda la G-actina libre en una célula tiene ATP unido.

La profilina tiene otra propiedad importante: puede unirse a otras proteínas con secuencias ricas en residuos de prolina al mismo tiempo que se une a la actina. Veremos luego de qué manera esta propiedad es importante en el ensamblaje de los filamentos de actina.

La *cofilina* también es una proteína pequeña involucrada en el recambio rotatorio de la actina, pero se une específicamente a la F-actina, en la cual las subunidades contienen ADP, que son subunidades más viejas en el filamento próximas hacia el extremo (-) (véase Fig. 17-10a). La cofilina se une formando enlaces entre dos monómeros de actina e induce un pequeño cambio en el giro del filamento. Este pequeño giro desestabiliza al filamento, rompiéndolo en porciones pequeñas. Al romper el filamento de este modo, la cofilina genera muchos más extremos (-) libres y, por lo tanto, incrementa en gran medida el desensamblaje del extremo (-) del filamento (véase Fig. 17-11). Las subunidades de ADP-actina liberadas luego son recargadas por la profilina y añadidas al extremo (+), como se describió más arriba. De este modo, la profilina y la cofilina pueden incrementar el recambio rotatorio in vitro más de 10 veces, hasta los niveles vistos in vivo. Como podría anticiparse, la célula emplea vías de transducción

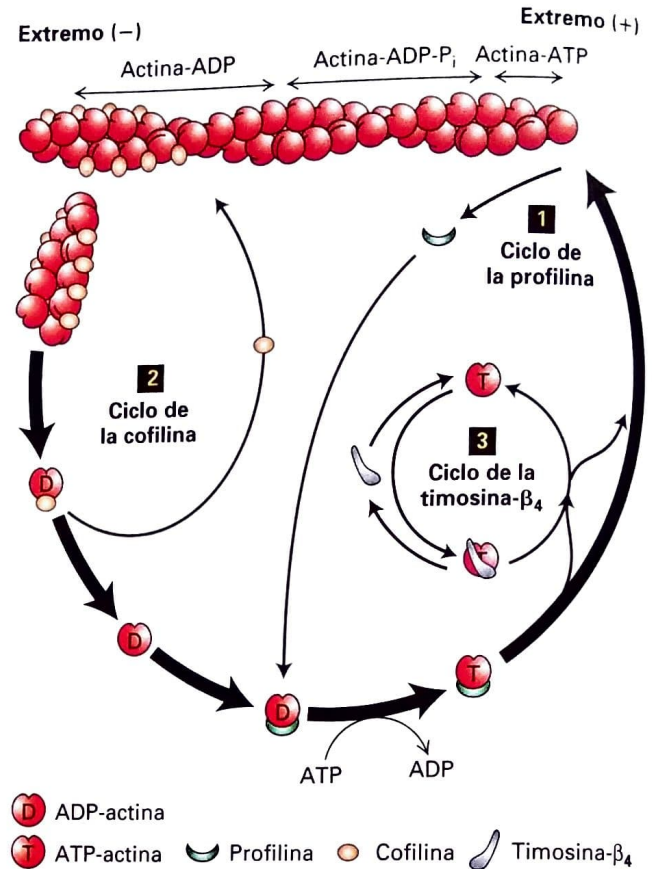


FIGURA 17-11 Regulación de la formación de filamentos por proteínas que se unen a la actina. Las proteínas que se unen a la actina regulan la actividad de ensamblaje y desensamblaje así como la disponibilidad de G-actina para la polimerización. En el ciclo de la profilina **1**, ésta se une a la ADP-G-actina y cataliza el intercambio de ADP por ATP. El complejo ATP-G-actina-profilina puede entregar actina al extremo (+) de un filamento con la disociación y el reciclado de la profilina. En el ciclo de la cofilina **2**, ésta se une de modo preferencial a los filamentos que contienen ADP-actina, induciéndolos para fragmentarse y así incrementar la despolimerización, haciendo más extremos de filamentos. En el ciclo de la timosina- β_4 **3**, la G-actina disponible por el equilibrio de actina-profilina es unida por la timosina- β_4 , secuestrándola a partir de la polimerización. A medida que la concentración de G-actina libre disminuye por la polimerización, la G-actina-timosina- β_4 se disocia para formar G-actina libre, disponible para su asociación con la profilina y la polimerización ulterior.

de las señales para regular tanto a la profilina como a la cofilina y, por lo tanto, el recambio de filamentos de actina.

La timosina β_4 proporciona un reservorio de actina para la polimerización

Se ha sabido desde hace tiempo que las células con frecuencia tienen un depósito muy grande de actina no polimerizada, en ocasiones hasta la mitad de la actina presente en la célula. Dado que las concentraciones de actina celular pueden alcanzar 100-400 μM , esto significa que puede haber entre 50 y 200 μM de actina no polimerizada en la célula. Dado que la concentración crítica in vitro es aproximadamente de 0,2 μM , ¿por qué toda esta actina no se polimeriza? La respuesta radica, al menos en parte, en la presencia de un monómero de actina que secuestra proteínas. Uno de ellos es la *timosina- β_4* , una pequeña proteína

que se une a la ATP-G-actina de tal modo que inhibe la adición de la subunidad de actina a cualquiera de los extremos del filamento. La timosina- β_4 puede ser muy abundante, por ejemplo, en las plaquetas de la sangre humana. Estos fragmentos discoidales celulares son muy abundantes en la sangre y, cuando se activan durante la coagulación, sufren un estallido de ensamblaje de actina. Las plaquetas son ricas en actina: se estima que tienen una concentración total de aproximadamente 550 μM , de los cuales alrededor de 220 μM se encuentran en forma no polimerizada. Contienen también aproximadamente 500 μM de timosina- β_4 , que secuestra gran parte de la actina libre. Sin embargo, al igual que en muchas interacciones proteína-proteína, la actina libre y la timosina- β_4 libre se encuentran en equilibrio dinámico con la actina-timosina- β_4 . Si parte de esta actina libre se emplea para la polimerización, se disociará más actina-timosina- β_4 , proporcionando más actina para la polimerización (véase Fig. 17-11). Así, la timosina- β_4 se comporta como un amortiguador de actina no polimerizada para cuando se la requiera.

Las proteínas del casquete bloquean el ensamblaje y el desensamblaje en los extremos de los filamentos de actina

El recambio rotatorio y la dinámica de los filamentos de actina están regulados adicionalmente en las células por las *proteínas de encasquetamiento*, que se unen de manera específica a los extremos de los filamentos. Si esto no fuese así, los filamentos de actina seguirían creciendo y desensamblándose de modo descontrolado. Como podría esperarse, se han descubierto dos clases de proteínas: una que se une al extremo (+) y la otra que se une al extremo (-) (Fig. 17-12).

Una proteína denominada *CapZ*, formada por dos unidades íntimamente relacionadas, se une con una afinidad muy alta ($\approx 0,1 \text{ nM}$) al extremo (+) de los filamentos de actina, e inhibe así la adición o la pérdida de subunidades. La concentración de *CapZ* en las células generalmente es suficiente como para formar un casquete rápidamente en

cualquier extremo (+) recién formado. De modo que, ¿cómo pueden crecer los filamentos en sus extremos (+)? Al menos dos mecanismos regulan la actividad de *CapZ*. En primer lugar, la actividad de formación de casquete de *CapZ* se ve inhibida por el lípido regulador PI(4,5) P_2 , presente en la membrana plasmática (Cap. 16). En segundo término, trabajos recientes han mostrado que ciertas proteínas de regulación son capaces de unirse al extremo (+) y simultáneamente protegerlo de la *CapZ*, mientras que aún se permite que se realice el ensamblaje allí. Así, las células han desarrollado un mecanismo elaborado para bloquear el ensamblaje de los filamentos de actina en sus extremos (+), excepto cuándo y dónde se requiera este ensamblaje.

Otra proteína llamada *tropomodulina* se une al extremo (-) de los filamentos de actina, e inhibe también el ensamblaje y el desensamblaje. Esta proteína se encuentra de modo predominante en las células en las cuales los filamentos de actina necesitan tener una alta estabilidad. Dos ejemplos que encontraremos más adelante en este capítulo son los filamentos de actina cortos en la corteza de los glóbulos rojos y los filamentos de actina en el músculo. Como veremos, en ambos casos la *tropomodulina* opera con otra proteína, la *tropomiosina*, que se encuentra a lo largo del filamento para estabilizarlo. La *tropomodulina* se une tanto a la *tropomiosina* como a la actina en el extremo (-) para estabilizar en gran medida al filamento.

Además de la *CapZ*, otra clase de proteínas puede formar un casquete sobre los extremos (+) de los filamentos de actina. Estas proteínas también pueden seccionar los filamentos de actina. Un miembro de esta familia, la *gelsolina*, está regulado por las concentraciones incrementadas de los iones de Ca^{2+} . Al unirse al Ca^{2+} , la *gelsolina* sufre un cambio de conformación que le permite unirse al costado de un filamento de actina y luego insertarse entre las subunidades de la hélice, rompiendo el filamento. Luego, permanece unida y forma un casquete en el extremo (+), lo que genera un nuevo extremo (-), que puede desensamblarse. Como analizaremos en una sección posterior, el entrecruzamiento de proteínas con la actina puede proporcionar enlaces entre filamentos de actina individuales que transformen una solución de F-actina en un gel. Si la *gelsolina* se añade a un gel de este tipo y el nivel de Ca^{2+} es elevado, la *gelsolina* seccionará los filamentos de actina y los volverá a la solución líquida. Esta capacidad de transformar un gel en un sol es la razón por la cual la proteína se llama “*gelsolina*”.

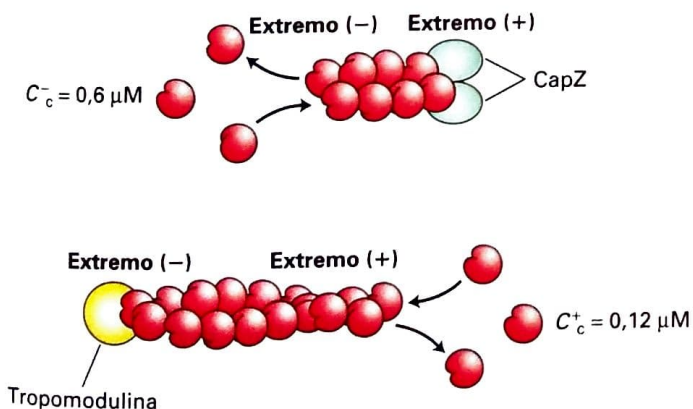


FIGURA 17-12 Proteínas de encasquetamiento. Las proteínas de encasquetamiento bloquean el ensamblaje y desensamblaje en los extremos de los filamentos. La *CapZ* bloquea el extremo (+), que es el lugar en que los filamentos normalmente crecen, de modo que su función es limitar la dinámica de la actina al extremo (-). La proteína de encasquetamiento *tropomodulina* bloquea los extremos (-), donde ocurre normalmente el desensamblaje de los filamentos; así, la principal función de la *tropomodulina* es estabilizarlos.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 17.2

Dinámica de los filamentos de actina

- El paso limitante de la velocidad en el ensamblaje de la actina es la formación de un oligómero de actina corto (núcleo) que puede alargarse a filamentos.
- La concentración crítica (C_c) es la concentración de G-actina libre en la cual el ensamblaje al extremo del filamento está equilibrado por la pérdida de ese extremo.
- Cuando la concentración de G-actina se encuentra por encima de la C_c , el extremo del filamento crecerá; cuando es inferior a la C_c , el filamento se encogerá (véase Fig. 17-8).
- La ATP-G-actina se añade mucho más rápido al extremo (+) que al extremo (-), dando como resultado una concentración crítica más baja en el extremo (+) que en el (-).

- En el estado estacionario, las subunidades de actina sufren un recambio rotatorio a través de un filamento. La ATP-actina se añade en el extremo (+), luego el ATP se hidroliza a ADP y P_i , P_i se pierde y la ADP-actina se disocia desde el extremo (-).

- La longitud y la velocidad de recambio de los filamentos de actina están reguladas por proteínas especializadas que se unen a la actina (véase Fig. 17-11). La profilina incrementa el intercambio de ATP por ADP en la G-actina; la cofilina aumenta la velocidad de pérdida de ADP-actina desde el extremo (-) del filamento, y la timosina- β_4 se une a la G-actina para proporcionar una actina de reserva cuando se la necesita. Las proteínas de encaquetamiento se unen a los extremos de los filamentos, bloqueando el ensamblaje y desensamblaje.

17.3 Mecanismos de ensamblaje de los filamentos de actina

El paso limitante de la velocidad de la polimerización de la actina es la formación de un núcleo de actina inicial a partir del cual puede crecer un filamento (véase Fig. 17-7a). En las células, esta propiedad inherente de la actina se emplea como punto de control para determinar dónde se ensamblan los filamentos de actina —ésta es la razón por la cual se generan los diferentes ensamblajes de actina dentro de una célula (véanse Figs. 17-1 y 17-4)—. Dos clases principales de proteínas que nuclean actina, la familia de proteínas de la *formina* y el complejo *Arp2/3*, forman un

núcleo para el ensamblaje de actina bajo el control de vías de transducción de la señal. Más aun, constituyen un núcleo para el ensamblaje de diferentes organizaciones de la actina: las forminas guían el ensamblaje de filamentos de actina largos, mientras que el complejo *Arp2/3* guía la formación de redes ramificadas. Analizaremos cada uno por separado y veremos de qué manera la potencia de la polimerización de la actina puede impulsar los procesos motrices de una célula. Luego, nos centraremos en los recientes descubrimientos de factores especializados en la nucleación de la actina.

Las forminas ensamblan filamentos ramificados

Las forminas se encuentran esencialmente en todas las células eucariotas como una familia de proteínas diversas: hay siete clases diferentes presentes en los vertebrados. Si bien son distintas, todos los miembros de la familia de las forminas tienen dos dominios adyacentes en común, los llamados FH1 y FH2 (*formin-homology domains* 1 y 2). Dos dominios FH2 de dos monómeros individuales se asocian para formar un complejo con forma de rosquilla (Fig. 17-13a). Este complejo tiene la capacidad de nuclear el ensamblaje de la actina al unirse a dos subunidades de actina, manteniéndolas de modo tal que el extremo (+) se encuentra hacia los dominios FH2. El filamento naciente ahora puede crecer en el extremo (+) mientras el dímero del dominio FH2 permanece unido. ¿Cómo es posible esto? Como vimos previamente, un filamento de actina puede pensarse como dos hebras de subunidades entrelazadas. El dímero FH2 puede unirse a las dos subunidades terminales. Luego, probablemente, se balancee entre las dos subunidades de

ANIMACIÓN FOCALIZADA: Elongación del filamento de actina por el dímero formina FH2

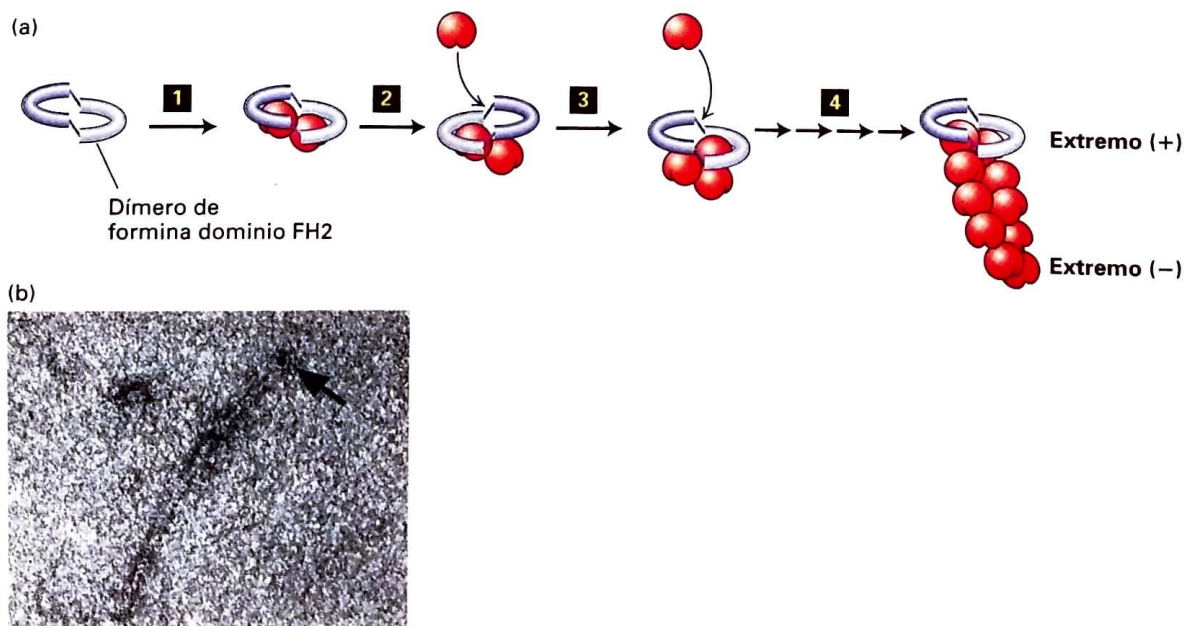


FIGURA 17-13 Nucleación de la actina por el dominio FH2 de la formina. (a) Las forminas tienen un dominio llamado FH2 que puede formar un dímero y nuclear el ensamblaje de los filamentos. El dímero une dos subunidades de actina (paso 1), al retroceder y avanzar (pasos 2 a 4) alternativamente, puede permitir la inserción de subunidades adicionales entre el dominio FH2 y el extremo (+) del filamento creciente. El dominio

FH2 protege al extremo (+) de ser encaquetado por las proteínas de encaquetamiento. (b) El dominio FH2 de una formina fue marcado con oro coloidal (punto negro) y usado para nuclear el ensamblaje de un filamento de actina. El filamento resultante se visualizó por microscopía electrónica después de la tinción con acetato de uranilo. Las forminas ensamblan filamentos no ramificados largos. (Parte [b] de D. Pruyne y cols., 2002, *Science* 297:612)

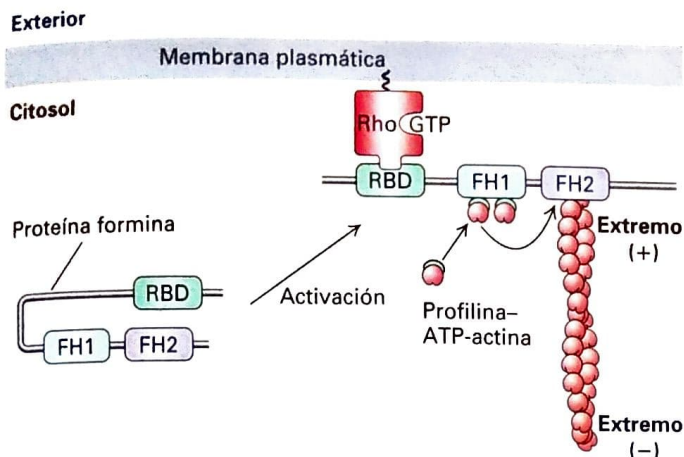


FIGURA 17-14 Regulación de las forminas por una interacción intramolecular. Parte de las clases de forminas presentes en los vertebrados son reguladas por una interacción intramolecular. La formina inactiva se activa al unir su dominio de unión a Rho (RBD) al sitio activo unido a la membrana Rho-GTP, lo que da como resultado la exposición del dominio FH2 de la formina, que luego puede nuclear y ensamblar un filamento nuevo. Todas las forminas tienen un dominio FH1 adyacente al FH2; el dominio FH1 rico en prolina es un sitio de reclutamiento de complejos profilina-ATP-G-actina, que luego pueden ser "alimentados" al extremo (+) creciente. Por simplicidad de representación, se muestra una única proteína formina, pero como puede verse en la Figura 17-13, el dominio FH2 funciona como un dímero para nuclear el ensamblaje de la actina. La regulación de la familia Rho de GTPasas pequeñas se detalla en la Figura 17-42.

los extremos, abandonando una para permitir la adición de una nueva subunidad y luego uniéndose a la nueva subunidad recién añadida y liberando espacio para la adición de otra subunidad en la otra hebra. De esta manera, balanceándose entre las dos subunidades del extremo, puede permanecer unida a la vez que simultáneamente permite el crecimiento en el extremo (+) (véase Fig. 17-13a).

El dominio FH1 adyacente al FH2 también hace una contribución importante al crecimiento del filamento de actina (Fig. 17-14). Este dominio es rico en residuos de prolina, que son los sitios para la unión de varias moléculas de profilina. Analizamos previamente el modo en que la profilina puede intercambiar el nucleótido ADP en la G-actina para generar profilina-ATP-actina. El dominio FH1 se comporta como un sitio de aterrizaje para incrementar la concentración local de los complejos profilina-ATP-G-actina. La actina de los complejos localizados profilina-actina es aportada al dominio FH2 para añadir actina al extremo (+) del filamento con la liberación concomitante de profilina, permitiendo así el rápido ensamblaje del filamento mediado por el FH2 (véase Fig. 17-14). Dado que la formina permite la adición de subunidades de actina al extremo (+), se generan filamentos largos con formina en su extremo (+) (Fig. 17-13b). De esta forma, las forminas nucleas el ensamblaje de actina y tienen la capacidad notable de permanecer unidas al extremo (+) a la vez que permiten allí un rápido ensamblaje. Para asegurar el crecimiento continuado del filamento, las forminas se unen al extremo (+), de modo tal que evitan la unión de una proteína de formación de casquete al extremo (+), tal como la CapZ, que normalmente terminaría el ensamblaje.

Para que resulte de utilidad a una célula, la actividad de la formina debe estar regulada. Existen muchas forminas en una conformación inactiva plegada como resultado de una interacción entre la primera

mitad de una proteína y la cola C-terminal. Estas forminas son activadas por el Rho-GTP en la membrana, una GTPasa pequeña relacionada con Ras (que se analiza en la Sección 17.7). Cuando Rho cambia de la forma inactiva Rho-GDP a su forma activada Rho-GTP, puede unirse y activar la formina (véase Fig. 17-14).

Estudios recientes han mostrado que las forminas son responsables del ensamblaje de filamentos de actina largos, como los que están presentes en las fibras de tensión, los filopodios y el anillo contráctil de la citocinesis (véase Fig. 17-4). El papel de nucleación de actina que tienen las forminas fue descubierto hace poco, de modo tal que los papeles desempeñados por esta familia diversa de proteínas solo están siendo descubiertos en estos momentos. Dado que hay muchas clases diferentes de forminas en los animales, es probable que éstas resulten participantes del ensamblaje de otras estructuras que emplean actina.

El complejo Arp2/3 nuclea el ensamblaje de los filamentos ramificados

El complejo Arp2/3 es una maquinaria proteica formada por siete subunidades, dos de las cuales son proteínas relacionadas con la actina ("Arp", del inglés *actin-related proteins*), lo cual explica su nombre (Fig. 17-15a). Está presente en esencialmente todos los eucariontes, incluidas plantas, levaduras y células animales. El complejo Arp2/3 solo es un nucleador muy deficiente. Para nuclear el ensamblaje de la actina ramificada, Arp2/3 requiere la activación mediante la interacción con un *factor de promoción de la nucleación* (NPF, *nucleation promoting factor*), además de la asociación con el costado de un filamento de actina preexistente. Si bien hay muchos NPF diferentes, la familia principal está caracterizada por la presencia de una región llamada WCA (WH2, conector, ácido). Los experimentos han demostrado que si se añade el dominio WCA a un ensayo de ensamblaje de actina, junto con filamentos de actina preformados, el Arp2/3 se transforma en un nucleador potente para el ensamblaje adicional de la actina.

¿De qué manera el complejo Arp2/3 y el NPF nuclean a los filamentos? El NPF se une a una subunidad de la actina a través de su dominio WH2 y activa el complejo Arp2/3 mediante la interacción con su dominio ácido. En el complejo inactivo Arp2/3, los dos polipéptidos relacionados con la actina—Arp2 y Arp3—se encuentran en la configuración incorrecta para nuclear el ensamblaje de los filamentos (véase Fig. 17-15a). Cuando se activan por acción del NPF, la Arp2 y la Arp3 se mueven a la configuración correcta, y el complejo se une al costado de un filamento de actina preexistente. La subunidad de actina traída por el dominio WH2 del NPF se une al molde Arp2/3 para nuclear el ensamblaje de los filamentos en el extremo (+) (Fig. 17-15b). Este nuevo extremo (+) luego crece en tanto haya ATP-G-actina disponible o hasta que ésta sea encasquetada por una proteína de encasquetamiento del extremo (+) como la CapZ. El ángulo entre el filamento viejo y el nuevo es de 70° (Fig. 17-15c). Éste también es el ángulo observado experimentalmente en filamentos ramificados en el borde conductor de las células móviles, que se cree que se forma por la acción del complejo Arp2/3 activado (Fig. 17-15d). Como analizaremos en secciones posteriores, el complejo Arp2/3 puede ser empleado para impulsar la polimerización de la actina y, en consecuencia, el movimiento intracelular.

La nucleación de la actina por el complejo Arp2/3 está exquisitamente controlada, y los NPF son parte de este proceso de regulación. Un NPF se denomina WASp, dado que es defectuoso en los pacientes con el síndrome de Wiskott-Aldrich, una enfermedad ligada al cromosoma X, caracterizada por ecema, bajo recuento plaquetario y defi-

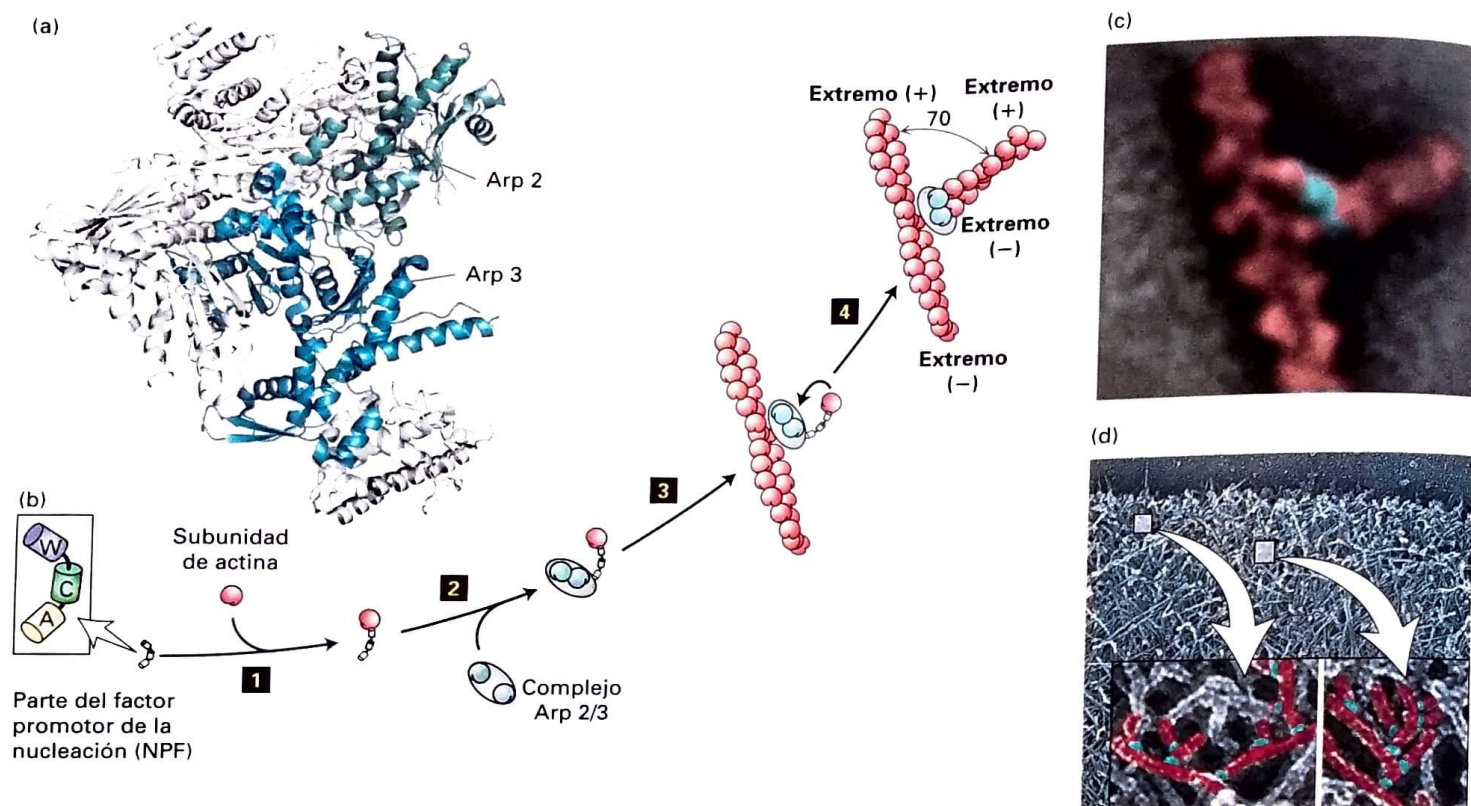


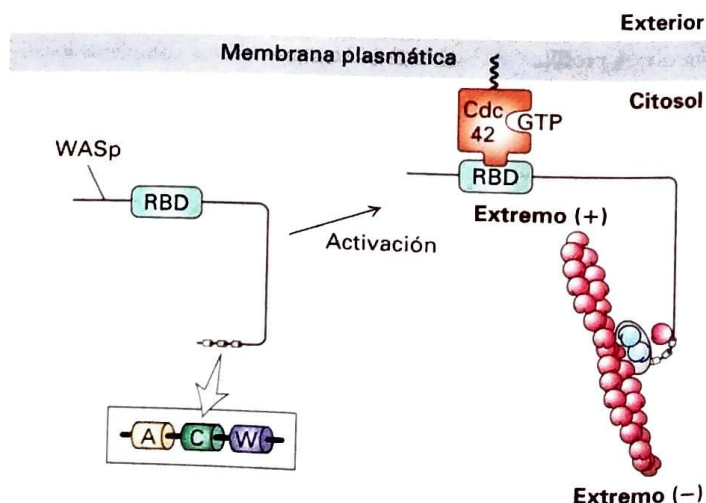
FIGURA 17-15 Nucleación de la actina por el complejo Arp2/3. (a) Estructura de rayos X del complejo Arp2/3, con cinco de las subunidades en gris y las subunidades Arp2 y Arp3 en verde y azul. (b) Para nucleación de la actina de modo eficiente, la parte en activación de un NPF se muestra con sus dominios W (WH2), C (conector) y A (ácido). Una subunidad de actina se une al dominio W (paso 1) y luego el dominio A se une al complejo Arp2/3 (paso 2). Esta interacción induce un cambio de conformación en el complejo Arp2/3 y, después de unirse al costado de un

filamento de actina, la subunidad de actina unida al dominio W se une al complejo Arp2/3 (paso 3), que luego inicia el ensamblaje de un filamento de actina en el extremo (+) disponible (paso 4). La rama Arp2/3 forma un ángulo característico de 70° entre los filamentos. (c) Imagen promedio compilada a partir de varias fotomicrografías electrónicas de Arp2/3 en una rama de actina. (d) Imagen de los filamentos de actina en el borde conductor, con aumento y coloración de los filamentos ramificados individuales. (Parte [a] PDB ID 2P9L; parte [c] de C. Egile y cols., 2006, *PLoS Biol.* 3:e383; parte [d] de T. M. Svitkina y G. G. Borisy, 1999, *J. Cell Biol.* 145:1009.)

ciencia inmune. El WASp existe en una conformación inactiva plegada, de modo tal que no hay dominio WCA disponible (Fig. 17-16). Un mecanismo para activar las proteínas implica a la pequeña proteína Cdc42 relacionada con Ras que une GTP (analizada en la Sección 17.7), que en el estado unido a GTP se une al WASp y lo abre, haciendo accesibles los dominios WH2 de unión a la actina y de activación ácida.

Si bien las forminas y el complejo Arp2/3 están presentes en hongos, plantas y animales, los nucleadores adicionales de actina han sido recién-

FIGURA 17-16 Regulación del complejo Arp2/3 por la WASp. La WASp está inactiva debido a una interacción intramolecular que enmascara el dominio WCA. Al unirse a la proteína G pequeña activa, unida a la membrana Cdc42-GTP (un miembro de la familia Rho) a través de su dominio de unión a Rho (RBD), la interacción intramolecular en la WASp se alivia y expone el dominio W a la unión de la actina y el dominio ácido A para la activación del complejo Arp2/3. La regulación de la familia Rho de pequeñas GTPasas se detalla en la Figura 17-42.



temente descubiertos en las células animales. Uno de éstos, llamado Spire, tiene cuatro dominios WH2 en tándem, de modo tal que puede unir cuatro monómeros de actina. Lo hace de manera tal que permite que las actinas se ensamblen en un filamento, si bien aún no se comprende el mecanismo exacto. Dado que los filamentos de actina desempeñan tantas funciones en la célula, es probable que se descubran nucleadores adicionales.

Los movimientos intracelulares pueden ser impulsados por la polimerización de la actina

¿De qué modo la polimerización de la actina puede ser empleada para hacer trabajo? Como hemos visto, la polimerización de la actina im-

plica la hidrólisis de actina-ATP a actina-ADP, lo cual permite que la actina crezca preferencialmente en el extremo (+) y se desensamble en el extremo (-). Si un filamento de actina fuera fijado en la malla del citoesqueleto y se pudiera unir y manejar el ensamblaje del extremo (+), podría ser transportado a través de la célula. Esto es exactamente lo que hace el parásito intracelular *Listeria monocytogenes* para moverse dentro de la célula. El estudio sobre la movilidad de *Listeria*, de hecho, fue el modo de descubrir la actividad de nucleación de la proteína Arp2/3. Como veremos brevemente, *Listeria* se ha apropiado de un proceso de movilidad normal de la célula para sus propósitos; analizaremos *Listeria* en primer término, dado que actualmente se comprende mucho mejor que los procesos normales que emplean mecanismos semejantes.

VIDEO: Ensamblaje in vivo de colas de actina en bacterias infectadas por *Listeria*

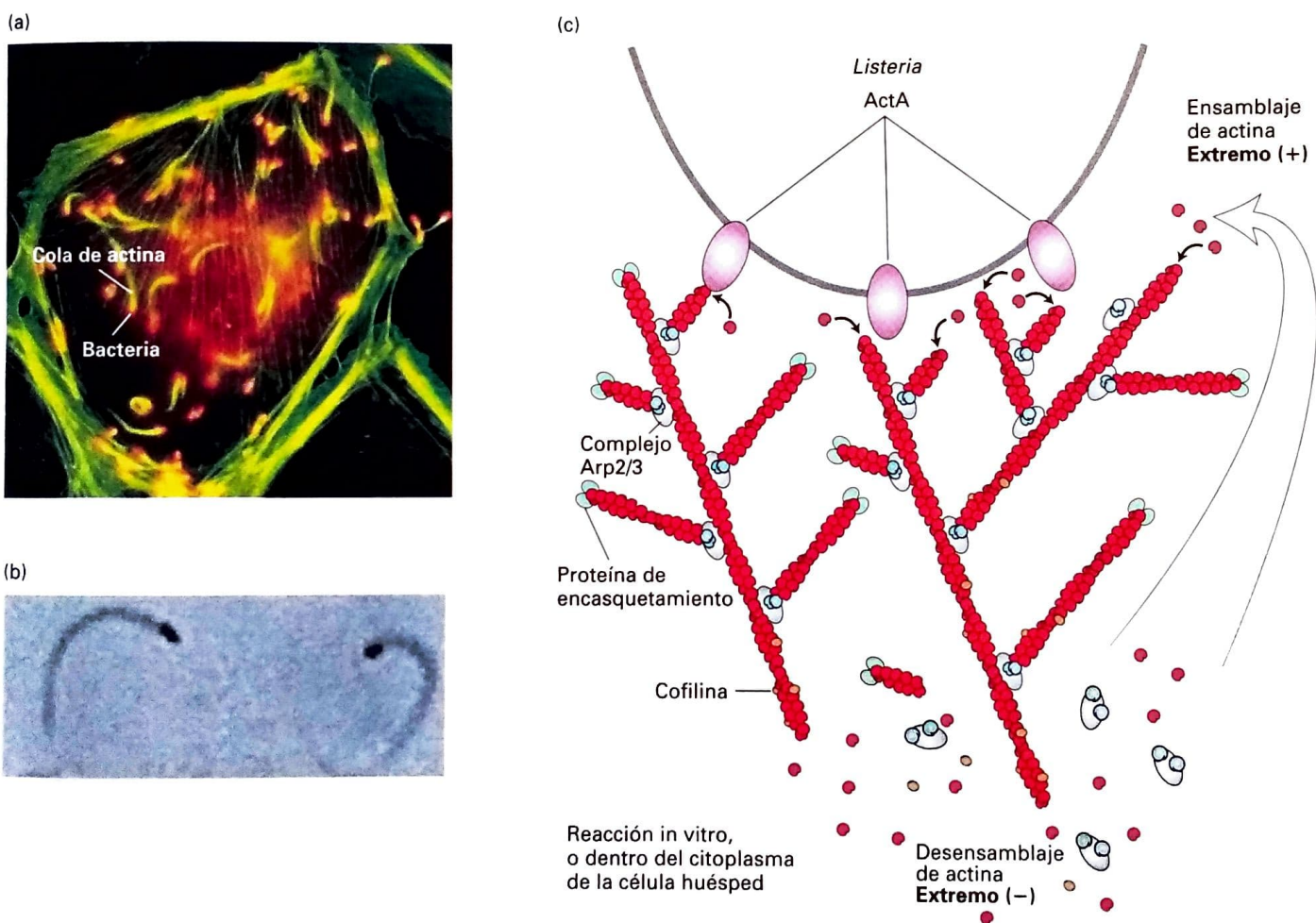


FIGURA EXPERIMENTAL 17-17 *Listeria* emplea la potencia de la polimerización de la actina para el movimiento intracelular. (a) Microscopia de fluorescencia de una célula cultivada teñida con un anticuerpo para una proteína de la superficie bacteriana (rojo) y faloidina fluorescente para localizar a la F-actina (verde). Por detrás de cada bacteria *Listeria* hay una "cola de cometa" de actina, que impulsa la bacteria hacia adelante, al polimerizarse la actina. Cuando la bacteria se desliza hacia el interior de la membrana plasmática, empuja la membrana hacia el exterior, hacia una estructura similar al filopodio, que sobresale a una célula vecina. (b) La movilidad de *Listeria* puede reconstituirse in vitro con bacterias y solo cuatro proteínas: ATP-G-actina, complejo Arp2/3, CapZ y cofilina. Esta fotomicrografía de contraste

de fases muestra una bacteria (negro) detrás de la cual se encuentran colas de actina densas en la fase. (c) Modelo del modo en que se mueve *Listeria* empleando solo cuatro proteínas. La proteína ActA de la superficie celular activa al complejo Arp2/3 para nuclear el ensamble de nuevos filamentos a partir de los preexistentes. Los filamentos crecen en su extremo (+), hasta que son encaquetados por la CapZ. La actina se recicla por la acción de la cofilina, que incrementa la despolimerización en el extremo (-) de los filamentos. De este modo, la polimerización queda confinada a la parte posterior de la bacteria, que la impulsa hacia adelante. (Parte [a] cortesía de J. Theriot y T. Michison; parte [b] de T. P. Loisel y cols., 1999, *Nature*, **401**:613.)

La *Listeria* es un patógeno alimentario que provoca síntomas gastrointestinales leves en la mayoría de los adultos, pero que puede resultar fatal para los ancianos o los individuos inmunocomprometidos. Ingresa a las células animales y se divide en el citoplasma. Para moverse de una célula huésped a otra, se desplaza alrededor de la célula, polimerizando actina en una cola de cometa del mismo modo que la cola que se encuentra detrás de un cohete (Fig. 17-17a, b), y cuando llega a la membrana plasmática se abre camino en la célula adyacente para infectarla. ¿De qué manera recluta la actina de la célula huésped para impulsarse? *Listeria* tiene sobre su superficie una proteína llamada ActA que imita a un NPF porque tiene un sitio de unión para la actina y una región ácida para activar al complejo Arp2/3 (Fig. 17-17c). La proteína ActA también se une a una proteína conocida como VASP, que tiene tres propiedades importantes. En primer término, la VASP tiene una región rica en prolina que puede unirse a profilina-ATP-actina para incrementar el ensamblaje de ATP-actina a nuevos extremos puntiagudos generados por el complejo Arp2/3. En segundo término, puede mantenerse en un extremo del filamento recién formado. En tercer término, puede proteger el extremo (+) del filamento en desarrollo al formar un casquete con CapZ. Estas propiedades le permiten a la VASP incrementar el ensamblaje de actina y confinarlo a la parte posterior de la bacteria. Los filamentos en ensamblaje luego empujan la bacteria. Dado que los filamentos están embebidos en la matriz del citoesqueleto estacionario de las células, la *Listeria* es empujada hacia adelante, hacia el frente de la actina en polimerización. Los investigadores han reconstituido la movilidad de la *Listeria* en un tubo de ensayo, empleando proteínas purificadas para ver cuáles son los requisitos mínimos para la movilidad de la *Listeria*. Notablemente, la bacteria se moverá cuando exactamente se añadan cuatro proteínas: ATP-G-actina, complejo Arp2/3, CapZ y cofilina (véase Fig. 17-17b, c). Hemos analizado el papel de la actina y del Arp2/3, pero ¿por qué se necesitan la CapZ

y la cofilina? Como vimos previamente, la CapZ rápidamente forma casquetes en el extremo libre (+) de los filamentos de actina, de modo tal que cuando un filamento en crecimiento ya no contribuye al movimiento de la bacteria, rápidamente se forma en él un casquete y se inhibe su elongación ulterior. De esta manera, el ensamblaje ocurre solamente adyacente a la bacteria donde la ActA está estimulando al complejo Arp2/3. La cofilina se necesita para acelerar el desensamblaje del extremo (-) del filamento de actina, regenerando actina libre para mantener el ciclo de la polimerización en funcionamiento (véase Fig. 17-11). Esta velocidad mínima de movimiento puede ser incrementada por la presencia de otras proteínas, como la VASP y la profilina, como se mencionó recientemente.

Para moverse dentro de las células, la bacteria *Listeria*, así como otros patógenos oportunistas, tales como las especies de *Shigella* que provocan disentería, se apropian de un proceso celular regulado normal, implicado en el movimiento celular. Como analizaremos con más detalle más adelante (Sección 17.7), las células en movimiento tienen una delgada lámina de citoplasma que sobresale de la parte frontal de la célula, llamado el borde conductor (véanse Fig. 17-1c, 17-4 y 17-15d). Esta lámina delgada de citoplasma consiste en una densa red de filamentos de actina que se alargan continuamente en el frente de la célula para empujar la membrana hacia adelante. Los factores del borde conductor de la membrana activan al complejo Arp2/3 para nuclear estos filamentos. Así, la potencia del ensamblaje de la actina empuja a la membrana hacia adelante y contribuye a la locomoción celular.

Los microfilamentos actúan en la endocitosis

Como vimos en el Capítulo 14, la endocitosis describe el proceso que emplean las células para captar partículas, moléculas o líquido desde el medio externo al encerrarlos en la membrana plasmática y luego inter-

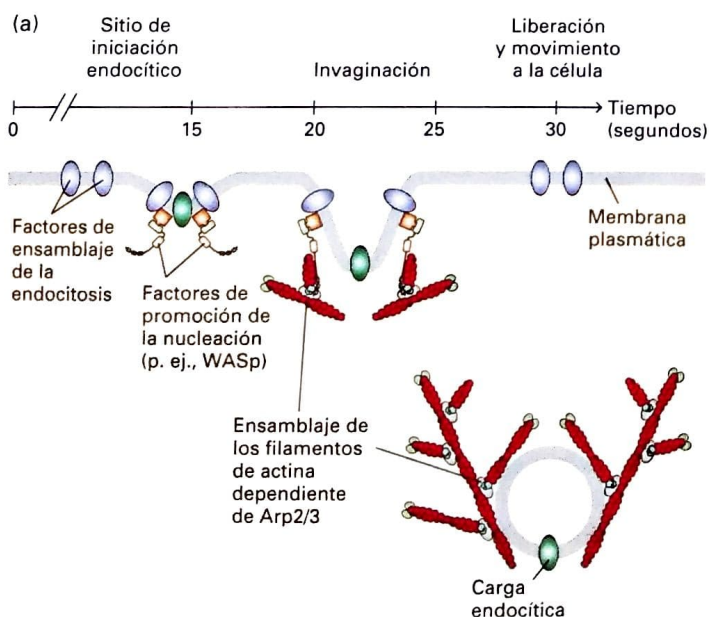
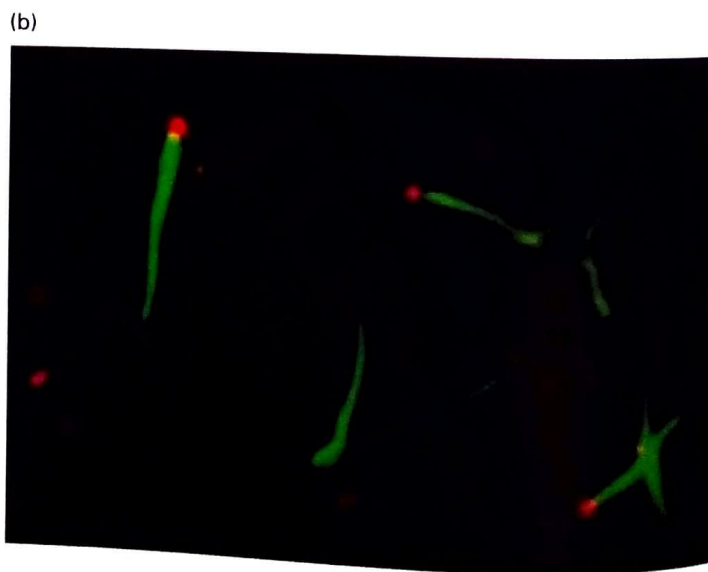


FIGURA 17-18 Ensamblaje de actina dependiente de Arp2/3 durante la endocitosis. (a) La endocitosis mediada por clatrina es un proceso rápido y ordenado. Ha sido estudiado en las levaduras, donde se ha delineado el orden temporal de los pasos específicos. Las imágenes in vivo han mostrado que los factores de ensamblaje de la endocitosis reclutan factores de promoción de la nucleación que activan al complejo Arp2/3. Un estallido de ensamblaje de la actina dependiente de Arp2/3 aleja las vesículas endocíticas internalizadas



de la membrana plasmática, tal como ocurre con el movimiento de *Listeria*. (b) El movimiento de los endosomas puede ser reconstituido in vitro. Los endosomas aislados de células que habían captado transferrina marcada con fluorescencia (rojo) se añadieron a un extracto de células con actina marcada con fluorescencia (verde). Los endosomas unen WASp, que a su vez activa al complejo Arp2/3 para ensamblar las colas de actina que los impulsan a través del citoplasma. (Parte (b) de Taunton y cols., *J. Cell Biol.*, 148:519.)

Anticuerpo contra el componente de la superficie bacteriana

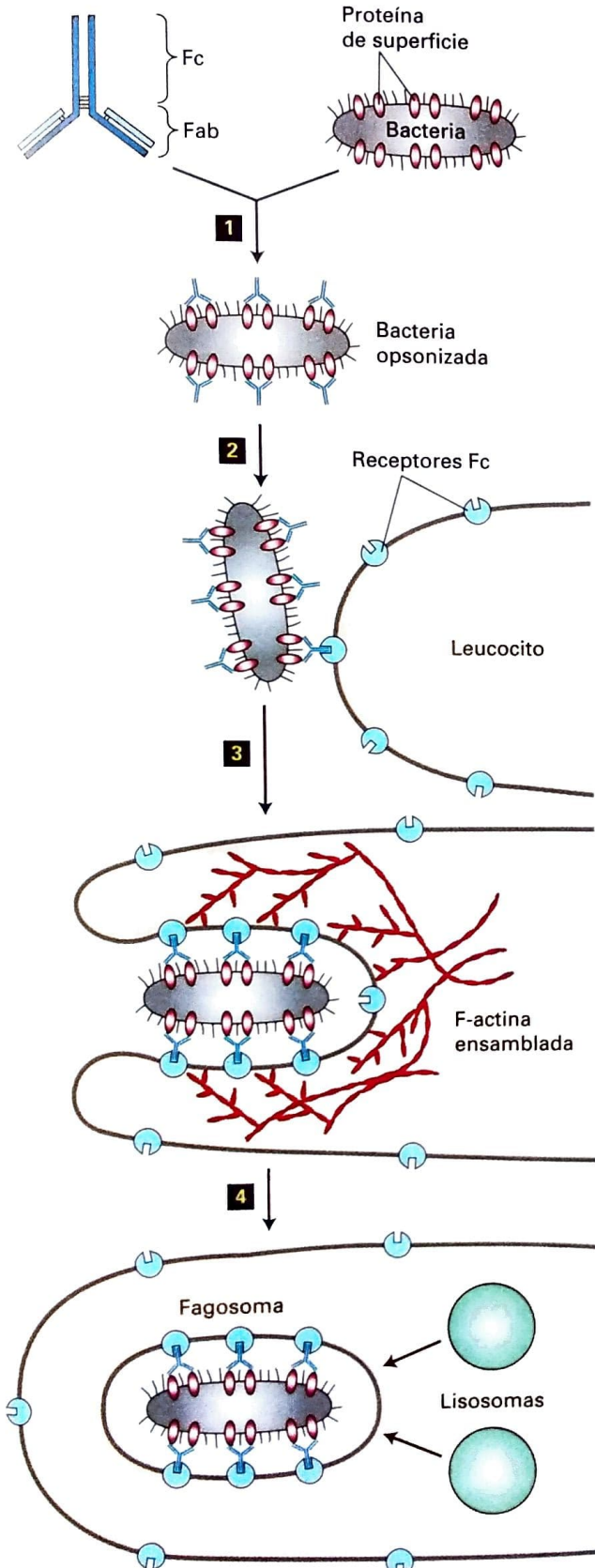


FIGURA 17-19 Fagocitosis y dinámica de la actina. El ensamblaje y la contracción de la actina impulsan la internalización de partículas fagocíticas. Aquí se muestra la fagocitosis y degradación de una bacteria por un leucocito. Una bacteria invasora es cubierta por anticuerpos específicos dirigidos a una proteína de la superficie de la célula en un proceso conocido como opsonización (paso **1**). La región Fc de los anticuerpos unidos se muestra en la superficie bacteriana y es reconocida por un receptor específico, el receptor de Fc, en la superficie de los leucocitos (paso **2**). Esta interacción da una señal a la célula para ensamblar una estructura de actina contráctil que resulta en la internalización y englobamiento de la bacteria (paso **3**). Una vez que se ha internalizado en un fagosoma, la bacteria es eliminada y degradada por enzimas de estos lisosomas (paso **4**).

nalizarlos. La captación de moléculas o de líquido es llamada endocitosis mediada por receptor o endocitosis de fase líquida y la captación de partículas grandes es llamada fagocitosis ("acto de comer de la célula"). Los microfilamentos participan en ambos procesos.

La endocitosis de fase líquida es un proceso muy organizado, y estudios recientes han demostrado que la potencia del ensamblaje de la actina contribuye a este mecanismo. Los factores de ensamblaje de la endocitosis reclutan NPF de modo tal que las vesículas endocíticas se invaginan y se desprenden de la membrana y luego son conducidas al citoplasma, impulsadas por un estallido rápido y muy breve (de unos pocos segundos) de polimerización de actina, guiada por el complejo Arp2/3 (Fig. 17-18a). Este movimiento basado en actina de las vesículas endocíticas que involucra al complejo Arp2/3 puede ser reconstituido in vitro (Fig. 17-18b) y es, desde el punto de vista operativo, muy semejante a la formación del borde conductor y la movilidad de *Listeria*.

La fagocitosis es un proceso vital en el reconocimiento y la eliminación de patógenos, como bacterias, por los glóbulos blancos. El sistema inmunitario identifica a las bacterias como material extraño y forma anticuerpos que reconocen componentes de su superficie. Como analizamos en el Capítulo 3, cada anticuerpo tiene una región llamada dominio Fab que se une de modo específico a su antígeno, en este caso, un componente en la superficie de la célula bacteriana. A medida que los anticuerpos cubren la bacteria mediante interacciones entre sus dominios Fab y el antígeno de la superficie celular, un segundo dominio de anticuerpo conocido como dominio Fc queda expuesto. Este proceso se denominó opsonización (Fig. 17-19, paso **1**). Los glóbulos blancos tienen un receptor en su superficie, el Fc, que reconoce a los anticuerpos de la bacteria; esta interacción señala a las células para que se unan y engloben al patógeno (pasos **2** y **3**). La señal también le dice a la célula que ensamble microfilamentos en el sitio de interacción con la bacteria y los microfilamentos ensamblados junto con las proteínas motoras de miosina proporcionan la fuerza necesaria para arrastrar a la bacteria al interior de la célula, finalmente englobándola por completo en la membrana plasmática (paso **4**). Una vez internalizado, el nuevo fagosoma se fusiona con los lisosomas, donde el patógeno es eliminado y degradado por las enzimas lisosómicas.

Las toxinas que perturban el depósito de monómeros de actina son útiles para estudiar la dinámica de esta

Ciertos hongos y esponjas han desarrollado toxinas que tienen como diana el ciclo de polimerización de la actina y, por lo tanto, son tóxicas para las células animales. Se han caracterizado dos tipos de toxinas. La primera clase está representada por dos toxinas no relacionadas, la citocalasina

D y la latrunculina, que promueven la despolimerización de los filamentos mediante mecanismos distintos. La citocalasina D, un alcaloide de los hongos, despolimeriza los filamentos de actina uniéndose al extremo (+) de la F-actina, donde bloquea la adición ulterior de subunidades. La latrunculina, una toxina secretada por las esponjas, se une a la G-actina y la secuestra, con lo que la inhibe de añadirse al extremo de un filamento. La exposición a cualquier toxina incrementa así el depósito de monómeros. Cuando la citocalasina D o la latrunculina se añaden a células vivas, el citoesqueleto de actina se desensambla y los movimientos celulares, tales como la locomoción y la citocinesis, quedan inhibidos. Estas observaciones se encuentran entre las primeras en comprometer a los filamentos de actina en la movilidad celular. La latrunculina es especialmente útil porque une monómeros de actina y evita cualquier nuevo ensamblaje de actina. Así, si se añade latrunculina a una célula, la velocidad a la cual las estructuras basadas en actina desaparecen refleja su velocidad normal de recambio. Esto ha revelado que algunas estructuras tienen vida media de menos de un minuto, mientras que otras son mucho más estables. Por ejemplo, los experimentos con latrunculina muestran que el borde conductor de las células móviles se recambia cada 30-180 segundos y que las fibras de estrés se recambian cada 5-10 minutos.

Por el contrario, el equilibrio monómero-polímero está desplazado en dirección de los filamentos por la jasplakinolida, otra toxina de las esponjas, y por la faloidina, aislada de *Amanita phalloides* (el hongo “ángel de la muerte”). La jasplakinolida incrementa la nucleación al unirse y estabilizar dímeros de actina y, por lo tanto, baja la concentración crítica. La faloidina se une a la interfase entre las subunidades de la F-actina fijando las subunidades adyacentes unidas y evitando que los filamentos de actina se despolimericen. Aun cuando la actina queda diluida por debajo de su concentración crítica, los filamentos estabilizados por faloidina no se despolimerizan. Dado que muchos procesos basados en actina dependen del recambio de filamentos de actina, la introducción de faloidina a una célula paraliza todos estos sistemas y la célula muere. Sin embargo, la faloidina ha sido muy útil a los investigadores, ya que la faloidina marcada en forma fluorescente que se une solamente a la F-actina, se emplea por lo común para teñir filamentos de actina para su visualización al microscopio óptico (Fig. 17-4).

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 17.3

Mecanismos de ensamblaje de los filamentos de actina

- El ensamblaje de actina está nucleado por dos clases de proteínas: las forminas nuclean el ensamblaje de filamentos no ramificados (véase Fig. 17-13), mientras que el complejo Arp2/3 nuclea el ensamblaje de redes de actina ramificadas (véase Fig. 17-15). Las actividades de las forminas y del Arp2/3 están reguladas por vías de transducción de las señales.
- Se ensamblan estructuras basadas en actina con funciones diferentes por acción de las forminas y de los nucleadores Arp2/3. Las forminas conducen el ensamblaje de fibras de tensión en el anillo contráctil, mientras que el Arp2/3 nuclea el ensamblaje de filamentos de actina ramificados presentes en el borde conductor de las células móviles.
- La potencia de la polimerización de actina puede ser empleada para hacer trabajo, como se ve en el movimiento intracelular dependiente de

Arp2/3 de las bacterias patógenas (véase Fig. 17-7) y en el movimiento hacia el interior de las vesículas endocíticas (véanse Figs. 17-18 y 17-19).

- Varias toxinas afectan la dinámica de la polimerización de actina; algunas, como la latrunculina, se unen y secuestran monómeros de actina, mientras que otras, como la faloidina, estabilizan la actina filamentosos. La faloidina marcada con fluorescencia es útil para teñir filamentos de actina.

17.4 Organización de las estructuras celulares basadas en actina

Hemos visto que los filamentos de actina se ensamblan en una gran variedad de distintas conformaciones y de qué manera muchas proteínas asociadas nuclean el ensamblaje de actina y regulan el recambio de los filamentos. Docenas de proteínas en las células de los vertebrados organizan estos filamentos en distintas estructuras funcionales. Aquí analizamos algunas de estas proteínas, dando ejemplos de tipos típicos de proteínas de entrecruzamiento de actina encontradas en las células, y también examinamos las proteínas implicadas en formar uniones funcionales entre la actina y las proteínas de la membrana. Un problema fascinante, del cual se sabe muy poco, es de qué manera las células se ensamblan en diferentes estructuras que emplean actina dentro del mismo citoplasma de una célula. Parte de esta organización podría deberse a la regulación local, un tópico que trataremos al final de este capítulo.

El entrecruzamiento de proteínas organiza los filamentos de actina en haces o redes

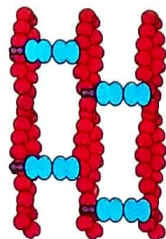
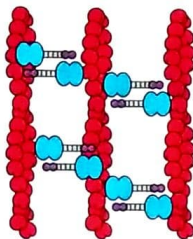
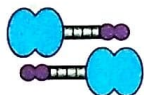
Cuando uno ensambla filamentos de actina en un tubo de ensayo, éstos forman una red enmarañada. En las células, sin embargo, los filamentos de actina se encuentran en una diversidad de estructuras distintas, como los haces de filamentos muy ordenados de las microvellosidades o la red característica del borde conductor (véase Fig. 17-4a). Estas organizaciones diferentes están determinadas por la presencia de proteínas de entrecruzamiento de la actina. Para poder organizar a la actina, una proteína de entrecruzamiento de actina debe tener dos sitios de unión de F-actina (Fig. 17-20a).

El entrecruzamiento de la F-actina puede lograrse con dos sitios de unión de actina en un mismo polipéptido, como ocurre con la *fimbrina*, una proteína presente en las microvellosidades que forma haces de filamentos con la misma polaridad (Fig. 17-20b). Otras proteínas de entrecruzamiento de la actina tienen un único sitio de unión a la actina en una cadena polipeptídica y luego dos cadenas asociadas para formar dímeros que mantienen juntos dos sitios de unión a la actina. Estas proteínas de entrecruzamiento dimericas pueden ensamblarse para generar un bastón rígido que conecte los dos sitios de unión, como ocurre con la α -actinina. Al igual que la fimbrina, la α -actinina también forma haces paralelos de filamentos de actina, pero mucho más separados que la fimbrina. Otra proteína llamada *espectrina* es un tetrámero con dos sitios de unión a la actina; la espectrina expande una distancia aún mayor entre los filamentos de actina y forma redes bajo la membrana plasmática (que se muestran en la Fig. 17-21 y se analizan en la siguiente sección). Otros tipos de proteínas de entrecruzamiento, como la *filamina*, tienen una región muy flexible entre los dos sitios

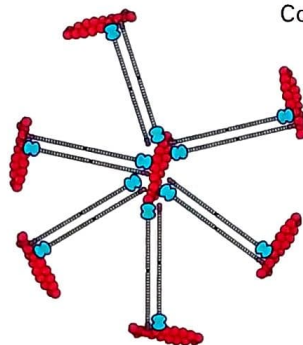
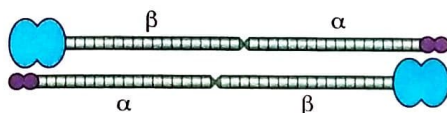
(a)

Localización:

Fimbrina

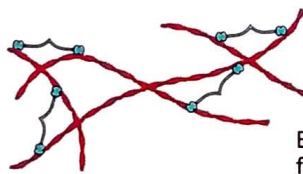
Microvellosidades,
filopodios,
adhesiones focales α -actininaFibras de tensión,
filopodios, línea Z
del músculo

Espectrina

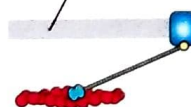


Corteza celular

Filamina

Borde conductor,
fibras de tensión,
filopodios

Distrofina

Membrana
plasmáticaProteínas de
vinculación de la
membrana a la
corteza de actina
en el músculo

(b)



(c)



FIGURA 17-20 Proteínas de entrecruzamiento de actina. Las proteínas de entrecruzamiento de actina moldean a los filamentos de F-actina en diversas estructuras. (a) Ejemplos de cuatro proteínas que entrecruzan la F-actina, todas las cuales tienen dos dominios (azul) que unen F-actina. Algunas tienen sitios de unión al Ca^{2+} (púrpura), lo cual inhibe su actividad a altos niveles de Ca^{2+} libre. También se muestra la distrofina, que tiene un sitio de unión a la actina en su extremo N-terminal y un dominio C-terminal que une la proteína de la membrana distroglicano. (b) Fotomicrografía electrónica de transmisión de

un corte fino de un estereocilio (un nombre inapropiado, dado que en realidad es una microvellosidad gigante) en una célula auditiva ciliada del oído interno. Esta estructura contiene un haz de filamentos de actina que se entrecruzan mediante la fimbrina, una proteína de entrecruzamiento pequeña que permite la interacción cercana y regular de los filamentos de actina. (c) Proteínas de entrecruzamiento largas como la filamina son flexibles y así pueden entrecruzar los filamentos de actina en una red laxa. (Parte [b] de L. G. Tilney, 1983, *J. Cell Biol.* **96**:822, parte [c] cortesía de J. Hartwig.)

de unión, operando como un resorte de plano, de modo que pueden estabilizar los entrecruzamientos entre los filamentos de una red (Fig. 17-20c), como se encuentra en el borde conductor de las células móviles. El complejo Arp2/3, que analizamos en términos de su capacidad de nuclear los filamentos de actina, también es una proteína de entrecruzamiento importante, al unir el extremo (-) de un filamento al lado de otro filamento, (véase Fig. 17-15).

Las proteínas adaptadoras vinculan los filamentos de actina con las membranas

Para contribuir a la estructura de las células y también para emplear la potencia de la polimerización de la actina, los filamentos de actina con frecuencia están unidos a las membranas o asociados con estructuras intracelulares. Los filamentos de actina son especialmente abundantes

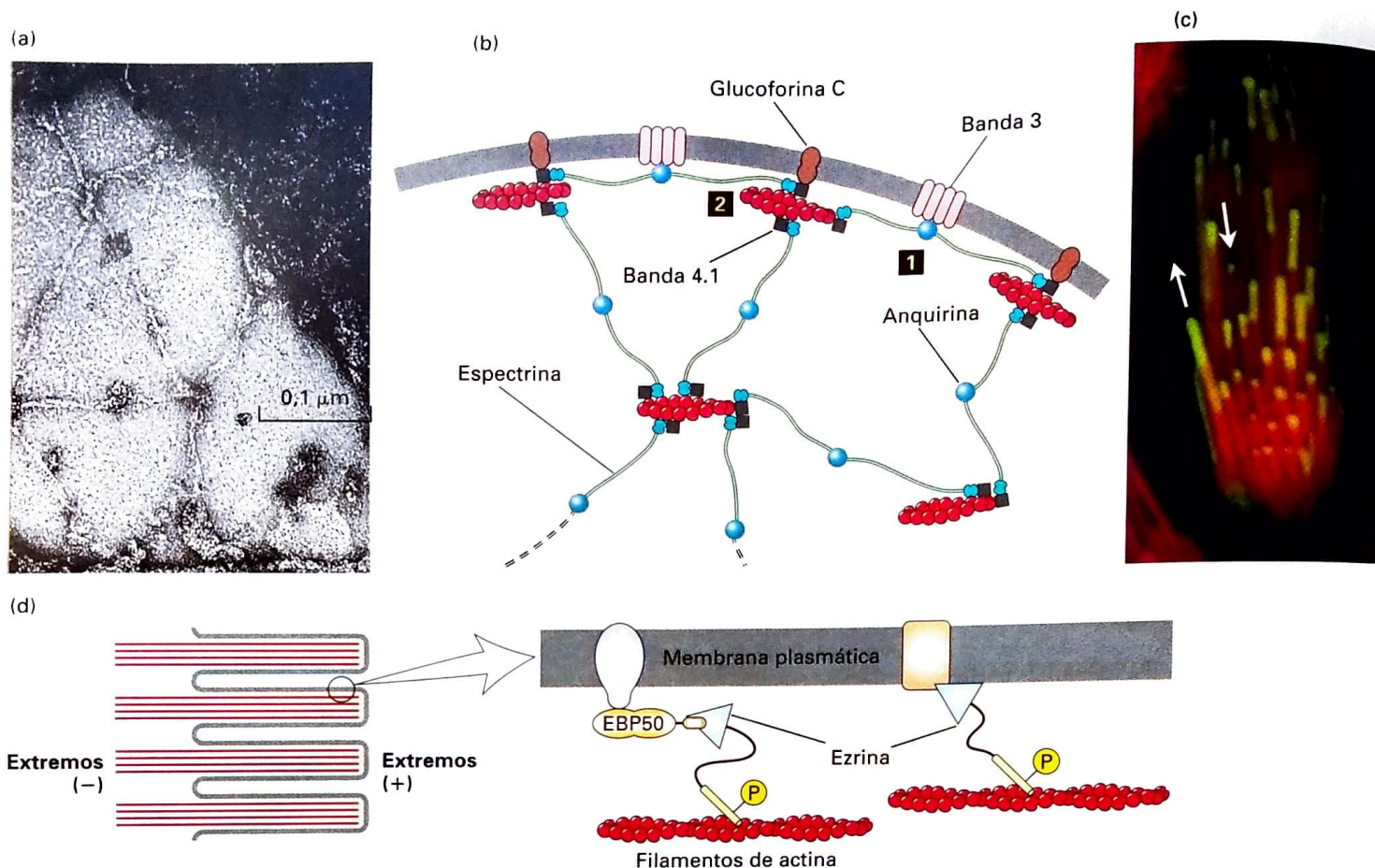


FIGURA 17-21 Unión lateral de los microfilamentos a las membranas.

(a) Fotomicrografía electrónica de la membrana del eritrocito que muestra la organización del centro y el radio del citoesqueleto cortical que sostiene la membrana plasmática de los eritrocitos humanos. Los largos rayos están compuestos principalmente por espectrina y puede verse que se intersectan en los núcleos o sitios de unión a la membrana. Los puntos más oscuros a lo largo de los rayos son moléculas de anquirina, que entrecruzan espectrina a las proteínas integrales de la membrana. (b) Diagrama del citoesqueleto de los eritrocitos que muestran los dos tipos principales de unión a la membrana: 1. anquirina y 2. banda 4.1. (c) La actina se incorpora al extremo de los estereocilios (microvellosidades gigantes). Las células con estereocilios fueron transfectadas para que expresasen PFV-actina durante un breve

período y luego se contratiñeron con rodamina-faloidina para que tiñeran toda la F-actina. El experimento muestra que se incorpora actina nueva a los extremos de los estereocilios. (d) La ezrina, un miembro de la familia ezrina-radixina-moesina (ERM), une filamentos de actina lateralmente a la membrana plasmática en estructuras de superficie como las microvellosidades; la unión puede ser directa o indirecta. La ezrina, activada por la fosforilación (P), se une directamente a la región citoplasmática de las proteínas transmembrana (derecha) o indirectamente a través de una proteína de andamiaje como la EBP50 (izquierda). (Parte [a] de T. J. Byers y D. Branton, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:6153, cortesía de D. Branton; parte [b] adaptada de S. E. Lux, 1979, *Nature*, **281**:426 y E. J. Luna y A. L. Hitt, 1992, *Science* **258**:955; parte [c] de A. K. Rzaizinska y cols., 2004, *J. Cell Biol.* **164**:887; parte [d] adaptada de R. G. Fehon y cols., 2010, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **11**:276)

en la corteza celular subyacente a la membrana plasmática, a la cual proporcionan sostén. Los filamentos de actina pueden interactuar con las membranas lateralmente o en sus extremos.

Nuestro primer ejemplo de filamentos de actina unidos a las membranas es el eritrocito humano —el glóbulo rojo—. El eritrocito consiste básicamente en una membrana plasmática que encierra una alta concentración de la proteína hemoglobina que transporta oxígeno desde los pulmones a los tejidos y dióxido de carbono desde los tejidos nuevamente hacia los pulmones —todo impulsado por el magnífico músculo conocido como corazón—. Los eritrocitos deben poder sobrevivir en torrentes embravecidos de flujo sanguíneo en el corazón, luego fluir a lo largo de las arterias y sobrevivir al estrechamiento en capilares delgados, antes de ser enviados hacia los pulmones, vía el corazón. Para sobrevivir a este proceso agotador durante miles de ciclos, los eritrocitos tienen una red de microfilamentos que subyacen a su membrana

plasmática, lo cual les confiere tanto la fuerza ténsil como la flexibilidad necesaria para su travesía. Esta red se basa sobre filamentos de actina cortos de aproximadamente 14 subunidades de longitud, estabilizados en sus costados por la tropomiosina (analizada en más detalle en la Sección 17.6) y por la proteína formadora de casquete tropomodulina, que se encuentra en el extremo (–). Estos filamentos cortos sirven como centros para la unión de aproximadamente seis moléculas flexibles de espectrina, lo cual genera un tipo de estructura como una red de pescador (Fig. 17-21a). Esta red da al eritrocito tanto su fuerza como su flexibilidad. La espectrina se encuentra unida a las proteínas de membrana por dos mecanismos: mediante una proteína llamada *anquirina* al transportador de bicarbonato (una proteína transmembrana conocida también como *banda 3*) y mediante una espectrina y una proteína de unión a la F-actina llamada *banda 4.1* a otra proteína transmembrana llamada *glucoforina C* (Fig. 17-21b). Si bien esta red basada en la

espectrina está muy desarrollada en el eritrocito, hay enlaces similares en muchos tipos celulares. Por ejemplo, un tipo relacionado de enlace anquirina-espectrina une la ATPasa Na^+/K^+ al citoesqueleto de actina de la membrana basolateral de las células epiteliales.

 Los defectos genéticos de las proteínas del citoesqueleto del glóbulo rojo pueden dar como resultado células que se rompan con facilidad, lo que genera enfermedades conocidas como anemias esferocíticas hereditarias (*esferocíticas* porque las células son redondeadas, *anemias* porque hay una reducción de los glóbulos rojos) y así una esperanza de vida más breve. En los pacientes humanos, las mutaciones en la espectrina, la banda 4.1 y la anquirina pueden provocar esta enfermedad. ■

Además del tipo de sostén dependiente de la espectrina en la corteza celular, los microfilamentos proporcionan el soporte para estructuras de la superficie de la célula, como microvellosidades y ondulaciones de la membrana. Si miramos una microvellosidad, queda claro que debe tener una unión en la zona final en el extremo y uniones laterales a lo largo de su longitud. ¿Cuál es la orientación de los filamentos de actina de las microvellosidades? La decoración de los filamentos de las microvellosidades por el fragmento S1 de la miosina demuestra que es el extremo (+) en la punta. Más aun, cuando se añade actina fluorescente a una célula, ésta se incorpora en el extremo de una microvellosidad, mostrando que no sólo el extremo (+) está allí, sino que el ensamblaje de los filamentos de actina ocurre allí (Fig. 17-21c). En la actualidad, se desconoce de qué manera los filamentos de actina están unidos en el extremo de la microvellosidad, pero un candidato probable es una proteína formina. Esta orientación al extremo (+) de los filamentos de actina con respecto a la membrana plasmática se encuentra casi universalmente —no simplemente en las microvellosidades, sino también, por ejemplo, en el borde conductor de las células móviles—. Las uniones laterales a la membrana plasmática son proporcionadas, al menos parcialmente, por la familia de proteínas ERM (*eZRina-radixina-moesina*). Éstas son proteínas reguladas que existen en una forma plegada, inactiva. Cuando se activan por la fosforilación en respuesta a una señal externa, los sitios de unión de la F-actina y de unión a la membrana de esta proteína ERM quedan expuestos para proporcionar una unión lateral a los filamentos de actina (Fig. 17-21d). En la membrana plasmática, las proteínas ERM pueden unir los filamentos de actina en forma directa o indirecta, mediante proteínas de andamiaje al dominio citoplasmático de las proteínas de la membrana.

Los tipos de enlaces de la actina de la membrana que hemos analizado hasta el momento no implican áreas de la membrana plasmática unidas directamente a otras células en un tejido o a la matriz extracelular. El contacto entre las células epiteliales está mediado por regiones muy especializadas de la membrana llamadas *uniones adherentes* (véase Fig. 17-1b). Otras regiones especializadas de asociación llamadas *adhesiones focales* median la unión de las células a la matriz extracelular. A su vez, estos tipos especializados de uniones se conectan con el citoesqueleto, como describiremos con mayor detalle cuando analicemos la migración celular (Sección 17.7) y las células en el contexto de los tejidos (Cap. 20).

 Las distrofias musculares son enfermedades genéticas caracterizadas con frecuencia por el debilitamiento progresivo del músculo esquelético. Una de estas enfermedades genéticas, la distrofia muscular de Duchenne, afecta a la proteína distrofina, cuyo gen se encuentra localizado en el cromosoma X y, de este modo, la enfermedad es mucho

más prevalente en los hombres. La *distrofina* es una proteína modular cuya función es vincular la red de actina cortical de las células musculares con un complejo de proteínas de membrana que se unen a la matriz extracelular. Así, la distrofina tiene un dominio de unión a actina N-terminal, seguido de una serie de repeticiones del tipo de la espectrina y terminando en un dominio que une el complejo transmembrana distroglucano con la proteína de la matriz extracelular laminina (véase Fig. 17-20a). En ausencia de distrofina, la membrana plasmática de las células musculares se debilita por los ciclos de contracción muscular y finalmente se rompe, dando como resultado la muerte de las miofibrillas musculares. ■

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 17.4

Organización de las estructuras celulares basadas en la actina

- Los filamentos de actina se organizan por el entrecruzamiento de proteínas que tienen dos sitios de unión a la F-actina. Las proteínas de entrecruzamiento de actina pueden ser largas o cortas, rígidas o flexibles, lo cual depende del tipo de estructura involucrada (véase Fig. 17-20).
- Los filamentos de actina se unen lateralmente a la membrana plasmática mediante clases de proteínas específicas, como se ve en el glóbulo rojo o en las estructuras de la superficie celular como las microvellosidades (véase Fig. 17-21).
- El extremo (+) de los filamentos de actina también puede unirse a las membranas y este ensamblaje está mediado entre el extremo del filamento y la membrana.
- Varias enfermedades han encontrado su causa en defectos en el citoesqueleto cortical basado en microfilamentos que está por debajo de la membrana plasmática.

17.5 Las miosinas: proteínas motoras basadas en actina

En la Sección 17.3 analizamos el modo en que la polimerización de la actina nucleada por el complejo Arp2/3 puede ser utilizada para hacer trabajo, tal como el movimiento de las vesículas durante la endocitosis, en el borde conductor de las células móviles y la propulsión de la bacteria *Listeria* a través de la célula eucarionte. Además de la movilidad basada en la polimerización de la actina, las células tienen una gran familia de proteínas motoras llamadas **miosinas** que pueden moverse a lo largo de los filamentos de actina. La primera miosina descubierta, la miosina II, fue aislada del músculo esquelético. Durante mucho tiempo, los biólogos pensaron que este era el único tipo de miosina que se encontraba en la naturaleza. Sin embargo, luego descubrieron otros tipos de miosinas y comenzaron a preguntarse cuántas clases funcionales diferentes podrían existir. Hoy sabemos que hay varias clases diferentes de miosinas, además de la miosina II del músculo esquelético que se mueve a lo largo de la actina. De hecho, con el descubrimiento y el análisis de todos estos motores basados en la actina y los motores correspondientes basados en los microtúbulos descritos en el capítulo siguiente, la visión anterior relativamente estática de una célula ha sido reemplazada con la toma de cono-

cimiento de que el citoplasma es increíblemente dinámico –más similar a un sistema organizado pero muy transitado de carreteras con motores que transportan los componentes con gran actividad–.

Las miosinas tienen la capacidad sorprendente de convertir la energía liberada por la hidrólisis de ATP en trabajo mecánico (movimiento a lo largo de la actina). Todas las miosinas convierten la hidrólisis de ATP en trabajo, si bien diferentes miosinas pueden llevar a cabo funciones muy distintas. Por ejemplo, muchas moléculas de miosina II se arrastran juntas sobre los filamentos de actina para llevar a cabo la contracción muscular, mientras que la miosina V se une a la carga vesicular para transportarla a lo largo de los filamentos de actina. Las otras clases de miosina proporcionan una miríada de funciones, desde el movimiento de orgánulos alrededor de la célula hasta la contribución en la migración de las células.

Para comenzar a comprender las miosinas, analizamos primero su organización general en dominios. Con esta información, exploramos

la diversidad de las miosinas de diferentes organismos y describimos con mayor detalle algunas de las que son comunes en los eucariontes. Para comprender de qué modo las diversas funciones pueden ser acomodadas por un tipo de mecanismo motor, investigaremos los mecanismos básicos del modo en que la energía liberada por la hidrólisis de ATP se convierte en trabajo y luego vemos de qué modo este mecanismo se modifica para adecuarse a las propiedades de las clases específicas de miosinas para sus funciones específicas.

Las miosinas tienen dominios cabeza, cuello y cola con diferentes funciones

Mucho de lo que se sabe acerca de las miosinas proviene de estudios de la miosina II aislada del músculo esquelético. En el músculo esquelético, cientos de moléculas de miosina II individuales se ensamblan en haces llamados filamentos gruesos bipolares (Fig. 17-22a). En una sección posterior,

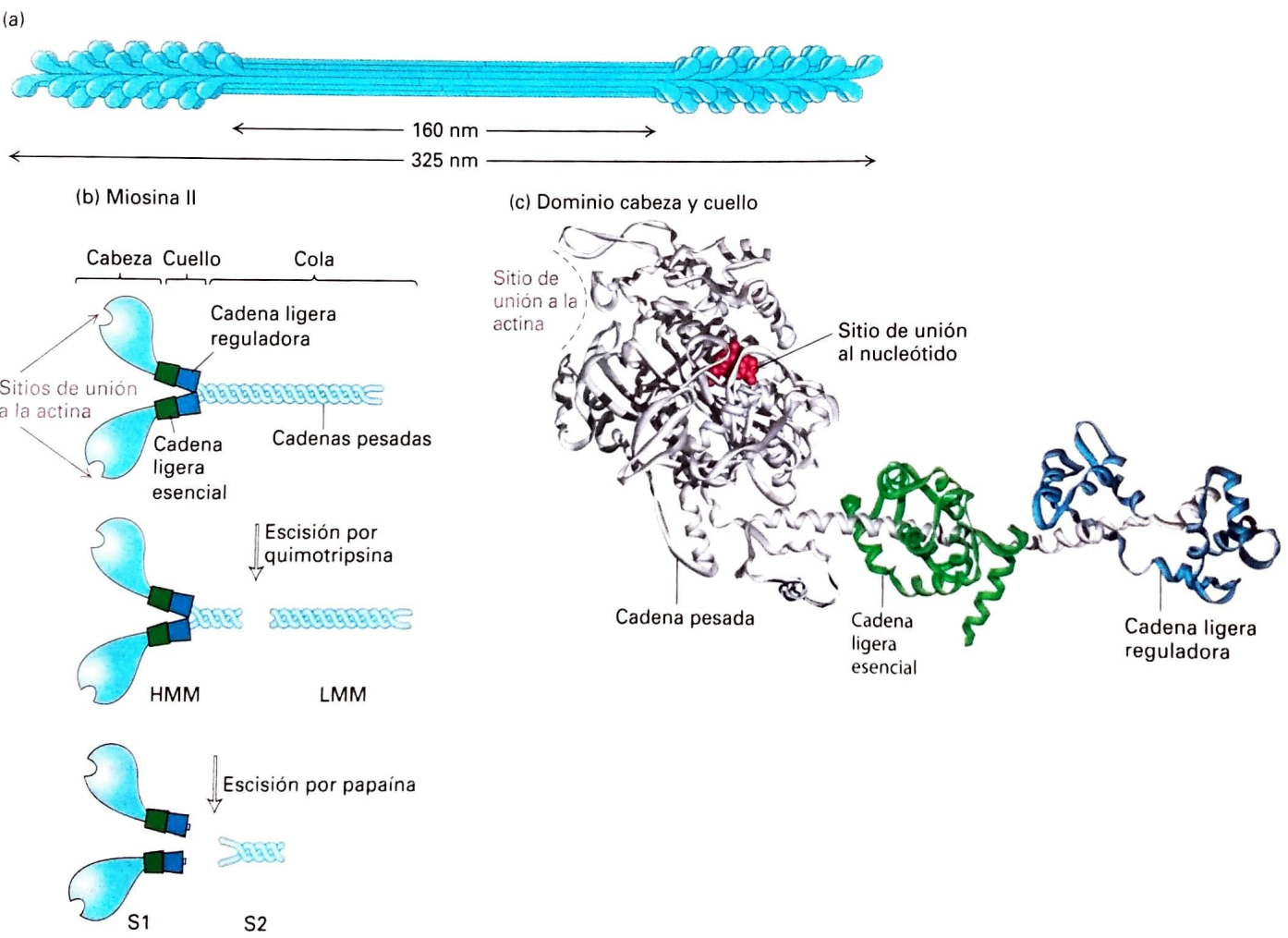


FIGURA 17-22 Estructura de la miosina II. (a) Organización de la miosina II en filamentos aislados de músculo esquelético. La miosina II se ensambla en fragmentos bipolares en los cuales las colas forman el tallo del filamento y las cabezas quedan expuestas en los extremos. La extracción de los filamentos bipolares con elevada sal y ATP desensambla éste en moléculas individuales de miosina II. (b) Las moléculas de miosina II consisten en dos cadenas pesadas idénticas (azul claro) y cuatro cadenas ligeras (verde y azul oscuro). La cola de las cadenas pesadas forma una espiral enrollada que se dimeriza; la región del cuello de cada cadena pesada tiene dos cadenas ligeras asociadas con

ella. La escisión proteolítica limitada de la miosina II genera fragmentos de la cola –LMM y S2– y el dominio motor S1. (c) Modelo tridimensional de un dominio de la cabeza S1 simple que muestra que tiene una forma curva, alargada, biseccionada por un surco. El bolsillo de unión al nucleótido descansa a un lado de este surco y el sitio de unión de la actina se encuentra en el otro lado, cerca del extremo de la cabeza. Envueltas alrededor del tallo del cuello helicoidal o se encuentran dos cadenas ligeras. Estas cadenas dan rigidez al cuello, de modo que puede actuar como un brazo de palanca para la cabeza. Aquí se muestra la conformación unida al ADP.

analizaremos de qué modo estos filamentos de miosina se interdigitan con filamentos de actina para llevar a cabo la contracción muscular. Aquí investigamos primero las propiedades de la molécula de miosina individual.

Es posible disolver el filamento grueso de miosina en una solución de ATP y alta concentración salina, generando un depósito de moléculas de miosina II individuales. La molécula de miosina II soluble es, de hecho, un complejo proteico formado por seis polipéptidos. Dos de las subunidades son polipéptidos de alto peso molecular, idénticos, conocidos como cadenas pesadas de la miosina. Cada una de ellas consiste en un dominio globular de *cabeza* y un dominio largo de *cola*, conectados por un dominio de *cuello* flexible. Las colas de las dos cadenas pesadas de la miosina se entretrejen, de modo que las regiones de la cabeza se encuentran próximas. Las cuatro subunidades remanentes del complejo de miosina son de tamaño más pequeño y se conocen como cadena ligera. Hay dos tipos de cadena ligera, la *cadena ligera esencial* y la *cadena ligera reguladora*. Una cadena ligera de cada tipo se asocia con la región del cuello de cada cadena pesada (Fig. 17-22b, *arriba*). La cadena pesada de la miosina y los dos tipos de cadenas ligeras están codificados por tres genes distintos.

La molécula soluble de miosina II tiene una actividad ATPasa, lo cual refleja su capacidad para impulsar movimientos por la hidrólisis de ATP. Pero ¿qué parte del complejo de miosina es responsable de esta actividad? Para identificar los dominios funcionales de una proteína, un abordaje estándar consiste en escindir la proteína en fragmentos con proteasas específicas y luego preguntarse qué fragmentos tienen actividad. La miosina II soluble puede escindirse con un tratamiento suave, con la proteasa quimotripsina para dar dos fragmentos: uno llamado meromiosina pesada (HMM, *heavy meromyosin*; *mero* significa “parte de”) y la otra meromiosina ligera (LMM, *light meromyosin*) (Fig. 17-22b, *medio*). La meromiosina pesada puede escindirse adicionalmente por acción de la proteasa papaína, dando un subfragmento 1 (S1) y un subfragmento 2 (S2) (Fig. 17-22b, *abajo*). Al analizar las propiedades de varios fragmentos –S1, S2 y LMM–, se encontró que la actividad de ATPasa intrínseca de la miosina reside en el fragmento S1, al igual que el sitio de unión de la F-actina. Más aún, se encontró

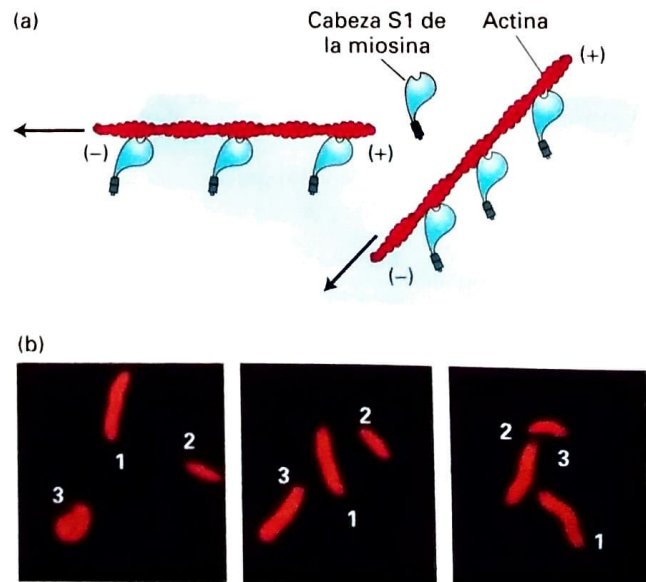
que la actividad de ATPasa del fragmento S1 se incrementaba en gran medida por la presencia de actina filamentososa, de modo que se dice que tiene una *actividad ATPasa activada por actina*, que es un sello de todas las miosinas. El fragmento S1 de la miosina II consiste en los dominios de la cabeza y el cuello asociados con cadenas ligeras, mientras que las regiones S2 y LMM constituyen el dominio de la cola.

El análisis cristalográfico por rayos X de la cabeza y el cuello reveló su forma, la posición de las cadenas ligeras y las localizaciones de los sitios de unión al ATP y a la actina (Fig. 17-22c). En la base de la cabeza de miosina se encuentra el cuello helicoidal α , en el cual las dos moléculas de cadena ligera se enrollan alrededor del cuello como si fueran pinzas C. En esta posición, las cadenas ligeras vuelven rígida la región del cuello. El sitio de unión a la actina es una región expuesta en el extremo del dominio de la cabeza; el sitio de unión al ATP también está en el dominio de la cabeza con un surco opuesto al sitio de unión a la actina.

¿Cuánta miosina II es necesaria y suficiente para la actividad de “motor”? Para responder esta pregunta es necesario un ensayo de movilidad *in vitro* simple. En un ensayo de este tipo, el *ensayo de filamento deslizante*, las moléculas de miosina son unidas a un portaobjetos al que se le añaden filamentos de actina marcados en forma fluorescente, estabilizados. Dado que las moléculas de miosina se encuentran adheridas, no pueden deslizarse; de modo tal que cualquier fuerza generada por la interacción de las cabezas de miosina con los filamentos de actina fuerza a los filamentos a moverse con relación a la miosina (Fig. 17-23a). Si hay ATP presente, los filamentos de actina añadidos pueden verse deslizar a lo largo de la superficie del cubreobjetos; si no hay ATP presente, no se observa movimiento del filamento. Empleando este ensayo puede mostrarse que la cabeza S1 de la miosina II es suficiente para generar el movimiento de los filamentos de actina. Este movimiento es provocado por los fragmentos S1 de miosina unidos (adheridos también al cubreobjetos), intentando “moverse” hacia el extremo (+) de un filamento; así, los filamentos se mueven guiados por el extremo (–). La velocidad a la cual la miosina mueve un filamento de actina puede ser determinada a partir de los registros de video de los ensayos de filamento deslizante (Fig. 17-23b).

ANIMACIÓN TÉCNICA: Ensayo de movilidad *in vitro* de la miosina

FIGURA EXPERIMENTAL 17-23 El ensayo de deslizamiento de los filamentos es empleado para detectar el movimiento impulsado por la miosina. (a) Después de que las moléculas de miosina son adsorbidas sobre la superficie de un cubreobjetos de vidrio, el exceso de miosina no unida se elimina; entonces este cubreobjetos se ubica con el lado de la miosina hacia abajo sobre un portaobjetos de vidrio, formando una cámara a través de la cual pueden fluir las soluciones. Una solución de filamentos de actina, que se vuelve visible y estable al teñirla con faloidina marcada con rodamina, puede fluir al interior de la cámara. En presencia de ATP, las cabezas de miosina avanzan hacia el extremo (+) de los filamentos, por el mecanismo que se ilustra en la Figura 17-26. Dado que las colas de miosina están inmovilizadas, el desplazamiento de las cabezas hacia los extremos (+) provoca el deslizamiento de los filamentos, los cuales parecen estar moviéndose con sus extremos (–) abriendo paso. El movimiento de los filamentos individuales puede observarse con un microscopio óptico de fluorescencia. (b) Estas fotografías muestran las posiciones de tres filamentos de actina (numerados como 1, 2, 3) a intervalos de 30 segundos registrados por un videomicroscopio. La velocidad del movimiento de los filamentos puede determinarse a partir de estas grabaciones. (Parte [b] cortesía de M. Footer y S. Kron.)



Todas las miosinas tienen un dominio relacionado con el dominio S1 de la miosina II, que comprende los dominios de la cabeza y el cuello, que es responsable de su actividad motora. Sin embargo, como veremos en una sección posterior, la longitud del dominio del cuello y el número y tipo de cadenas ligeras asociadas con él varían en diferentes clases de miosinas. El dominio de la cola no contribuye a la movilidad, sino que define qué se mueve por acción del dominio relacionado con S1. Así, como podría esperarse, los dominios de la cola pueden ser muy distintos y están diseñados para unirse a cargas específicas.

Las miosinas constituyen una gran familia de proteínas motoras mecanoquímicas

Dado que todas las miosinas tienen dominios motores S1 relacionados con considerable similitud en su secuencia primaria de aminoácidos, es posible determinar cuántos genes de miosina y cuántas clases distintas de ella existen en un genoma secuenciado. Hay aproximadamente 40 genes de miosina en el genoma humano (Fig. 17-24), 9 en *Drosophila* y 5 en una levadura en gemación. El análisis por computadora de las relaciones de secuencia entre los dominios de las cabezas de miosina

sugiere que han evolucionado unas 20 clases distintas de miosina en los eucariontes, con mayor similitud de secuencia dentro de una clase que entre ellas. Como se indicó en la Figura 17-24, las bases genéticas para ciertas enfermedades han sido rastreadas hasta los genes que codifican las miosinas. Todos los dominios de las cabezas de la miosina convierten la hidrólisis de ATP en trabajo mecánico, empleando el mismo mecanismo general. Sin embargo, como veremos, diferencias sutiles en este mecanismo pueden tener profundos efectos en las propiedades funcionales de las diferentes clases de miosina. ¿De qué manera se relacionan estas clases distintas con los dominios de la cola? Resulta sorprendente, si uno toma solamente las secuencias proteicas de los dominios de la cola de las miosinas y emplea esta información para ubicarlas en clases, el que caigan dentro de los mismos agrupamientos que los dominios motores. Esto implica que los dominios de la cabeza, con propiedades específicas, han coevolucionado con clases específicas de dominios de la cola, lo cual tiene mucho sentido y sugiere que cada clase de miosina ha evolucionado para llevar a cabo una función específica.

Entre todas las clases distintas de miosina, hay tres especialmente bien estudiadas, que se encuentran comúnmente en animales y hongos: las llamadas familias de *miosina I*, *miosina II* y *miosina V* (Fig. 17-25). En los seres humanos, 8 genes codifican las cadenas pesadas para la familia de la miosina I, 14 para la familia de la miosina II y tres para la familia de la miosina V (véase Fig. 17-24).

La miosina clase II se ensambla en fragmentos bipolares, con orientaciones opuestas en cada mitad del filamento bipolar, de modo tal que hay un racimo de dominios de la cabeza en cada extremo del filamento. Esta organización es importante por su participación en la contracción; de hecho, ésta es la única clase de miosinas implicada en las funciones contráctiles. El gran número de miembros de esta clase refleja la necesidad de filamentos de miosina II, con propiedades contráctiles ligeramente distintas que están presentes en los diferentes músculos (p. ej., esquelético, cardíaco y varios tipos de músculo liso), como así en las células no musculares.

La miosina clase II es la única que se ensambla en filamentos bipolares. Todos los miembros de la miosina II tienen un dominio de cuello relativamente corto, con dos cadenas ligeras por cada cadena pesada. La miosina clase I es bastante grande, tiene un número variable de cadenas ligeras asociadas con la región del cuello, y es la única en la cual las dos cadenas pesadas no están asociadas a través de sus dominios de la cola, por lo que tienen una cabeza única. El gran tamaño y diversidad de la miosina clase I sugiere que estas miosinas desempeñan muchas funciones, gran parte de las cuales aún no se han determinado, pero algunos miembros de esta familia conectan los filamentos de actina con las membranas y otros están implicados en la endocitosis. Los miembros de la miosina clase V tienen dos cadenas pesadas, lo que proporciona un motor con dos cabezas, largas regiones de cuello, con seis cadenas ligeras cada una y regiones de la cola que se dimerizan y terminan en dominios que se unen a orgánulos específicos que deben ser transportados. Como veremos en breve, la longitud de la región del cuello afecta la velocidad de movimiento de la miosina.

En cada caso que ha sido probado hasta el momento, las miosinas se mueven hacia el extremo (+) de un filamento de actina –con una excepción, la *miosina VI* presente en los animales. Esta notable miosina tiene un inserto en su dominio de la cabeza para que trabaje en dirección opuesta, de modo tal que la movilidad es hacia el extremo (–) de un filamento de actina. Se cree que la miosina VI contribuye a la endocitosis, al mover las vesículas endocíticas a lo largo de los filamentos de actina, alejándolas de la membrana plasmática. Recuérdese que los

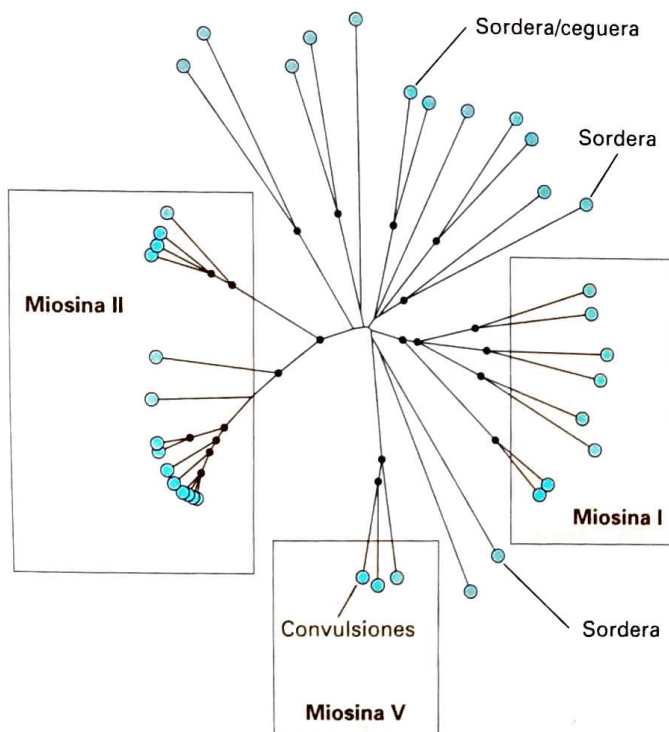


FIGURA 17-24 La superfamilia de miosina en los humanos. Análisis por computadora de la relación entre los dominios de la cabeza S1 de todas las aproximadamente 40 miosinas codificadas por el genoma humano. Cada miosina está indicada por un punto azul y la longitud de las líneas negras indican las relaciones de distancia filogenética. Así, las miosinas conectadas por líneas cortas están muy relacionadas, mientras que las separadas por las líneas largas están más distantemente vinculadas. Entre estas miosinas hay tres clases –miosinas I, II y V–, ampliamente representadas entre los eucariontes y las otras tienen funciones más especializadas. Se indican los ejemplos en los cuales la pérdida de una miosina específica provoca una enfermedad. (Redibujado y modificado de R. E. Cheney, 2001, *Mol. Biol. Cell* 12:780.)

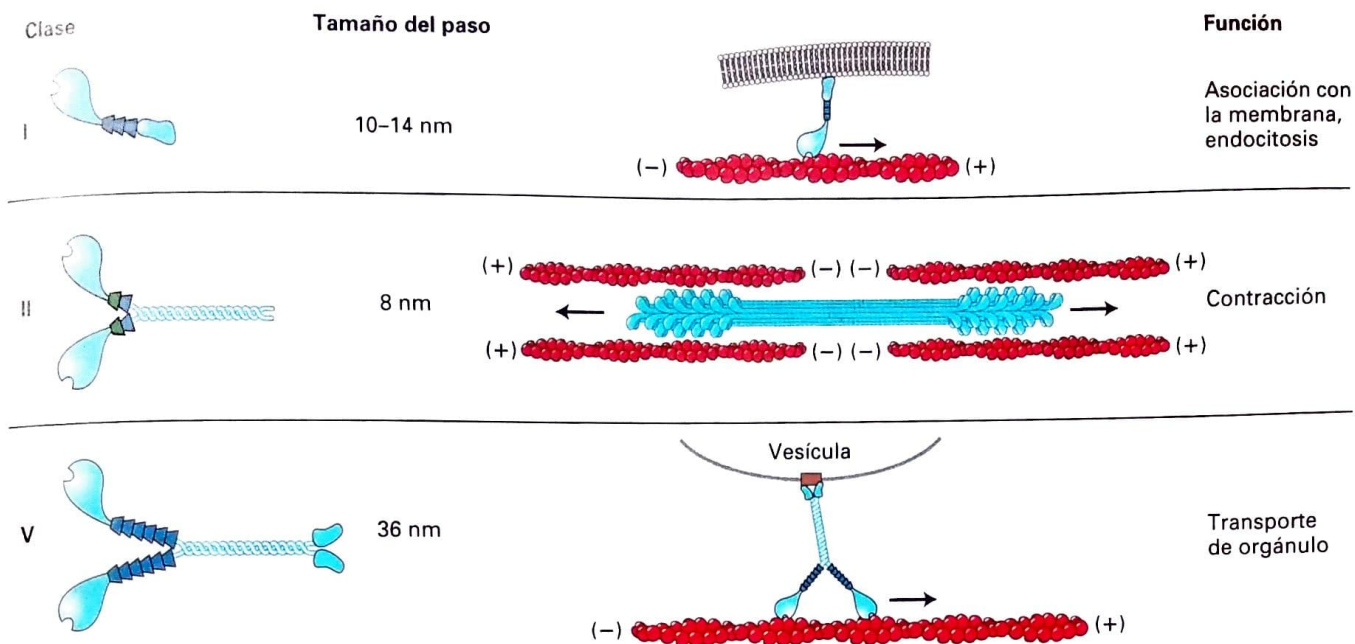


FIGURA 17-25 Tres clases comunes de miosina. La miosina I consiste en un dominio de la cabeza con un número variable de cadenas ligeras asociadas con el dominio del cuello. Los miembros de la clase de miosina I son las únicas miosinas que tienen un solo dominio de cabeza simple. Se cree que algunas de estas miosinas se asocian directamente con membranas por medio de interacciones lipídicas. Las miosinas II tienen dos dominios de la cabeza y dos

cadenas ligeras por cada cuello y son la única clase que puede ensamblarse en filamentos bipolares. Las miosinas V tienen dos dominios de la cabeza y seis cadenas ligeras por cuello. Unen receptores específicos (recuadro pardo) en los orgánulos que transportan. Todas las miosinas de estas tres clases se mueven hacia el extremo (+) de los filamentos de actina.

filamentos asociados con la membrana plasmática tienen sus extremos (+) hacia la membrana, de modo tal que un motor dirigido hacia el extremo (-) las alejará de la membrana hacia el centro de la célula.

Los cambios de conformación en la cabeza de la miosina acoplan la hidrólisis del ATP al movimiento

Los estudios de contracción muscular proporcionaron la primera evidencia de que las cabezas de la miosina se deslizan o caminan a lo largo de los filamentos de actina. El descubrimiento del mecanismo de la contracción muscular tuvo una gran ayuda dada por el desarrollo de los ensayos de movilidad in vitro y de las mediciones de fuerza de una molécula individual. Sobre la base de la información obtenida con estas técnicas y la estructura tridimensional de la cabeza de la miosina (véase Fig. 17-22c), los investigadores desarrollaron un modelo general del modo en que la miosina emplea la energía liberada por la hidrólisis de ATP para moverse a lo largo de un filamento de actina (Fig. 17-26). Dado que se piensa que todas las miosinas emplean el mismo mecanismo básico para generar movimiento, ignoraremos si la cola de miosina está unida a una vesícula o si es parte de un filamento grueso, como en el músculo. El aspecto más importante de este modelo es que la hidrólisis de una única molécula de ATP está acoplada a cada paso tomado por una molécula de miosina, junto con un filamento de actina.

¿De qué manera la miosina puede convertir la energía química liberada por la hidrólisis de ATP en trabajo mecánico? Esta pregunta ha intrigado durante largo tiempo a los biólogos. Se supo durante largo tiempo que la cabeza S1 de la miosina es una ATPasa, que tiene la capacidad de hidrolizar ATP a ADP + P_i . El análisis bioquímico reveló el mecanismo del movimiento de la miosina (Fig. 17-26a). En ausencia de ATP, la cabeza de miosina se une muy estrechamente a la F-actina. Cuando se une el ATP, la afinidad de la cabeza por la F-actina se reduce

en gran medida y se libera desde la actina. La cabeza de la miosina hidroliza entonces ATP y los productos de hidrólisis, ADP y P_i , permanecen unidos. La energía proporcionada por la hidrólisis de ATP induce un cambio de conformación en la cabeza que resulta en la rotación del dominio de la cabeza con respecto al cuello. Esto se conoce como la "posición de rigor" de la cabeza (Fig. 17-26b, arriba). En ausencia de F-actina, la liberación de P_i es excepcionalmente lenta —la parte más lenta del ciclo de la ATPasa—. Sin embargo, en presencia de actina, la cabeza une fuertemente a la F-actina, e induce tanto la liberación de P_i como la rotación de la cabeza nuevamente a su posición original, moviendo así el filamento de actina con relación al dominio del cuello (Fig. 17-26b, abajo). De este modo, la unión a la F-actina induce el movimiento de la cabeza y la liberación del P_i , acoplando de este modo ambos procesos. Este paso se conoce como el *golpe impulsor*. La cabeza permanece unida hasta que el ADP se va y un ATP nuevo se une a la cabeza, liberándola del filamento. El ciclo se repite entonces y la miosina puede moverse nuevamente contra el filamento.

¿De qué modo la hidrólisis del ATP en el bolsillo de unión al nucleótido se convierte en fuerza? Los resultados de estudios estructurales de miosina en presencia de nucleótidos, y de análogos de nucleótidos que simulan los distintos pasos del ciclo, indican que la unión y la hidrólisis de un nucleótido provocan un pequeño cambio de conformación en el dominio de la cabeza. Este pequeño movimiento queda amplificado por una región "convertidora" en la base de la cabeza, que actúa como un fulcro y hace que el cuello rote. Esta rotación está amplificada por el brazo en forma de bastón que constituye el dominio del cuello, de modo tal que el filamento de actina se mueve en unos pocos nanómetros (véase Fig. 17-26b).

Este modelo hace una fuerte predicción: la distancia que una cabeza de miosina recorre a lo largo de la actina, durante la hidrólisis del ATP —el *tamaño del paso* de la miosina— deberá ser proporcional a



ANIMACIÓN FOCALIZADA: Ciclo de cruzamiento actina-miosina

ARCHIVOS DE AUDIO (INGLÉS): Movimiento de la miosina contra los filamentos de actina

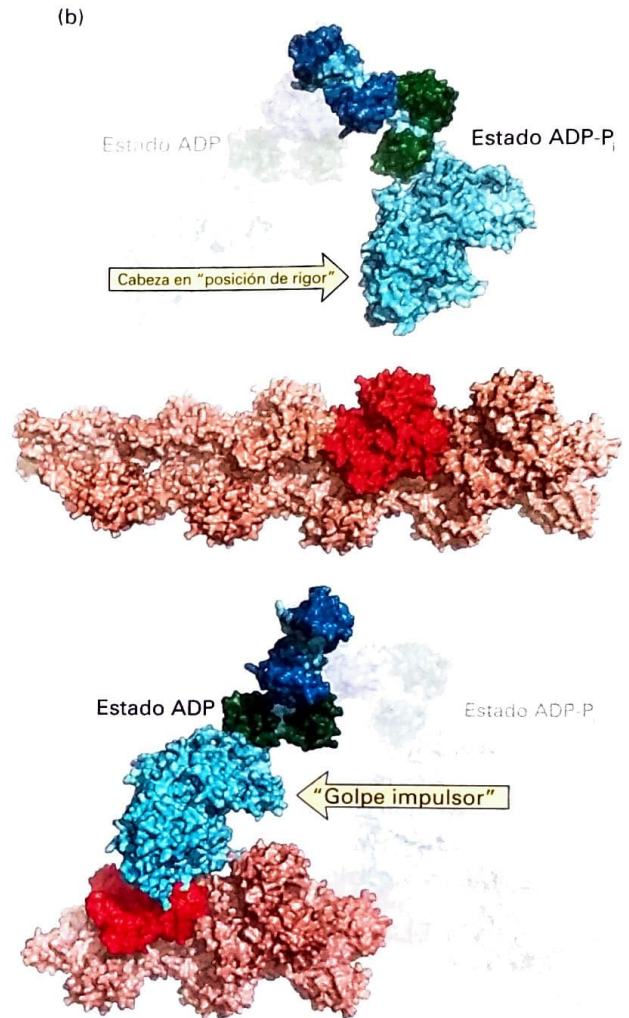
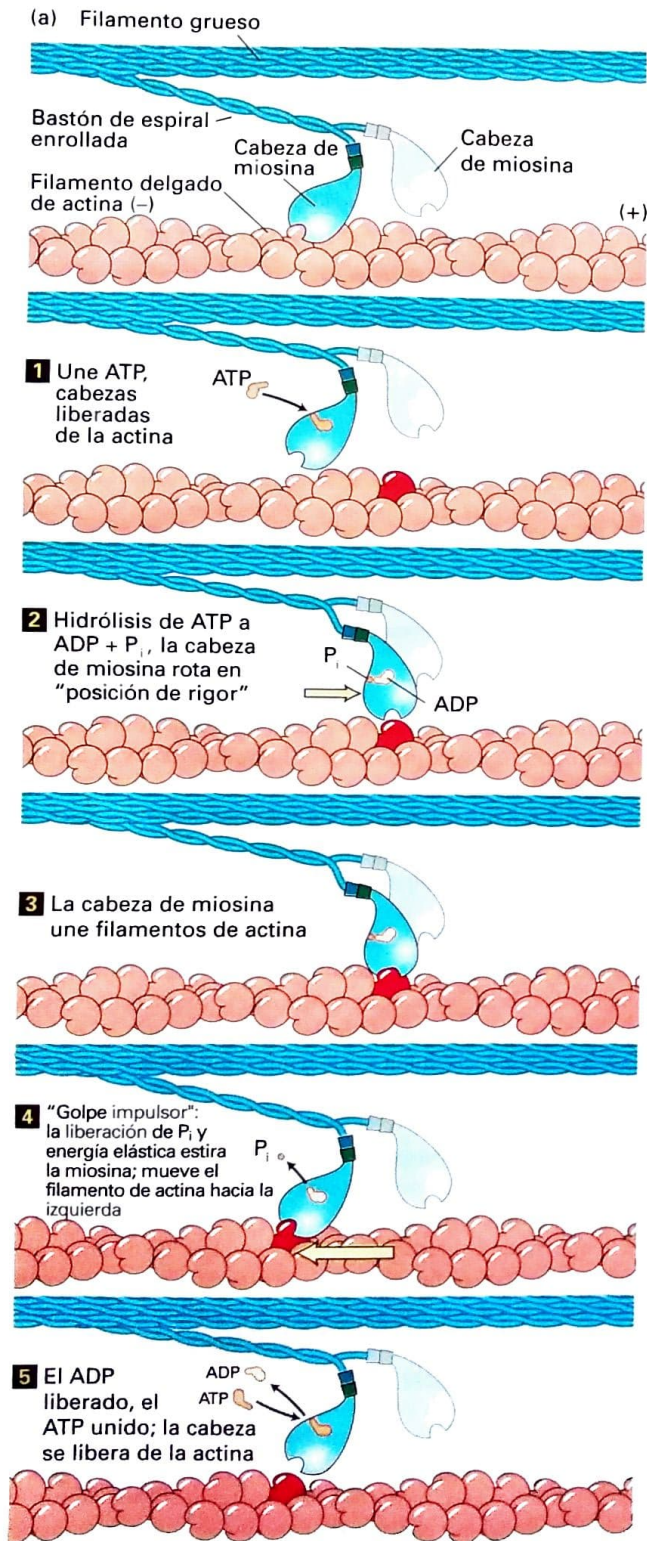


FIGURA 17-26 Movimiento de miosina impulsado por ATP a lo largo de los filamentos de actina. (a) En ausencia de ATP, la cabeza de miosina se adhiere firmemente al filamento de actina. Aunque este estado tiene vida media muy corta en el músculo vivo, es el estado responsable de la rigidez muscular de la muerte (rigor mortis). Paso 1: al unirse al ATP, la cabeza de miosina se libera del filamento de actina. Paso 2: la cabeza hidroliza el ATP a ADP y P_i , lo cual induce una rotación en la cabeza con respecto al cuello. Esta "posición de rigor" almacena la energía liberada por la hidrólisis de ATP como energía elástica al igual que un resorte estirado. Paso 3: la miosina en el estado de "rigor" se une a la actina. Paso 4: cuando se une a la actina, la cabeza de miosina acopla la liberación de P_i con la liberación de la energía elástica para mover el filamento de actina. Esto se conoce como el "golpe impulsor" dado que involucra el movimiento del filamento de actina con respecto al extremo del cuello de miosina. Paso 5: la cabeza permanece firmemente unida al filamento, a medida que el ADP se libera y antes que el ATP fresco sea unido por la cabeza. (b) Modelos moleculares de los cambios de conformación en la cabeza de miosina implicados en la "posición de rigor" de la cabeza (*panel superior*) y durante el golpe impulsor (*panel inferior*). Las cadenas ligeras de miosina se muestran en azul oscuro y verde; el resto de la cabeza y el cuello de la miosina están coloreados en azul claro y la actina es roja. (Parte [a] adaptada de R. D. Vale y R. A. Milligan, 2002, *Science* **288**:88, parte [b] cortesía de Mike Geeves.)

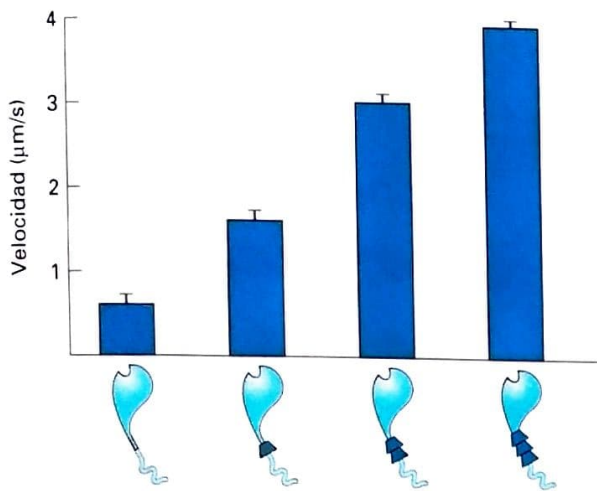


FIGURA EXPERIMENTAL 17-27 La longitud del dominio del cuello de la miosina II determina la velocidad del movimiento. Para probar el modelo de brazo de palanca del movimiento de miosina, los investigadores emplearon técnicas de DNA recombinante para que las cabezas de miosina se unieran a dominios de cuello de diferente longitud. Se determinó la velocidad a la cual se movían sobre los filamentos de actina. Cuanto más largo era el brazo de la palanca, más rápido se movía la miosina, dando sustento al mecanismo propuesto. (Redibujado de K. A. Ruppel y J. A. Spudis, 1990, *Annu. Rev. Cell Mol. Biol.* **12**:543-573.)

la longitud del dominio del cuello. Para probar esto se construyeron moléculas de miosina mutantes con diferentes longitudes de los dominios del cuello y se determinó la velocidad a la cual se movían a lo largo de un filamento de actina. Cabe destacar que hay una excelente correspondencia entre la longitud del dominio del cuello y la velocidad del movimiento (Fig. 17-27).

Las cabezas de miosina dan pasos individuales a lo largo de los filamentos de actina

La característica más crítica de la miosina es su capacidad para generar una fuerza que impulsa movimientos. Los investigadores han empleado *trampas ópticas* para medir las fuerzas generadas por moléculas de miosina individuales (Fig. 17-28). En este enfoque, la miosina se inmoviliza sobre cuentas a baja densidad. Un filamento de actina, mantenido entre dos trampas ópticas, se hace descender hacia la cuenta, hasta que toma contacto con la molécula de miosina que se encuentra sobre ella. Cuando se añade ATP, la miosina tracciona sobre el filamento de actina. Empleando un mecanismo de retroalimentación mecánico controlado por una computadora, puede medirse la distancia recorrida y las fuerzas y duración del movimiento. Los resultados de los estudios de trampa óptica muestran que la miosina II no interactúa con el filamento de actina de modo continuo, sino que se une, se mueve y la libera. De hecho, la miosina II gasta en promedio aproximadamente 10% de cada ciclo de la ATPasa en contacto con la F-actina —es decir, tiene un *relación de trabajo* (*duty ratio*) de 10%—. Esto será importante más adelante, cuando consideremos que, en la contracción muscular, cientos de cabezas de miosina arrastran filamentos de actina, de modo tal que en cualquier momento el 10% de las cabezas se encuentra comprometido a proporcionar una contracción suave.

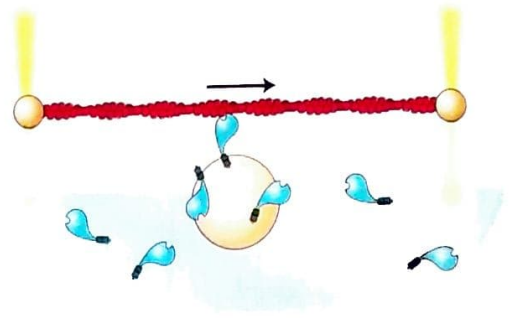


FIGURA 17-28 Atrapamiento óptico de la actina. Las técnicas de trampa óptica pueden emplearse para determinar el tamaño del paso y la fuerza generada por una única molécula de miosina. En una trampa óptica, el haz del láser infrarrojo se enfoca mediante un microscopio óptico sobre una cuenta de látex (o cualquier otro objeto que no absorba la luz infrarroja), que captura y mantiene la cuenta en el centro del haz. La tensión de la fuerza que sostiene la cuenta se ajusta incrementando o disminuyendo la intensidad de los haces de láser. En este experimento se sostiene un filamento de actina entre dos trampas ópticas. El filamento de actina, luego, se hace descender sobre una tercera cuenta cubierta con una concentración diluida de moléculas de miosina. Si el filamento de actina encuentra una molécula de miosina en presencia de ATP, la miosina arrastrará el filamento de actina, lo cual permite a los investigadores medir tanto la fuerza generada como el tamaño del paso de la miosina.

Cuando la miosina II contacta la F-actina, lo hace en pasos individuales, que tienen un promedio de aproximadamente 8 nm (Fig. 17-29, *arriba*) y genera entre 3-5 piconewtons (pN) de fuerza, aproximadamente la misma que la ejercida por la gravedad sobre una bacteria individual.

Si miramos ahora a un experimento de trampa óptica semejante con miosina V, las curvas se ven completamente distintas (Fig. 17-29, *abajo*). Ahora podemos discernir con claridad pasos de alrededor de 36 nm de longitud. Este tamaño de paso más grande refleja un dominio de cuello más largo —el brazo de palanca— de la miosina V. Más aun, vemos que el motor toma muchos pasos secuenciales sin liberarse de la actina —esto se denomina moverse en *forma procesiva*—. Esto ocurre porque su ciclo de la ATPasa está modificado para tener una relación de trabajo más alta (> 70%) al hacerse más lenta la velocidad de liberación de ADP; así, la cabeza permanece en contacto con el filamento de actina durante un porcentaje mucho más alto del ciclo. Dado que una molécula individual de miosina V tiene dos cabezas, una relación de trabajo > 50% asegura que una cabeza esté en contacto en todo momento, a medida que se mueve a lo largo de un filamento de actina, para no caerse.

La miosina V avanza mano sobre mano a lo largo de un filamento de actina

La pregunta siguiente es ¿de qué manera las dos cabezas de la miosina V trabajan juntas para moverse a lo largo de un filamento? Un modelo propone que las dos cabezas avanzan a lo largo de un filamento mano sobre mano, alternando las cabezas que guían el avance (Fig. 17-30a). Una posibilidad alternativa es un modelo de oruga geométrica, en el cual la cabeza líder avanza, la segunda es arrastrada detrás de ella y luego la

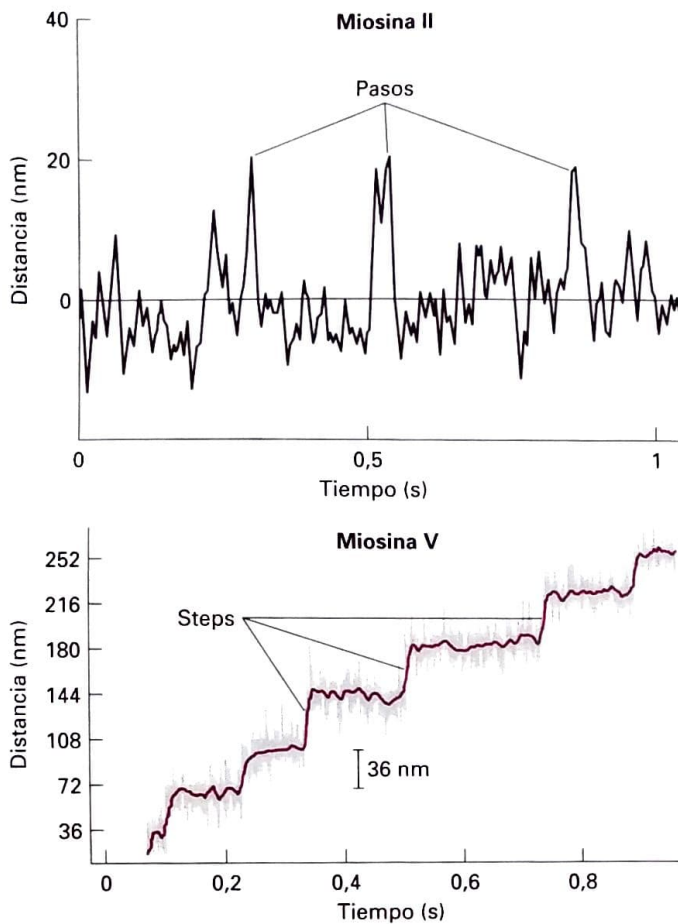


FIGURA EXPERIMENTAL 17-29 Experimentos de trampa óptica que miden el tamaño del paso y la procesividad de las miosinas. Empleando un diseño de trampa óptica similar al descrito en la Figura 17-28, los investigadores han analizado el comportamiento de la miosina II (trazo superior) y de la miosina V (trazo inferior). Como muestran los picos del trazo, la miosina II realiza pequeños pasos erráticos (5-15 nm), lo cual significa que se une al filamento de actina, se mueve y luego lo deja ir. Por lo tanto, es un motor no procesivo. Por el contrario, la miosina V de una sola cabeza realiza pasos claros de 36 nm, uno tras otro, de modo tal que tiene un tamaño de paso de 36 nm y es muy procesiva —es decir, no permite ir al filamento de actina. (Parte [a] de Finer y cols., 1994, *Nature* **368**:113, parte [b] de M. Rief y cols., 2000, *Proc. Natl'Acad. Sci. USA* **97**:9482.)

cabeza líder avanza nuevamente (Fig. 17-30b). ¿Cómo podría distinguirse entre estos modelos? En el modelo de la oruga geómetra, cada cabeza individual realiza pasos de 36 nm, mientras que en el modelo de caminata cada una realiza pasos de 72 nm. Los científicos han logrado unir una sonda fluorescente a la región del cuello de la miosina V y la han visto avanzar a lo largo de un filamento de actina: realiza pasos de 72 nm (Fig. 17-30c) y, de esta manera, avanza mano sobre mano a lo largo de un filamento. ¿Por qué es tan grande el tamaño del paso de la miosina V? Si comparamos su tamaño de paso de 36 nm con la estructura del filamento de actina, veremos que es el mismo que la longitud entre las repeticiones helicoidales en el filamento de actina (véanse Figs. 17-5b y 17-30a), de modo que la miosina V avanza entre sitios de unión equivalentes a medida que camina a lo largo de un lado de un filamento de actina. Supuestamente, la miosina V ha evolucionado

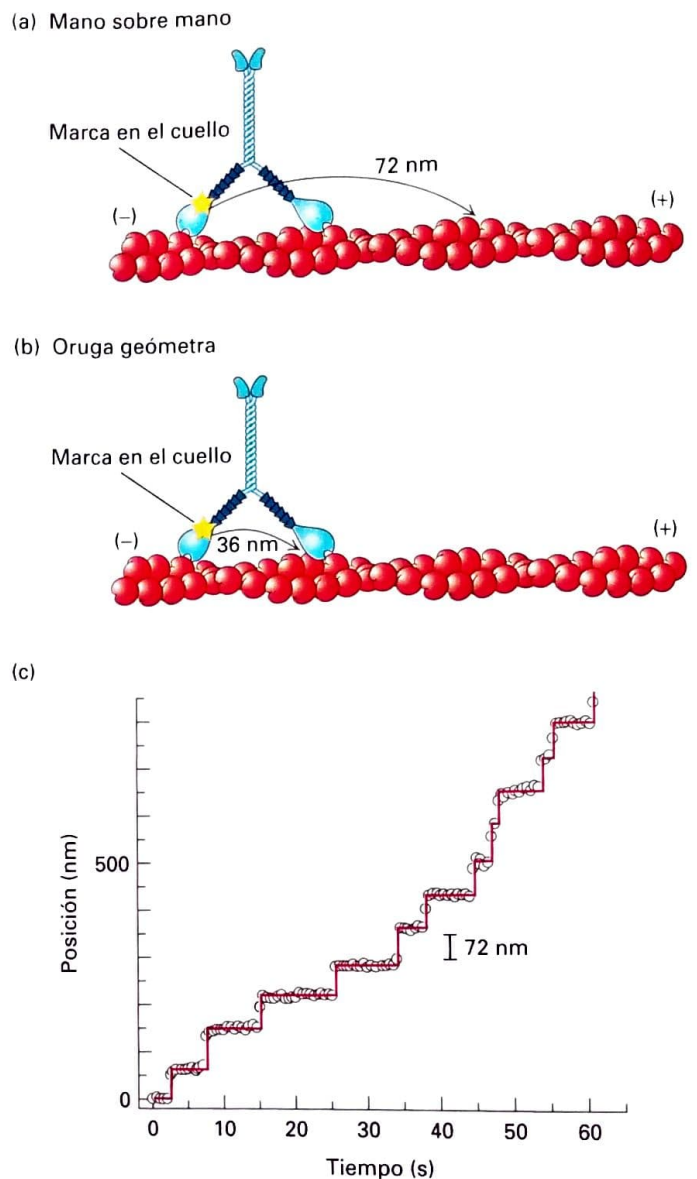


FIGURA EXPERIMENTAL 17-30 La miosina V tiene un tamaño de paso de 36 nm, aunque cada cabeza se mueve en pasos de 72 nm, de manera que se mueve mano sobre mano. Se han sugerido dos modelos de movimiento de la miosina V a lo largo de un filamento. (a) En el modelo mano sobre mano, una cabeza se une a un filamento de actina y luego la otra se balancea alrededor y se une a un sitio a 72 nm de distancia hacia adelante. (b) En el modelo de la oruga geómetra, la cabeza conductora se mueve 36 nm, luego la cabeza retardada se mueve detrás de ella y permite que la cabeza conductora realice otro paso de 36 nm. (c) La miosina V de dos cabezas marcada con una etiqueta fluorescente en una de las cabezas parece tener una longitud de paso de 72 nm. Así, la miosina V se desplaza mano sobre mano. (Adaptado de A. Yildiz y cols., 2003, *Science* **300**:2061.)

para realizar grandes pasos del tamaño de la repetición helicoidal de la actina y lo hace de una manera muy procesiva, de modo tal que en raras ocasiones se disocia de un filamento de actina. Éstas son exactamente las propiedades que se esperarían para un motor diseñado para transportar carga a lo largo de un filamento de actina.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 17.5

Las miosinas: proteínas motoras basadas en la actina

- Las miosinas son proteínas motoras impulsadas por la hidrólisis del ATP.
- Las miosinas tienen un dominio motor de cabeza, un dominio de brazo de palanca en el cuello y un dominio de unión de carga en la cola (véase Fig. 17-22).
- Hay muchas clases de miosinas, tres de ellas presentes en muchos eucariontes: la miosina I tiene un único dominio de cabeza, la miosina II tiene dos cabezas y se ensambla en filamentos bipolares y la miosina V tiene dos cabezas pero no se ensambla en filamentos (véase Fig. 17-25).
- Las miosinas convierten la hidrólisis de ATP a trabajo mecánico al amplificar un pequeño cambio de conformación en su cabeza a través del dominio del cuello, cuando la cabeza está unida a la F-actina (véase Fig. 17-26).
- Las cabezas de la miosina realizan pasos independientes a lo largo de un filamento de actina, que pueden ser pequeños (8 nm) y no procesivos en el caso de la miosina II, o grandes (36 nm) y procesivos para la miosina V.

17.6 Movimientos impulsados por la miosina

Ya hemos analizado de qué manera las miosinas tienen dominios de cabeza y cuello responsables de sus propiedades motoras. Ahora, llegamos a las regiones de la cola, que definen las cargas que mueven las miosinas. Se desconoce la función de muchas de las clases de miosinas recién descubiertas, presentes en los metazoarios. En esta sección, damos solamente dos ejemplos acerca las funciones específicas de la miosina, de los que tenemos buena idea. Nuestro primer ejemplo es el músculo esquelético, en el cual se descubrió la miosina II. En el músculo, muchas cabezas de miosina II agrupadas en filamentos bipolares, cada una con un ciclo de trabajo corto, operan en conjunto para que se produzca la contracción. En la contracción del músculo liso y las fibras de tensión, operan maquinarias contráctiles organizadas de modo semejante, así como ocurre en el anillo contráctil durante la citocinesis. Luego pasamos a la miosina de clase V, que tiene un ciclo de trabajo largo que permite que estas miosinas transporten cargas lo largo de distancias relativamente largas, sin disociarse de los filamentos de actina.

Los filamentos gruesos de miosina y los filamentos delgados de actina del músculo esquelético se deslizan unos sobre otros durante la contracción

Las células musculares han evolucionado para llevar a cabo una función muy especializada: la contracción. Las contracciones musculares deben ocurrir con rapidez y repetitivamente a través de distancias largas y con suficiente fuerza como para mover cargas grandes. Una célula de músculo esquelético típica es cilíndrica, larga (1-40 μm de longitud y 10-50 μm de ancho) y multinucleada (contiene hasta 100 núcleos) (Fig. 17-31a). Dentro de cada célula muscular hay muchas **miofibrillas** con una disposición repetitiva, regular de una estructura especializada llamada **sarcómero** (Fig.

17-31b). Un sarcómero, que tiene aproximadamente 2 μm de largo en el músculo en reposo, se acorta en aproximadamente 70% de su longitud durante la contracción. Tanto la microscopia electrónica como los análisis bioquímicos mostraron que cada sarcómero contiene dos tipos de filamentos principales: los **filamentos gruesos**, compuestos por miosina II, y los **filamentos delgados**, que contienen actina y proteínas asociadas (Fig. 17-31c).

Los filamentos gruesos están compuestos por filamentos bipolares de miosina II, en los cuales las cabezas de cada mitad del filamento tienen orientaciones opuestas (véase Fig. 17-22a). Los filamentos delgados de actina se encuentran ensamblados con sus extremos (+) insertos en una estructura que se tiñe densamente llamada **disco Z**, de modo tal que los dos conjuntos de filamentos de actina de un sarcómero tienen orientaciones opuestas (Fig. 17-32). Para comprender la contracción muscular, consideremos las interacciones entre una cabeza de miosina (entre las cientos presentes en un filamento grueso) y un filamento delgado (de actina), según se ilustra en la Figura 17-26. Durante estas interacciones cíclicas, también llamadas **ciclo de los puentes cruzados**, la hidrólisis de ATP está acoplada al movimiento de una cabeza de miosina hacia el disco Z, que corresponde al extremo (+) del filamento delgado de actina. Dado que el filamento grueso es bipolar, la acción de las cabezas de miosina en extremos opuestos del filamento grueso arrastra los filamentos delgados hacia el centro del filamento grueso y, por lo tanto, hacia el centro del sarcómero (véase Fig. 17-32). Este movimiento acorta el sarcómero hasta que los extremos de los filamentos gruesos linden con el disco Z. La contracción en células musculares intactas resulta de la actividad de cientos de cabezas de miosina sobre un filamento grueso, amplificadas por los cientos de filamentos gruesos y delgados presentes en un sarcómero y los miles de sarcómeros en una fibra muscular. Podemos ver ahora por qué la miosina II es tanto no procesiva como requiere un ciclo de trabajo corto: cada cabeza se arrastra sobre una distancia corta sobre el filamento de actina y luego lo deja ir para permitir que otras cabezas lo arrastren y así muchas cabezas trabajando concertadamente permiten la suave contracción del sarcómero.



El corazón es un órgano contráctil sorprendente –se contrae sin interrupción aproximadamente 3 millones de veces por año, o una quinta parte de mil millones de veces durante toda la vida–. Las células musculares del corazón contienen una maquinaria contráctil muy similar a la del músculo esquelético, excepto en que son células mononucleadas y binucleadas. En cada célula, los sarcómeros de los extremos se insertan en estructuras en la membrana plasmática llamadas discos intercalados, que vinculan a las células en una cadena contráctil. Dado que las células musculares cardíacas solo se generan en las épocas tempranas de la vida humana, no pueden ser reemplazadas en respuesta al daño, como el que ocurre durante un infarto de miocardio. Muchas mutaciones distintas en las proteínas de la maquinaria contráctil del corazón dan lugar a las **miocardiopatías hipertróficas** –que engrosan la pared muscular del corazón, lo cual compromete su función–. Por ejemplo, se han documentado muchas mutaciones en el gen de la cadena pesada de la miosina cardíaca que comprometen la función contráctil de la proteína, aun en individuos heterocigotos. En estos individuos, el corazón intenta compensar mediante la hipertrofia (agrandamiento), lo cual con frecuencia da como resultado arritmias (latidos irregulares) cardíacas fatales. Además de los defectos de la cadena pesada de la miosina, los defectos que dan como resultado miocardiopatías han sido rastreados hasta las mutaciones en otros componentes de la maquinaria contráctil, que incluyen la actina, las cadenas ligeras de la miosina, la tropomiosina y la troponina y los componentes estructurales como la titina (que se analizan más adelante). ■

FIGURA 17-31 Estructura del sarcómero de músculo esquelético.

(a) Los músculos esqueléticos consisten en fibras musculares formadas por haces de células multinucleadas. Cada célula contiene un haz de miofibrillas, que consiste en miles de estructuras contráctiles repetidas, llamadas sarcómeros. (b) Fotomicrografía electrónica de músculo estriado de ratón en corte longitudinal, que muestra un sarcómero. A cada lado de los discos Z hay bandas I teñidas ligeramente, compuestas completamente por filamentos delgados de actina. Estos filamentos delgados se extienden desde ambos lados del disco Z para interdigitarse con los filamentos gruesos de miosina, teñidos en color oscuro, presentes en la banda A. (c) Diagrama de la disposición de los filamentos de miosina y actina en un sarcómero. (Parte [b] cortesía de S. P. Dadoune.)

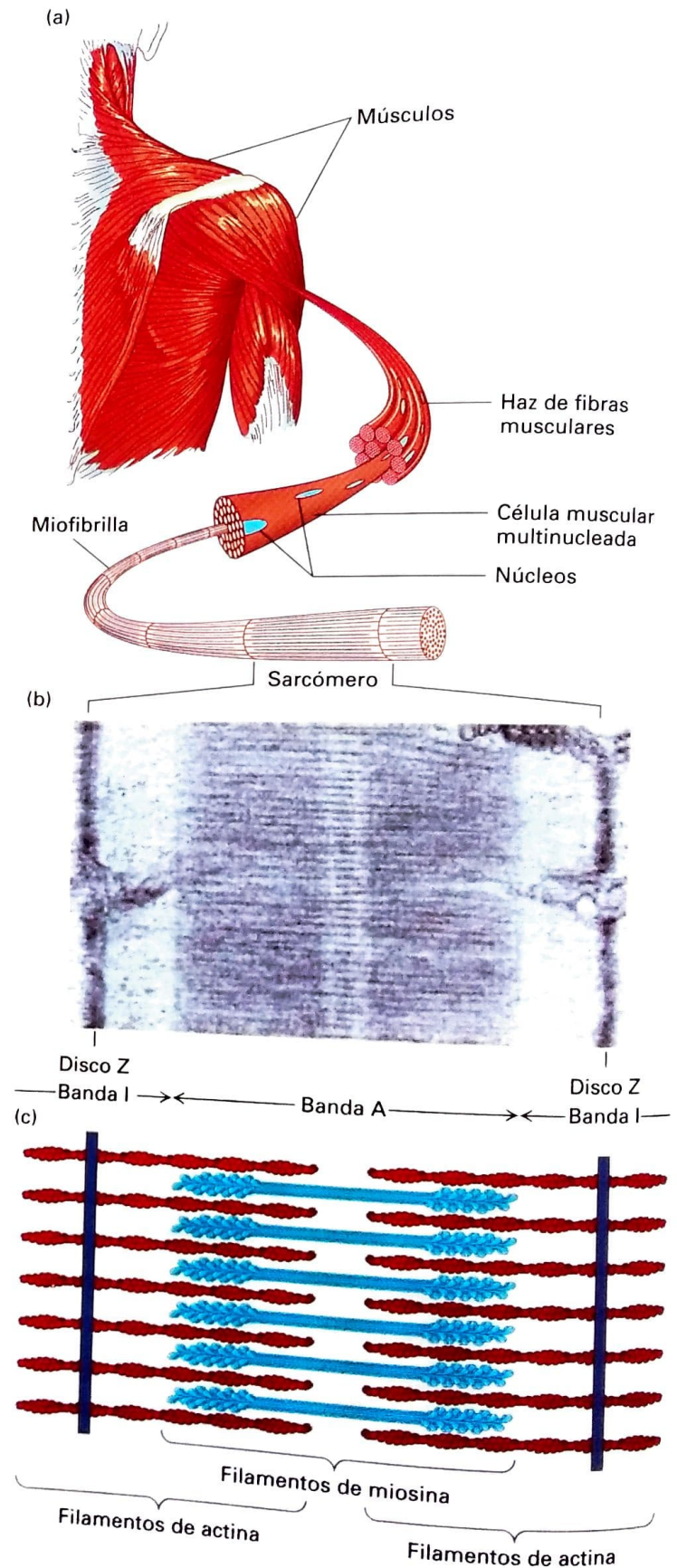
El músculo esquelético se estructura mediante proteínas de estabilización y andamiaje

La estructura del sarcómero se mantiene merced a un número de proteínas accesorias (Fig. 17-33). Los filamentos de actina se estabilizan en sus extremos (+) por la *CapZ* y en sus extremos (–) por la *tropomodulina*. Una proteína gigante conocida como *nebulina* se extiende a lo largo del filamento delgado de actina durante todo el recorrido desde el disco Z hasta la tropomodulina, a la cual se une. La nebulina consiste en dominios repetidos que se unen a la actina presente en el filamento, y se cree que el número de repeticiones que unen actina y, por lo tanto, la longitud de la nebulina determinan la longitud de los filamentos delgados. Otra proteína gigante, llamada *titina* (porque es muy grande), tiene su cabeza asociada con el disco Z y se extiende hasta la mitad del filamento grueso, donde otra molécula de titina se extiende al disco Z siguiente. Se cree que la titina es una molécula elástica que mantiene juntos a los filamentos gruesos en la mitad del sarcómero y también evita el sobreestiramiento para asegurarse de que los filamentos gruesos permanezcan interdigitados entre los filamentos delgados.

La contracción de los músculos esqueléticos está regulada por el Ca^{2+} y las proteínas que unen actina

Al igual que muchos procesos celulares, la contracción del músculo esquelético se inicia con un aumento en la concentración citosólica de Ca^{2+} . Como se describió en el Capítulo 11, la concentración de Ca^{2+} del citosol normalmente se mantiene baja, por debajo de $0,1 \mu\text{M}$. En las células de músculo esquelético, un bajo nivel de Ca^{2+} en el citosol se mantiene principalmente por una ATPasa Ca^{2+} única que bombea en forma continua iones Ca^{2+} desde el citosol que contiene las miofibrillas al **retículo sarcoplasmático (RS)**, un retículo endoplasmático especializado de las células musculares (Fig. 17-34). Esta actividad establece un reservorio de Ca^{2+} en el RS.

La llegada de un impulso nervioso (o *potencial de acción*; véase Cap. 22) a una unión neuromuscular desencadena un potencial de acción en la membrana plasmática de la célula muscular (llamada también *sarcolema*). El potencial de acción viaja a través de invaginaciones de la membrana plasmática llamadas *túbulos transversos* que penetran en la célula para quedarse cerca de las miofibrillas. La llegada del potencial de acción en los túbulos transversos estimula la apertura de los canales de Ca^{2+} activados por voltaje en la membrana del RS, y la liberación subsiguiente de Ca^{2+} desde el RS incrementa la concentración citosólica de Ca^{2+} en las miofibrillas. Esta concentración elevada de Ca^{2+} induce un cambio en dos proteínas accesorias, la



tropomiosina y la troponina, que se unen a los filamentos delgados de actina y normalmente bloquean la unión de la miosina. El cambio en la posición de estas proteínas sobre los filamentos delgados de actina a su vez permite las interacciones miosina-actina y, de esta manera,

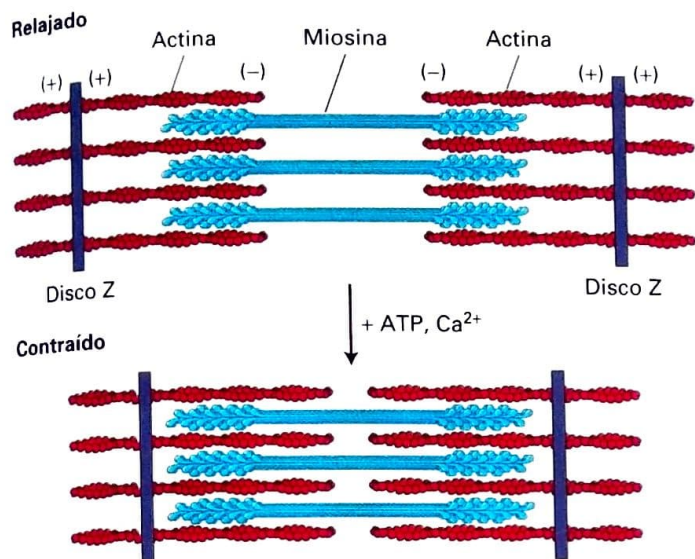


FIGURA 17-32 Modelo del filamento deslizante de la contracción en el músculo estriado. La disposición de los filamentos gruesos de miosina y delgados de actina en el estado relajado se muestra en el diagrama superior. En presencia de ATP y Ca^{2+} , las cabezas de miosina que se extienden desde los filamentos gruesos avanzan hacia los extremos (+) de los filamentos delgados. Dado que los filamentos delgados están anclados en los discos Z (púrpura), el movimiento de la miosina arrastra los filamentos de actina hacia el centro del sarcómero, acortando su longitud en el estado contraído, como se muestra en el diagrama inferior.

la contracción. Este tipo de regulación es muy rápido y también se lo conoce como *regulación por filamento delgado*.

La *tropomiosina* (TM) es una molécula con forma de cuerda, de aproximadamente 40 nm de longitud, que se une a 7 subunidades de actina en un filamento de actina. Las moléculas de TM se mantienen juntas de la cabeza a la cola, formando una cadena continua a lo largo de cada lado de un filamento delgado de actina (Fig. 17-35a, b). Asociada con cada tropomiosina hay una *troponina* (TN), un complejo de tres subunidades TN-T, TN-I y TN-C. La troponina-C es la

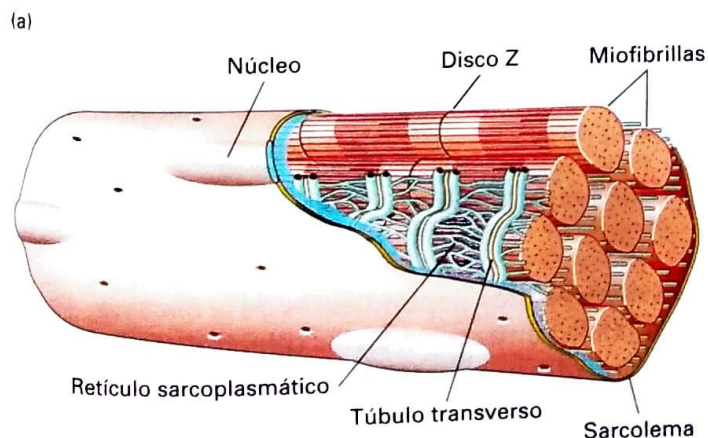


FIGURA 17-34 El retículo sarcoplásmico regula el nivel de Ca^{2+} libre en las miofibrillas. (a) Cuando un impulso nervioso estimula a una célula muscular, el potencial de acción se transmite a lo largo de un túbulo transversal (amarillo), que se continúa con la membrana plasmática (sarcolema), que conduce a la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico adyacente (azul)

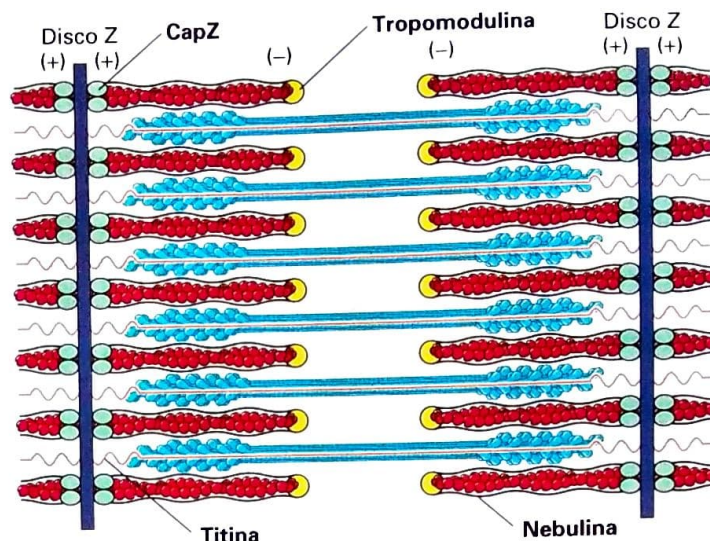
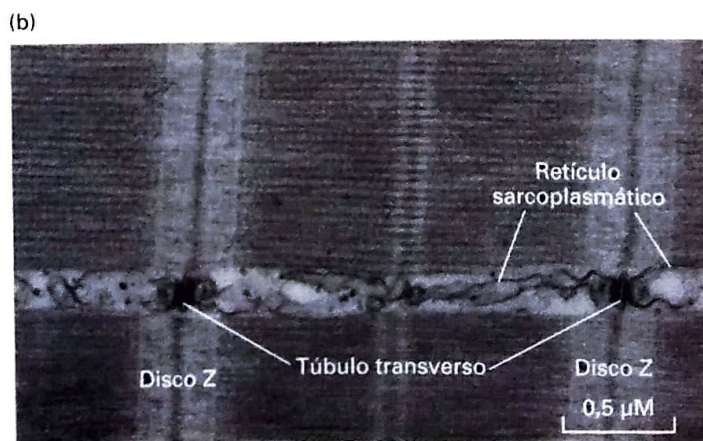


FIGURA 17-33 Proteínas accesorias presentes en el músculo esquelético. Para estabilizar los filamentos de actina, la CapZ forma un casquete en el extremo (+) de los filamentos delgados en el disco Z, mientras que la tropomodulina forma un casquete en el extremo (-). La proteína gigante titina se extiende a través de los filamentos gruesos y se une al disco Z. La nebulina une las subunidades de actina y determina la longitud del filamento delgado.

subunidad de la troponina que se une al calcio. La TN-C controla la posición de la TM sobre la superficie de un filamento de actina por medio de las subunidades TN-I y TN-T.

Bajo el control del Ca^{2+} y la TN, la TM puede ocupar dos posiciones en un filamento delgado –pasando de un estado de relajación muscular al de contracción—. En ausencia de Ca^{2+} (el estado relajado), la TM bloquea las interacciones de la miosina con la F-actina y el músculo se relaja. La unión de iones Ca^{2+} a la TN-C desencadena el movimiento de la TM a un nuevo sitio sobre el filamento, con lo cual expone los sitios de unión de miosina sobre la actina (véase Fig. 17-35b). Así, a concentraciones de Ca^{2+} superiores a 1 μM , la inhibición ejercida por



a las miofibrillas. (b) Fotomicrografía electrónica de un corte fino de músculo esquelético que muestra la relación íntima del retículo sarcoplásmico con las fibras musculares. (Parte [b] de K. R. Porter y C. Franzini Armstrong, ASCB Image & Video Library, agosto de 2006.FND-14. Disponible en: <http://cellimages.ascb.org/u?/p4041coll1,83>)

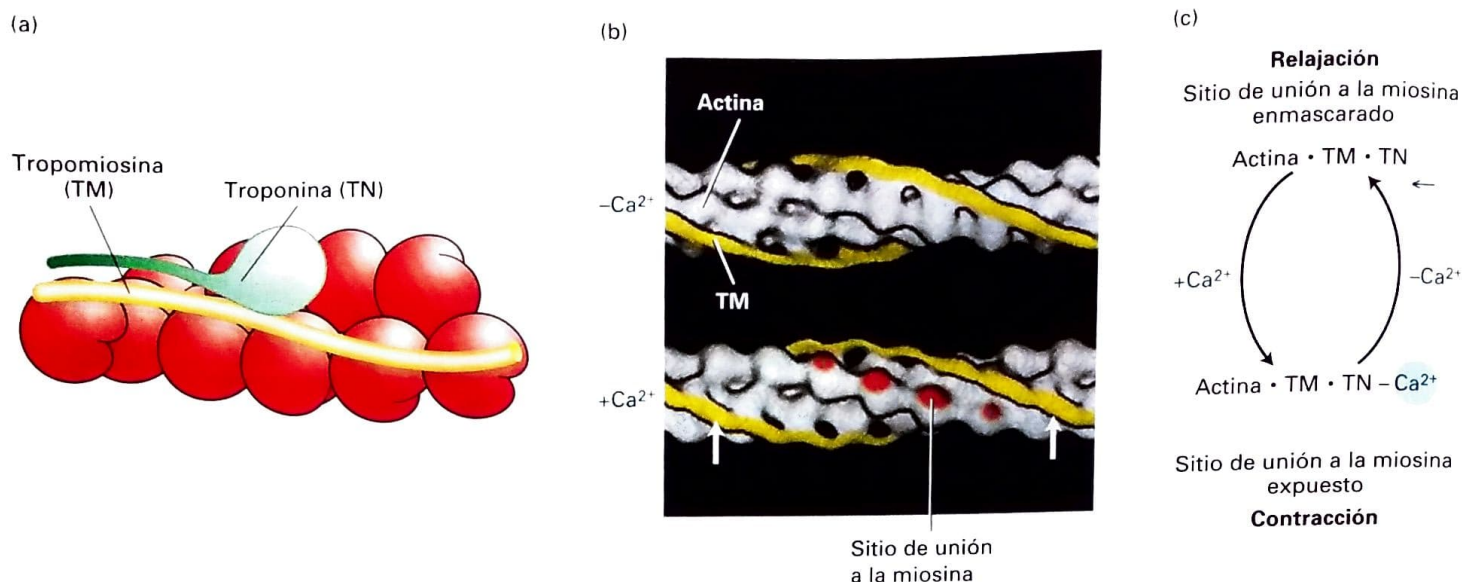


FIGURA 17-35 Regulación del filamento delgado dependiente de Ca^{2+} en la contracción del músculo esquelético. (a) Modelo del complejo regulador tropomiosina-troponina sobre un filamento delgado. La troponina es un complejo proteico que se une a la molécula helicoidal α larga de la tropomiosina. (b) Reconstrucciones tridimensionales de microscopía electrónica de la hélice de tropomiosina (amarillo) sobre un filamento delgado muscular. La tropomiosina en estado relajado (*parte superior*) se desplaza a una

nueva posición (flecha) en el estado que induce la contracción (*parte inferior*) cuando la concentración de Ca^{2+} se incrementa. Este movimiento expone los sitios de unión de la miosina (rojo) sobre la actina. (La troponina no se muestra en esta representación, pero permanece unida a la tropomiosina en ambos estados.) (c) Resumen de la regulación de la contracción del músculo esquelético por la unión de Ca^{2+} a la troponina. (Parte [b] adaptada de W. Lehman, R. Craig y P. Vibert, 1993, *Nature* **123**:313, cortesía de P. Vibert.)

el complejo TM-TN se alivia y ocurre la contracción. El ciclado dependiente de Ca^{2+} entre los estados de relajación y contracción en el músculo esquelético se resume en la Figura 17-35c.

La actina y la miosina II forman haces contráctiles en las células no musculares

En el músculo esquelético, los filamentos delgados de actina y los filamentos gruesos de miosina II se ensamblan en estructuras contráctiles. Las células no musculares contienen varios tipos de **haces contráctiles** relacionados, compuestos por filamentos de actina y de miosina II similares a las fibras del músculo esquelético pero mucho menos organizadas. Más aún, carecen del sistema regulador de la troponina y están reguladas, en lugar de ello, por la fosforilación de la miosina, como analizaremos más adelante.

En las células epiteliales, los haces contráctiles comúnmente se encuentran como un *cinturón de adhesión*, conocido también como cinturón circunferencial, que rodea la superficie interna de la célula, al nivel de la unión adherente (véase Fig. 17-4a) y son importantes para mantener la integridad del epitelio (analizada en el Cap. 20). Las fibras de tensión, que pueden verse a lo largo de las superficies inferiores de las células cultivadas en superficies artificiales (vidrio o plástico) o en las matrices extracelulares, son un segundo tipo de haz contráctil (véase Fig. 17-4a, c) importantes en la adhesión celular, en especial en sustratos deformables. Los extremos de las fibras de tensión terminan en adhesiones focales que contienen integrina, estructuras especiales que adhieren una célula al sustrato subyacente (véanse Fig. 17-41 y Cap. 20). Los cinturones circunferenciales y las fibras de tensión contienen varias proteínas que se encuentran en el aparato contráctil del músculo

liso y muestran ciertas características de organización que se asemejan a las de los sarcómeros musculares. Un tercer tipo de haz contráctil, conocido como anillo contráctil, es una estructura transitoria que se ensambla en el ecuador de una célula en división y rodea a la célula a mitad de camino entre los polos del huso mitótico (Fig. 17-36a). A medida que el anillo se contrae, arrastrando a la membrana plasmática con él, el citoplasma se divide y finalmente se separa en dos partes en un proceso conocido como *citocinesis*, que da lugar a dos células hijas. Las células en división, teñidas con anticuerpos contra la miosina I y la miosina II, muestran que ésta se localiza en el anillo contráctil, mientras que la miosina I se encuentra en las regiones distales, donde vincula la corteza de actina con la membrana plasmática (Fig. 17-36b). Las células con delecciones para el gen que codifica la cadena pesada de la miosina II son incapaces de pasar por la citocinesis, estableciéndose así un papel para la miosina II en la división celular. En lugar de ello, estas células forman un sincitio multinucleado porque la citocinesis está inhibida, aunque no la división celular.

Los mecanismos dependientes de la miosina regulan la contracción en las células de músculo liso y en las no musculares

El músculo liso es un tejido especializado, compuesto por células contráctiles, presente en muchos órganos internos. Por ejemplo, el músculo liso rodea a los vasos sanguíneos para regular la presión arterial, al intestino para que se mueva el alimento a través de éste y restringe el paso de la vía aérea en el pulmón. Las células de músculo liso contienen haces grandes, laxamente alineados, contráctiles, que se asemejan

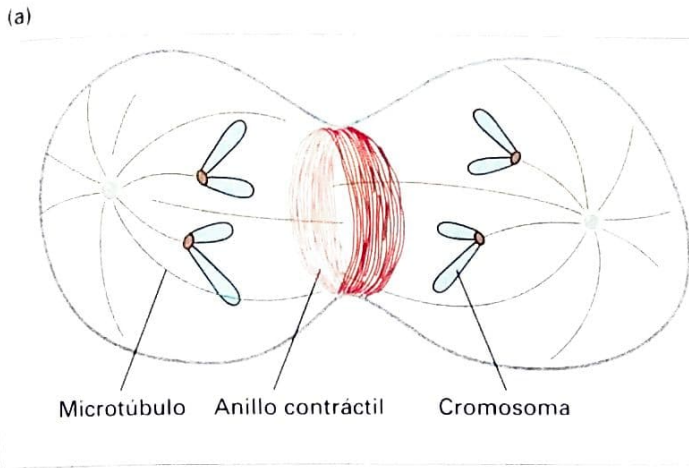
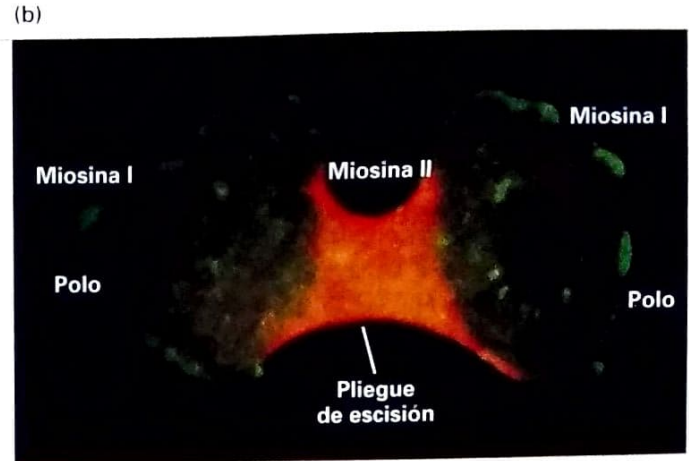


FIGURA EXPERIMENTAL 17-36 Los anticuerpos fluorescentes revelan la localización de la miosina I y la miosina II durante la citocinesis.

(a) Diagrama de una célula que atraviesa citocinesis, que muestra el huso mitótico (microtúbulos en verde, cromosomas en azul) y el anillo contráctil con filamentos de actina (rojo). (b) Fotomicrografía de fluorescencia de una ameba *Dictyostelium* durante la citocinesis que revela que la miosina II (anaranjado) se



concentra en el anillo contráctil, también conocido como surco de escisión, mientras que la miosina I (verde) se localiza en los polos de la célula. La célula fue teñida con anticuerpos específicos para miosina I y miosina II y cada preparado de anticuerpo unido con un colorante fluorescente distinto. (Cortesía de Y. Fukui)

a los haces contráctiles de las células epiteliales. El aparato contráctil del músculo liso y su regulación constituyen un modelo valioso para la comprensión del modo en que la actividad de la miosina se encuentra regulada en una célula no muscular. Como acabamos de ver, la contracción del músculo esquelético está regulada por el complejo tropomiosina-troponina unido al cambio en los filamentos delgados de actina entre el estado de inducción de la contracción en presencia de Ca^{2+} y el estado relajado en ausencia de éste. Por el contrario, las contracciones del músculo liso están reguladas por el ciclado de la miosina II entre los estados encendido y apagado. El ciclado de la miosina II, y así de la contracción de las células de músculo liso y las no musculares, se encuentra regulado en respuesta a muchas moléculas de señalización extracelulares.

La contracción del músculo liso de los vertebrados está regulada principalmente por una vía en la cual la *cadena ligera reguladora de la miosina (CL)* asociada con el dominio del cuello de la miosina II (véase Fig. 17-22b) sufre fosforilación y desfosforilación. Cuando la cadena ligera reguladora no está fosforilada, la miosina II del músculo liso adopta una conformación plegada y su ciclo de ATPasa está inactivo. Cuando la CL reguladora está fosforilada por acción de la enzima *cinasa de la CL de miosina*, cuya actividad está regulada por el nivel de Ca^{2+} libre en el citosol, la miosina II se despliega y se ensambla en fragmentos bipolares activos, volviéndose activa para inducir la contracción (Fig. 17-37). La regulación de la actividad de la cinasa de la CL de miosina dependiente de Ca^{2+} está mediada por la proteína que une Ca^{2+} calmodulina (véase Fig. 3-31). El calcio se une primero a la calmodulina, que induce un cambio de conformación en la proteína, y el complejo Ca^{2+} /calmodulina se une entonces a la cinasa de la CL de miosina y la activa. Cuando el Ca^{2+} vuelve a su nivel de reposo, la cinasa de la CL de miosina se inactiva y la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina elimina los fosfatos para permitir que el sistema vuelva a su estado relajado. Este modo de regulación depende de la difusión de Ca^{2+} a distancias superiores a las presentes en los sarcómeros y de la acción de las proteínas cinasas, de modo que la contracción es mucho más

lenta en el músculo liso que en el esquelético. Dado que esta regulación implica a la miosina, se conoce como *regulación del filamento grueso*.

El papel de la cinasa de la CL de miosina activada puede ser demostrado microinyectando un inhibidor de la cinasa a las células de músculo liso. Incluso aunque el inhibidor no bloquee el incremento en el nivel de Ca^{2+} citosólico que ocurre después de estimular la célula, las células inyectadas no pueden contraerse.

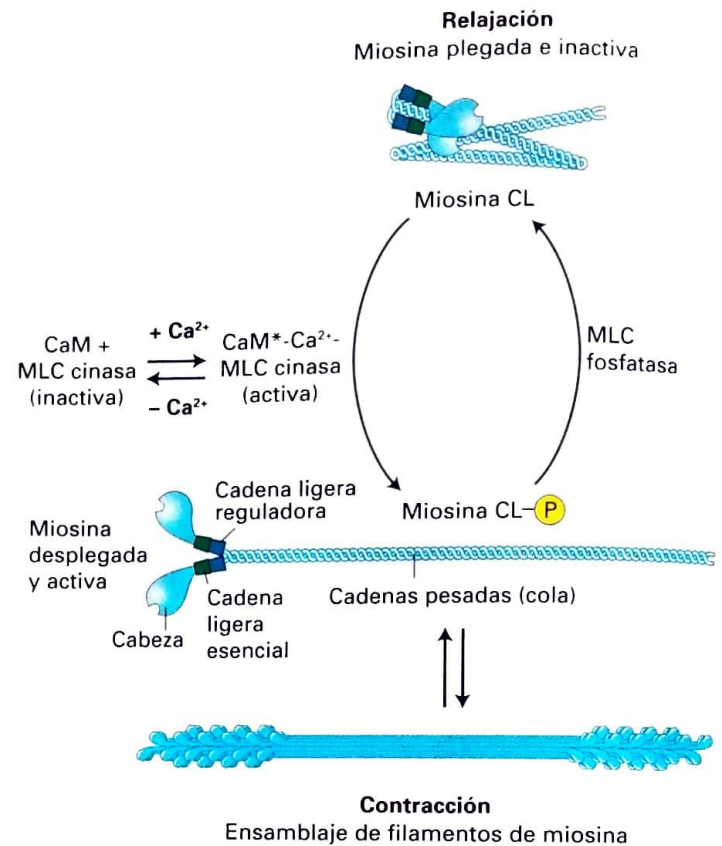
A diferencia del músculo esquelético, estimulado para contraerse solamente por los impulsos nerviosos, las células del músculo liso y las no musculares se encuentran reguladas por muchos tipos de señales externas. Por ejemplo, la noradrenalina, la angiotensina, la endotelina, la histamina y otras moléculas de señalización pueden modular o inducir la contracción del músculo liso o provocar cambios en la forma y la adhesión de las células no musculares al desencadenar varias vías de transducción de la señal. Algunas de estas vías conducen a un incremento en el nivel de Ca^{2+} citosólico; como se describió previamente, este incremento puede estimular la actividad de miosina, activando a la cinasa de la CL de miosina (véase Fig. 17-37). Como analizaremos luego, otras vías activan la *cinasa Rho*, que también es capaz de activar la actividad de la miosina, fosforilando la cadena ligera reguladora, si bien de modo independiente del Ca^{2+} .

Las vesículas unidas a la miosina V son transportadas a lo largo de los filamentos de actina

Al contrario de las funciones contráctiles de los filamentos de miosina II, la familia de proteínas miosina V son los motores de miosina más procesivos conocidos y transportan carga a lo largo de los filamentos de actina. En el siguiente capítulo, analizaremos el modo en que pueden operar en conjunto con los motores de los microtúbulos para llevar a cabo el transporte de orgánulos. Aunque no se conoce demasiado acerca de sus funciones en las células de los mamíferos, los motores de miosina V no son poco importantes: defectos en una

FIGURA 17-37 Mecanismo de fosforilación de la miosina para la regulación de la contracción del músculo liso.

En el músculo liso de los vertebrados, la fosforilación de la cadena ligera (CL) reguladora de la miosina activa la contracción. A concentraciones de $\text{Ca}^{2+} < 10^{-6} \text{ M}$, la cadena ligera reguladora no se fosforila y la miosina adopta una conformación plegada. Cuando el nivel de Ca^{2+} aumenta, una calmodulina (CaM), que sufre un cambio de conformación (CaM^*), se une a la cinasa de la cadena ligera de miosina y la activa (MLC cinasa), y luego fosforila la CL de miosina. Este evento de fosforilación despliega la miosina que ahora es activa y puede ensamblarse en filamentos bipolares para participar de la contracción. Cuando los niveles de Ca^{2+} caen, la CL de miosina es desfosforilada por la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (MLC), que no depende del Ca^{2+} para su actividad, provocando la relajación muscular.



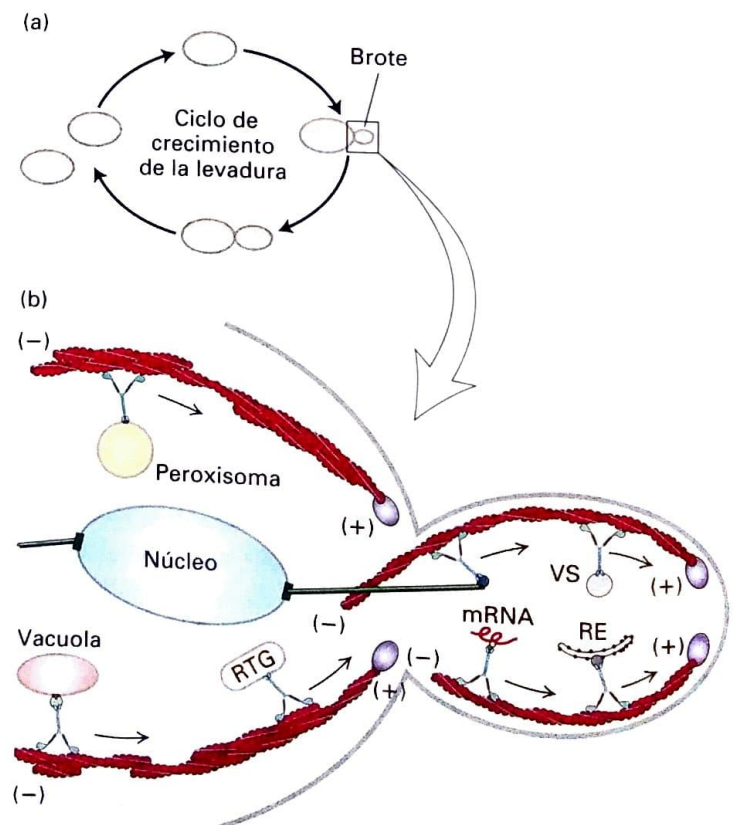
proteína miosina V específica pueden provocar enfermedades graves, como las convulsiones (véase Fig. 17-24).

Se sabe mucho más acerca de los motores de miosina V en sistemas más accesibles experimentalmente y más sencillos como la gemación de la levadura. Este organismo bien estudiado crece por gemación, lo cual requiere que su maquinaria de secreción dirija el material recién sintetizado al brote en crecimiento (Fig. 17-38a). La miosina V transporta vesículas de secreción a lo largo de los filamentos de actina, a una velocidad de $3 \mu\text{m/s}$ dentro del brote. Sin embargo, esta no es la única función de las proteínas miosina V en las levaduras. En una etapa posterior del ciclo celular, todos los orgánulos deben estar distribuidos entre las células madre e hija. Notablemente, las miosinas V de las levaduras proporcionan el sistema de transporte para la segregación de muchos orgánulos, incluidos los peroxisomas,

ANIMACIÓN GENERAL: Movimiento de múltiples cargas por la miosina V en las levaduras

FIGURA 17-38 Movimiento de la carga por la miosina V en la levadura en gemación.

(a) La levadura *Saccharomyces cerevisiae* (empleada para hacer pan, cerveza y vino) crece por gemación. Las vesículas secretoras son transportadas al interior del brote, que se hincha para alcanzar aproximadamente el tamaño de la célula madre. Luego, las células atraviesan la citocinesis para formar dos células hijas, y cada una vuelve a dividirse. (b) Diagrama de un brote de tamaño mediano que muestra de qué manera la miosina V transporta las vesículas de secreción (VS) a lo largo de los cables de actina, nucleados por las forminas (púrpura) localizadas en el extremo del brote y el cuello de éste. Las miosinas V también se emplean para segregar orgánulos, como la vacuola (el equivalente en las levaduras de un lisosoma), los peroxisomas, el retículo endoplasmático (RE), la red *trans*-Golgi (RTG) e incluso mRNA seleccionados al brote. La miosina V también se une al extremo de los microtúbulos citoplasmáticos (verde) para orientar al núcleo en la preparación para la mitosis. (Adaptado de Pruyne y cols., 2004, *Ann. Rev. Cell Biol.* 20:559.)



los lisosomas (también conocidos como vacuolas), el retículo endoplasmático, la red *trans*-Golgi e incluso el transporte de los extremos de los microtúbulos y algunos RNA mensajeros al interior del brote (Fig. 17-38b). Mientras que la gemación de las levaduras emplea miosina V y filamentos de actina polarizados en el transporte de muchos orgánulos, las células animales, que son mucho mayores, emplean microtúbulos y sus motores para transportar muchos de estos orgánulos a lo largo de distancias relativamente largas. Analizamos estos mecanismos de transporte en el siguiente capítulo.

Quizás el uso más destacable de la miosina V es el que se ve en las algas verdes gigantes, como *Nitella* y *Chara*. En estas células grandes,

que pueden tener hasta 2 cm de longitud, el citosol fluye con rapidez, a una velocidad que se aproxima a los 4,5 mm/min, en un bucle sin fin alrededor de la circunferencia interna de la célula (Fig. 17-39). Esta *corriente citoplasmática* es un mecanismo principal para la distribución de los metabolitos celulares, especialmente en células grandes, como las de los vegetales y las amebas.

Una inspección cercana de los objetos presentes en este citosol que fluye, como el retículo endoplasmático (RE) y otras vesículas limitadas por membrana, muestra que la velocidad de la corriente se incrementa desde el centro de la célula (velocidad cero) a la periferia celular. Este gradiente en la velocidad del flujo se explica con mayor facilidad si el motor que genera el

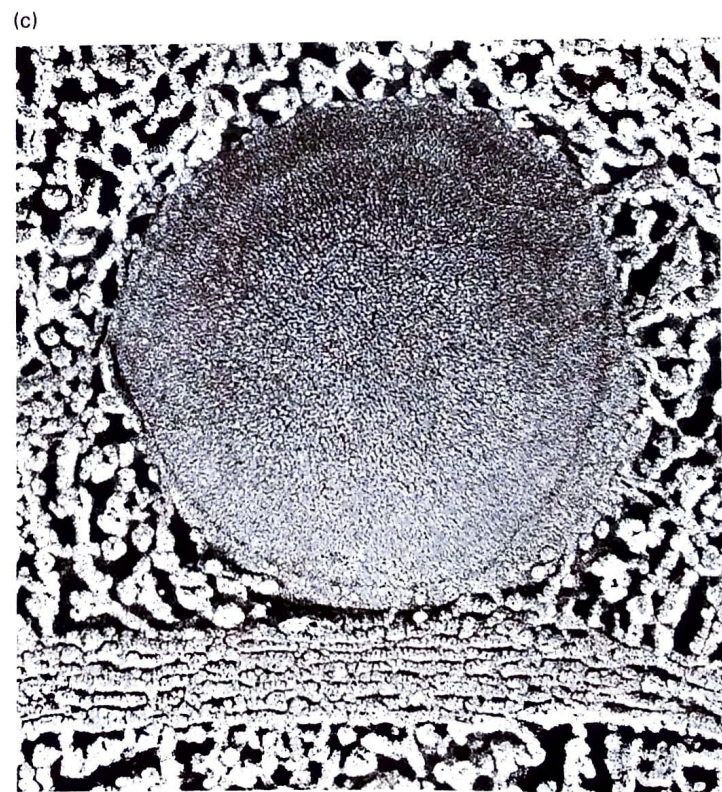
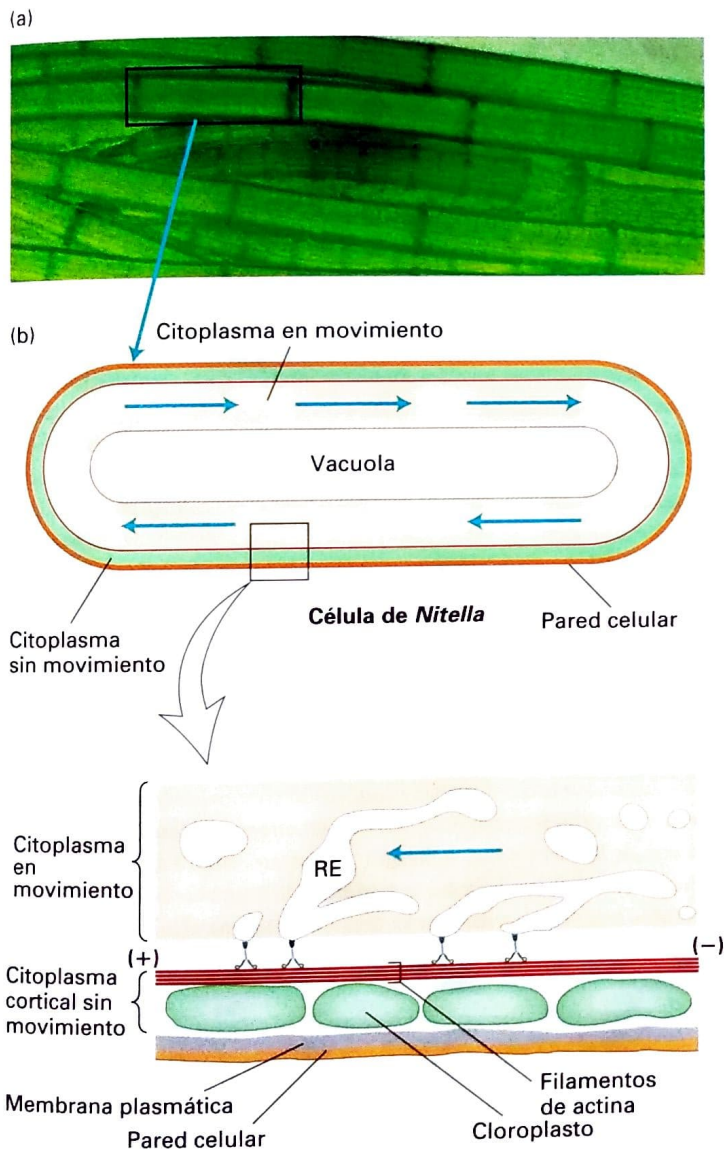


FIGURA 17-39 Corriente citoplasmática en un alga gigante cilíndrica.

(a) Células de *Nitella*, un alga de agua dulce que se encuentra comúnmente en los estanques en el verano. El movimiento citoplasmático, que se describe más abajo, es sorprendente y puede observarse fácilmente con un microscopio simple, ¡de modo que busque alguna *Nitella* (o un alga relacionada) y observe este fenómeno maravilloso! (b) El centro de la célula de *Nitella* está lleno con una vacuola única, grande, llena de agua, rodeada por una capa de citoplasma en movimiento (flechas azules). Una capa de citoplasma cortical que no se mueve, llena de cloroplastos, se encuentra justo por debajo de la membrana

plasmática (agrandada en la figura inferior). En el lado interno de esta capa, hay haces de filamentos de actina estacionarios (rojo), todos orientados con la misma polaridad. Una proteína motora (azul), una miosina vegetal V, lleva partes del retículo endoplasmático (RE) a lo largo de los filamentos de actina. El movimiento de la red del RE impulsa a todo el citoplasma viscoso, incluidos los orgánulos que se encuentran en la trama de la red del RE. (c) Fotomicrografía electrónica del citoplasma cortical que muestra una gran vesícula conectada con un haz subyacente de filamentos de actina. (Parte [a] de James C. French; parte [c] de B. Kachar.)

flujo se encuentra en la membrana. En fotomicrografías electrónicas pueden verse haces de filamentos de actina alineados a lo largo de la longitud de la célula, presentes por encima de cloroplastos estacionarios, localizados adyacentes a la membrana. La mayor parte del citosol es impulsada por la miosina V (conocida también como miosina XI en los vegetales) unida a partes del RE adyacentes a los filamentos de actina. La velocidad de flujo del citosol en *Nitella* es aproximadamente 15 veces mayor que el movimiento producido por cualquier otra miosina conocida.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 17.6

Movimientos impulsados por la miosina

- En el músculo esquelético las miofibrillas contráctiles están compuestas por miles de unidades repetitivas llamadas sarcómeros. Cada sarcómero consiste en dos tipos de filamentos que se interdigitan: los filamentos gruesos de miosina y los filamentos delgados de actina (véase Fig. 17-31).
- La contracción del músculo esquelético involucra el deslizamiento, dependiente de ATP, de los filamentos gruesos de miosina a lo largo de los filamentos delgados de actina, para acortar el sarcómero y así la miofibrilla (véase Fig. 17-32).
- Los extremos de los filamentos delgados de actina del músculo esquelético son estabilizados por la CapZ en el extremo (+) y por la tropomodulina en el extremo (-). Dos proteínas grandes, la nebulina asociada con los filamentos delgados y la titina asociada con los gruesos, contribuyen adicionalmente a la organización del músculo esquelético.
- La contracción del músculo esquelético está sujeta a la regulación de los filamentos delgados. A bajos niveles de Ca^{2+} libre, el músculo está relajado y la tropomiosina bloquea la interacción de la miosina con la F-actina. A niveles de Ca^{2+} elevados, el complejo de la troponina asociada con la tropomiosina, se une al catión y mueve la tropomiosina de modo que quedan al descubierto los sitios de unión a la miosina presentes en la actina, lo que permite la contracción (véase Fig. 17-35).
- Las células de músculo liso y las no musculares tienen haces contráctiles de filamentos de actina y miosina con una organización similar a la del músculo esquelético, pero menos ordenada.
- Los haces contráctiles están sujetos a la regulación de los filamentos gruesos. Una cadena ligera de la miosina se fosforila por acción de la cinasa de la cadena ligera de miosina, la que activa a la miosina y, de este modo, induce la contracción. Esta cinasa se activa por la unión de Ca^{2+} -calmodulina cuando se eleva la concentración de Ca^{2+} libre (véase Fig. 17-37).
- La miosina V transporta carga desplazándose de modo procesivo sobre los filamentos de actina.

17.7 Migración celular: mecanismo, señalización y quimiotaxis

Ya hemos analizado los diferentes mecanismos empleados por las células para crear movimiento—desde el ensamblaje de los filamentos de actina y la formación de haces y redes de filamentos de actina hasta la contracción de los haces de actina y miosina y el transporte de orgánulos por las moléculas de miosina a lo largo de los filamentos de

actina—. Parte de estos mismos mecanismos constituyen los principales procesos por los cuales las células generan las fuerzas necesarias para migrar. La *migración celular* resulta de la coordinación de movimientos generados en diferentes partes de una célula, integrados con un ciclo endocítico dirigido.

El estudio de la migración celular es importante para muchos campos de la biología y la medicina. Por ejemplo, una característica esencial del desarrollo animal es la migración de células específicas a lo largo de vías predeterminadas. Las células epiteliales de un animal adulto migran para cicatrizar una herida y los glóbulos blancos migran a los sitios de infección. Resulta menos obvia la continua migración lenta de las células del epitelio intestinal a lo largo de las vellosidades del intestino y la migración lenta pero constante de las células endoteliales que tapizan los vasos sanguíneos. La migración inadecuada de las células cancerosas después de desprenderse de su tejido normal da como resultado las metástasis.

La migración celular se inicia con la formación de una protuberancia grande, amplia, de la membrana, en el borde conductor de una célula. La videomicroscopía revela que una característica principal de este movimiento es la polimerización de la actina en la membrana. Los filamentos de actina en el borde conductor se entrecruzan rápidamente en haces y redes en una región que sobresale, llamada *lamelipodio*, en las células de los vertebrados. En algunos casos, proyecciones delgadas con forma de dedos, llamadas *filopodios*, también se extienden desde el borde conductor. Estas estructuras forman contactos estables con la superficie subyacente (como la matriz extracelular) a través de la cual se mueve la célula. En esta sección, miramos con mayor detenimiento el modo en que las células coordinan varios procesos basados en microfilamentos con la endocitosis para moverse a través de una superficie. También consideramos el papel de las vías de señalización en la coordinación e integración de las acciones del citoesqueleto, foco principal de la investigación actual.

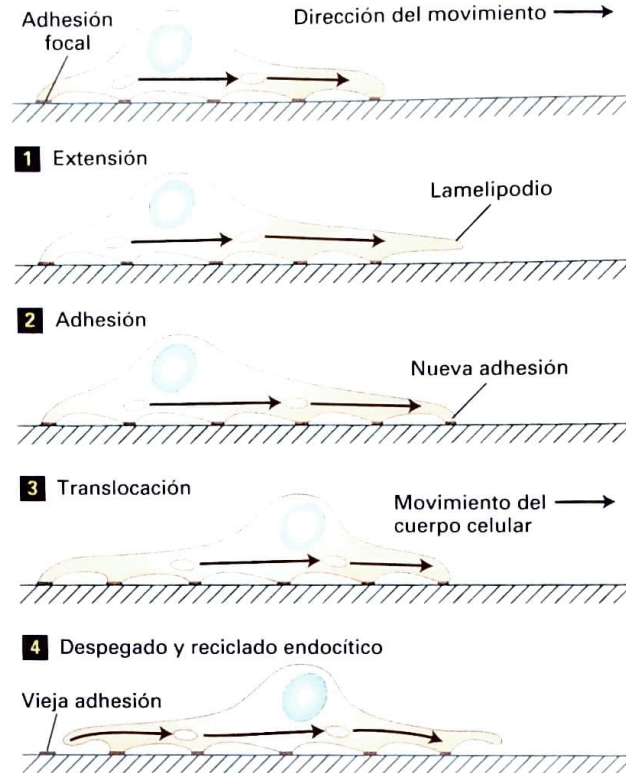
La migración celular coordina la generación de fuerzas con la adhesión celular y el reciclado de la membrana

Un fibroblasto (célula de tejido conectivo) en movimiento muestra una secuencia característica de eventos: extensión inicial de una protuberancia de la membrana, adhesión al sustrato, flujo hacia adelante del citosol y retracción de la parte posterior de la célula (Fig. 17-40). Estos eventos ocurren con un patrón ordenado en una célula que se mueve con lentitud, como un fibroblasto, pero en las células que se mueven con rapidez como los macrófagos, todos ellos ocurren simultáneamente de modo coordinado. Consideraremos primero el papel del citoesqueleto de actina y luego la participación del ciclo endocítico.

Extensión de la membrana La red de filamentos de actina en el borde conductor es un tipo de máquina celular que empuja la membrana hacia adelante, de un modo muy semejante a la propulsión de *Listeria* por la polimerización de la actina (Fig. 17-41d; para *Listeria*, véase Fig. 17-17c). Así, en la membrana del borde conductor, la actina está nucleada por el complejo Arp2/3 activado y los filamentos se alargan por el ensamblaje en los extremos (+) adyacentes a la membrana plasmática. A medida que la red de actina se fija con respecto al sustrato, la membrana del frente es empujada hacia afuera según los filamentos se alargan. Esto es muy similar a lo que ocurre con *Listeria*, que “cabalga” sobre la cola de actina en polimerización, que también está fija dentro del citoplasma. El recambio

VIDEO: Mecanismo de migración de queratinocitos de pez
VIDEO: Filamentos de actina en el lamelipodio de un queratinocito de pez

FIGURA 17-40 Pasos del movimiento celular. El movimiento se inicia con la extensión de uno o más lamelipodios desde el borde conductor de la célula **1**; algunos lamelipodios se adhieren al sustrato por adhesiones focales **2**. Entonces, la mayor parte del citoplasma en el cuerpo celular fluye hacia adelante debido a la contracción en la parte posterior de la célula **3**. El borde de atrás de la célula permanece pegado al sustrato hasta que la cola finalmente se desprende y se retrae al interior del cuerpo celular. Durante este ciclo basado en el citoesqueleto, el ciclo endocítico internaliza a la membrana y las integrinas en la parte posterior de la célula y las transporta hacia el frente (flechas) para volver a usarlas al hacer nuevas adhesiones **4**.



de actina, y así el recambio rotatorio, está mediado, como en las colas de cometa de *Listeria*, por la acción de la profilina y la cofilina (Fig. 17-41d).

Adhesiones célula-sustrato Cuando la membrana se ha extendido y el citoesqueleto se ha ensamblado, la membrana plasmática se adhiere firmemente al sustrato. La videomicroscopia in vivo demuestra que los haces de actina en el borde conductor se anclan a estructuras conocidas como *adhesiones focales* (Fig. 17-41c). La unión cumple dos propósitos: evita que las lamelas conductoras se retraigan y une la célula al sustrato, permitiéndole avanzar. Dada la importancia de las adhesiones focales y de su regulación durante la locomoción celular, no resulta sorprendente que se hayan descubierto que éstas son muy ricas en moléculas implicadas en las vías de transducción de las señales. Las adhesiones focales se analizan con más detalle en el Capítulo 20, donde debatimos acerca de las interacciones célula-matriz.

Las moléculas de adhesión de la célula que median la mayoría de las interacciones célula-matriz son proteínas de la membrana llamadas *integrinas*. Estas proteínas tienen un dominio externo que se une a componentes específicos de la matriz extracelular, como la fibronectina y el colágeno, y un dominio citoplasmático que los vincula con el citoesqueleto de actina (véanse Fig. 17-41c y Cap. 20). La célula forma adhesiones en el frente, y a medida que la célula migra avanzando, las adhesiones finalmente asumen posiciones hacia la zona posterior.

Translocación del cuerpo celular Después de que las adhesiones de la zona frontal se han hecho, el contenido mayoritario del cuerpo celular se transloca hacia adelante (véase Fig. 17-40, paso **3**). Se cree que el núcleo y otros orgánulos insertos en el citoesqueleto se mueven avanzando por una contracción cortical dependiente de la miosina II en la parte posterior de la célula, al igual que cuando se exprime la mitad inferior de un tubo de pasta dental. Compatible con este modelo, la miosina II se encuentra localizada en la parte posterior de la corteza celular.

Ruptura de las adhesiones de las células Finalmente, en el último paso del movimiento (desprendimiento), las adhesiones focales de la parte posterior de la célula se rompen, las integrinas se reciclan y la cola liberada se une con la parte delantera. Al microscopio óptico se ve que la célula se afloja de sus conexiones—quizás, por la contracción de las fibras de tensión en la cola o por tensión elástica—y, en ocasiones, deja una pequeña porción de su membrana detrás, aun firmemente unida al sustrato.

La capacidad de una célula de moverse corresponde a un equilibrio entre las fuerzas mecánicas generadas por el citoesqueleto y las fuerzas

resistivas generadas por las adhesiones de las células. Las células no se pueden mover si están demasiado fuertemente unidas o no unidas a una superficie. Esta relación puede demostrarse al medir la velocidad de movimiento en las células que expresan niveles variables de integrinas. Estas mediciones muestran que la migración más rápida ocurre a un nivel intermedio de adhesión, y que la velocidad de movimiento cae a niveles de adhesión elevados y bajos. La locomoción celular resulta así de fuerzas de tracción ejercidas por la célula sobre el sustrato subyacente.

Reciclado de las membranas y de las integrinas por endocitosis Los cambios dinámicos en el citoesqueleto de actina solos no son suficientes para impulsar la migración celular; también es dependiente del reciclado endocítico de las membranas. La membrana necesaria durante la extensión del lamelipodio es proporcionada por endosomas internos después de su exocitosis. Las moléculas de adhesión en las adhesiones focales en la parte posterior de la célula se internalizan a partir del desensamblaje de contactos focales y son transportadas por un ciclo endocítico hacia el frente para hacer nuevas adhesiones al sustrato (Fig. 17-40, paso **4**). Este ciclo de moléculas de adhesión en una célula que está migrando se asemeja al modo en que un tanque emplea sus bandas de rodadura para avanzar. Este movimiento de membrana internamente a través de la célula genera también un flujo de membrana hacia atrás, a través de la superficie celular. De hecho, este tipo de flujo puede contribuir a la locomoción celular, como se ha encontrado recientemente que los glóbulos blancos pueden moverse en un líquido (“nadar”) en ausencia de adhesión al sustrato.

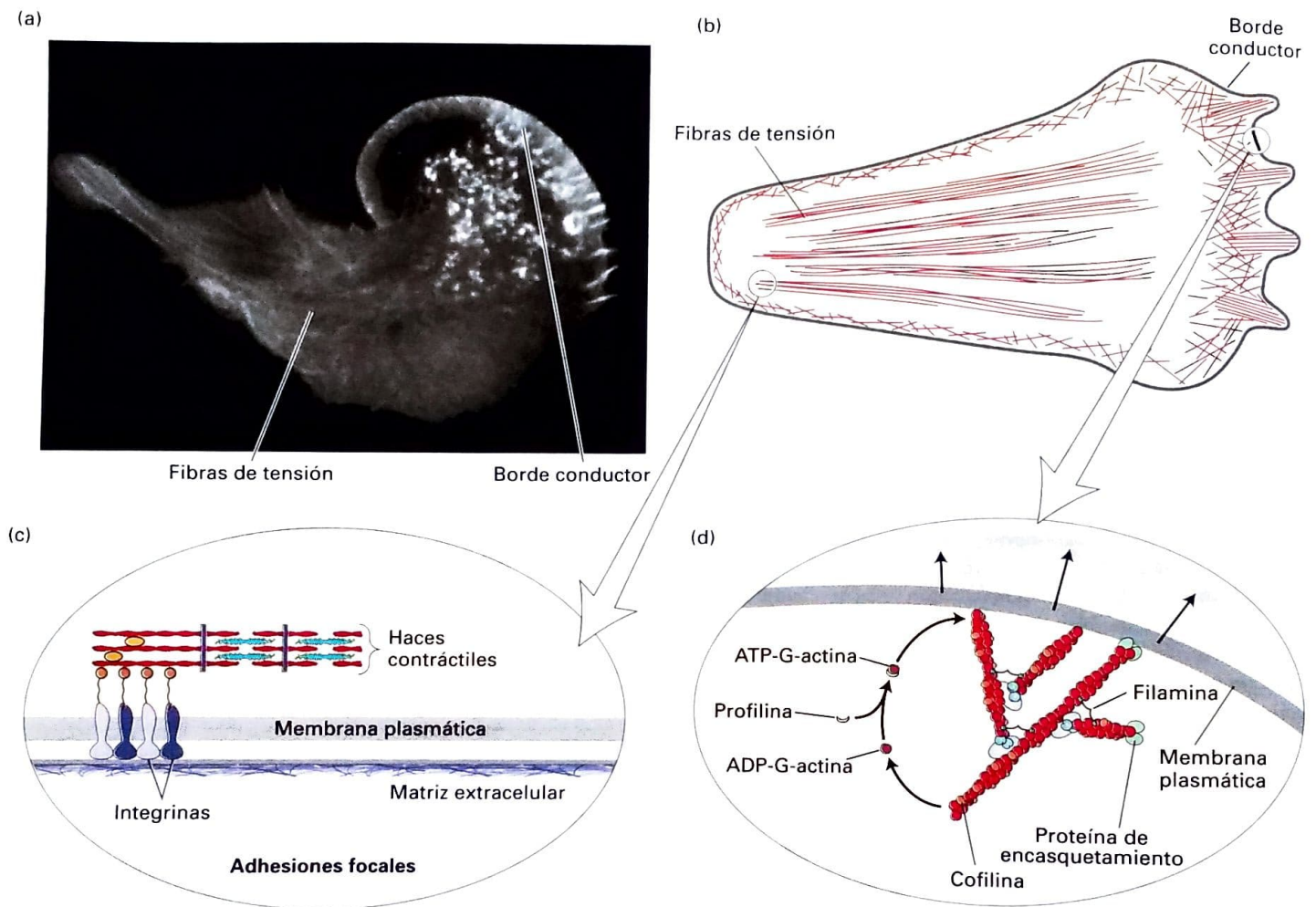


FIGURA 17-41 Estructuras basadas en actina implicadas en la locomoción celular. (a) Localización de la actina en un fibroblasto que expresa actina-PFV. (b) Diagrama de las clases de microfilamentos implicados en la migración celular. La red de filamentos de actina del borde conductor hace avanzar la célula. Las fibras contráctiles de la corteza celular aprietan el cuerpo celular hacia adelante, y las fibras de tensión que terminan en adhesiones focales también arrastran la mayor parte del cuerpo celular cuando las adhesiones de la parte posterior se liberan. (c) La estructura de las

adhesiones focales implica la unión de los extremos de las fibras de tensión a través de integrinas a la matriz extracelular subyacente. Las adhesiones focales contienen también muchas moléculas de señalización importantes para la locomoción celular. (d) La red dinámica de actina del borde conductor está nucleada por el complejo Arp2/3 y emplea el mismo conjunto de factores que controlan el ensamblaje y desensamblaje de los filamentos de actina en la cola de *Listeria* (véase Fig. 17-17). (Parte [a] cortesía de J. Vic Small.)

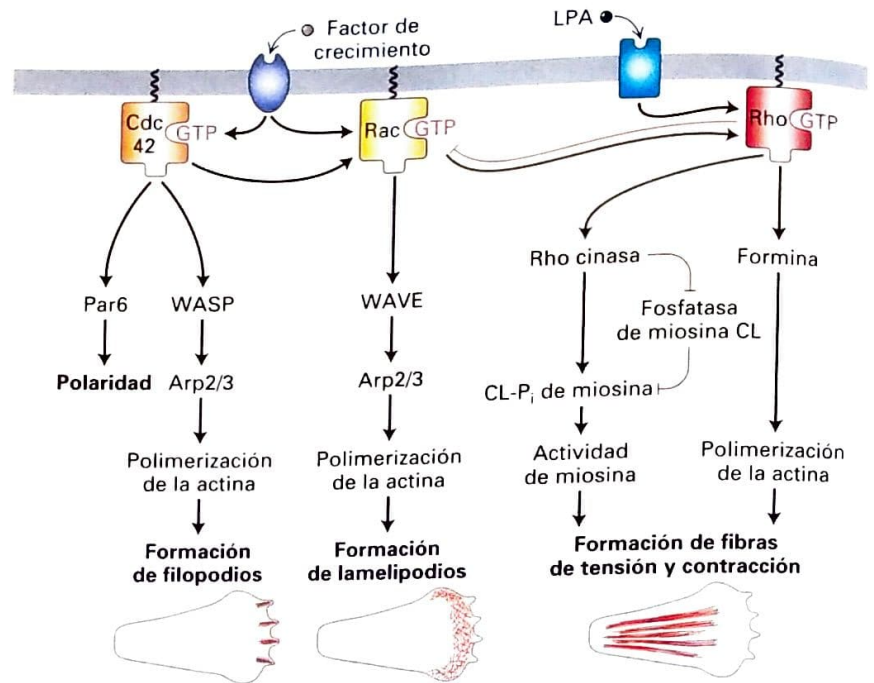
Las pequeñas proteínas Cdc42, Rac y Rho que unen GTP controlan la organización de la actina

Una característica sorprendente de una célula en movimiento es su polaridad: una célula tiene un frente y una parte posterior. Cuando una célula gira, un nuevo borde conductor se forma en la nueva dirección. Si estas extensiones se formaran en todas las direcciones al mismo tiempo, la célula sería incapaz de elegir una nueva dirección de movimiento. Para sostener el movimiento en una dirección particular, una célula requiere señales para coordinar los eventos que ocurren en la parte delantera de la célula y en la parte trasera y, de hecho, señales que le permitan a la célula

saber dónde está el frente. La comprensión del modo en que ocurre esta coordinación surgió de estudios hechos con factores de crecimiento.

Los factores de crecimiento, tales como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), se unen a receptores específicos de la superficie celular (Cap. 16) y estimulan a las células para moverse y luego dividirse. Por ejemplo, en una herida, las plaquetas de la sangre se activan al ser expuestas al colágeno de la matriz extracelular en el borde de la herida, lo cual ayuda a la sangre a coagularse. Las plaquetas activadas también secretan PDGF para atraer fibroblastos y células epiteliales, con el fin de que ingresen a la herida y la reparen. Es posible ver parte de este proceso in

FIGURA 17-44 Resumen de los cambios inducidos por señales en el citoesqueleto de actina. Las señales específicas, como los factores de crecimiento y el ácido lisofosfatídico (LPA), son detectados por receptores de la superficie celular. La detección lleva a la activación de las pequeñas proteínas que unen GTP, que luego interactúan con efectores para llevar a cabo cambios del citoesqueleto según se ha indicado.



Se descubrió que la Cdc42 activa-dominante resultaba en la aparición de filopodios, la Rac activa-dominante resultaba en la aparición de ondulaciones de la membrana y la Rho activa-dominante resultaba en la aparición de fibras de tensión que luego se contraían (Fig. 17-43). ¿De qué manera puede decirse si una Rac activa-dominante y una estimulación por factor de crecimiento, ambos estimulantes de la formación de ondulaciones en la membrana, operan en la misma vía de transducción de las señales? Si la estimulación por factor de crecimiento conduce a la inactivación de la Rac, la introducción de una proteína Rac negativa-dominante a la célula bloquearía la capacidad de un factor de crecimiento de inducir las ondulaciones de la membrana. Esto es precisamente lo que se encuentra. Empleando ésta y muchas otras estrategias bioquímicas, los científicos han identificado vías de señalización que involucran a la Cdc42, la Rac y la Rho (Fig. 17-44).

Algunas de las vías que regulan estas proteínas contienen proteínas con las cuales estamos familiarizados. La activación de la Cdc42 estimula el ensamblaje de la actina por Arp2/3 mediante la activación de la WASp, una proteína factor promotor de la nucleación (NPF) (véase Fig. 17-16), que da como resultado la formación de filopodios. La activación de la Rac también induce el Arp2/3, mediada por el complejo WAVE, que lleva al ensamblaje de filamentos de actina ramificados en el borde conductor. La activación de la Rho tiene al menos dos efectos. En primer término, puede activar una formina para el ensamblaje de un filamento de actina no ramificado. En segundo término, mediante la activación de la cinasa Rho, puede fosforilar la cadena ligera de la miosina para activar a la miosina II no muscular y también inhibir la desfosforilación de la cadena ligera al fosforilar la fosfatasa de la cadena ligera de miosina para inhibir su actividad. Ambas acciones de la cinasa Rho conducen a un nivel más elevado de fosforilación de la cadena ligera de la miosina y, por lo tanto, una actividad más alta de la miosina y la contracción. Las tres proteínas Rho, Cdc42, Rac y Rho, también están vinculadas por vías de activación e inhibición, como se muestra en la Figura 17-44.

La migración celular implica la regulación coordinada de Cdc42, Rac y Rho

¿De qué manera cada una de estas pequeñas proteínas que unen GTP contribuye a la regulación de la migración celular? Para responder esta pregunta, los investigadores desarrollaron un ensayo in vitro de curación de heridas (Fig. 17-45a). Las células en cultivo se hacen crecer en una placa de Petri, con factores de crecimiento, permitiéndole crecer hasta que se encuentren confluentes y formen una monocapa estrecha, momento en el cual cesan la división. La monocapa celular luego es raspada con una aguja para remover una franja de células con el fin de generar una "herida" que contenga un borde libre de células. Las células de ese borde detectan la falta de sus vecinas y, en respuesta a los componentes de la matriz extracelular expuestos ahora sobre la placa de Petri, se mueven para llenar el área de la herida vacía (Fig. 17-45b). Para hacer esto, se orientan hacia el área libre, primero extendiendo un lamelipodio y luego moviéndose en esa dirección. De este modo puede estudiarse la inducción de la migración celular dirigida in vitro.

Empleando este sistema, los investigadores han introducido Rac negativa-dominante en las células en un borde de herida para ver de qué manera esto afecta la capacidad de las células de migrar y llenar esa herida. Dado que se necesita Rac para la activación del complejo Arp2/3 para formar el lamelipodio, no resulta sorprendente que las células no puedan formar esta estructura y no migren y, de este modo, la herida no se cierre (Fig. 17-45c). Un resultado muy interesante se obtiene cuando la Cdc42 negativa-dominante se introduce en las células en el borde de la herida: éstas pueden formar un borde conductor pero no se orientan en la dirección correcta —de hecho, intentan migrar en direcciones al azar. Esto sugiere que la Cdc42 es crítica para regular la polaridad global de la célula. Estudios hechos en levaduras (en las que se describió la Cdc42 inicialmente), monocapas celulares con heridas, células epiteliales y neuronas mostraron que la Cdc42 es una reguladora maestra de la polaridad en muchos sistemas distintos. Parte de esta

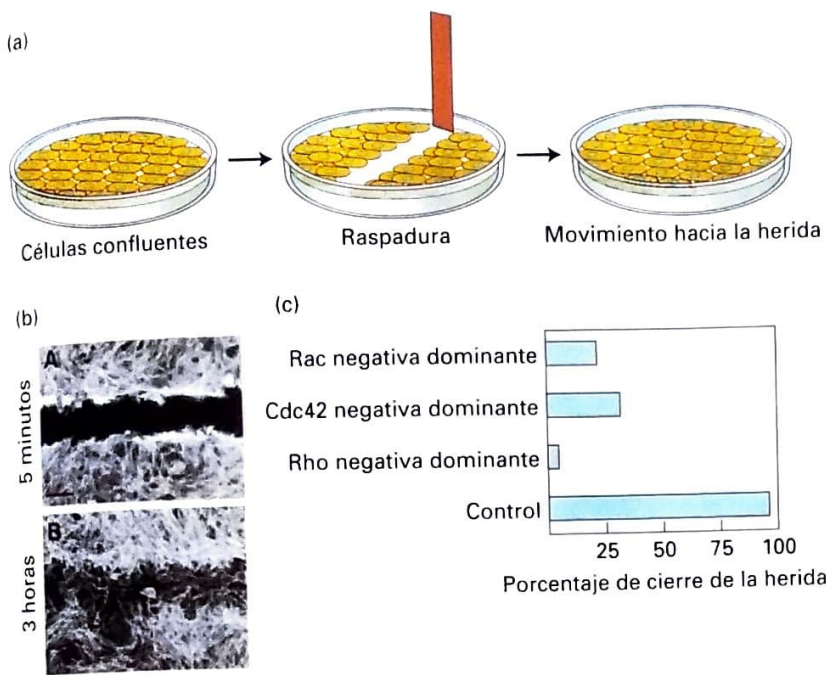


FIGURA EXPERIMENTAL 17-45 El ensayo de monocapas celulares dañadas puede ser empleado para separar las vías de señalización en el movimiento celular dirigido. (a) Una capa confluyente de células se raspa para remover una franja de aproximadamente tres células de ancho, con el fin de generar un borde libre de células. Las células detectan el espacio libre y la nueva matriz extracelular expuesta y, en el período de horas, llenan esta área. (b) Localización de la actina en una monocapa lesionada 5 minutos y 3 horas después del raspado; las células han migrado al área herida. (c) Efecto de introducir Cdc42, Rac y Rho negativas-dominantes a las células en el borde de la herida; todas afectan el cierre de la lesión. (Partes (b) y (c) de C. D. Nobes y A. Hall, 1999, *J. Cell Biol.* **144**:1235.)

regulación en animales implica la unión de la Cdc42 a su efectora, la Par6, una proteína de polaridad que funciona en los nematodos (donde se la descubrió), las neuronas y las células epiteliales. Exploramos estas vías de polaridad con mayor detalle en el Capítulo 21.

Los estudios tales como éstos sugieren un modelo general del modo en que está controlada la migración celular (Fig. 17-46). Las señales de este ambiente se transmiten a la Cdc42, que orienta la célula. La célula orientada tiene una elevada actividad Rac en el frente, para inducir la formación del borde conductor; la actividad Rho es alta en la parte posterior, para ensamblar las estructuras contráctiles y activar la maquinaria contráctil dependiente de la miosina II. Es importante notar que las diferentes regiones de la célula pueden tener niveles dife-

rentes de Cdc42, Rac o Rho activas, de modo que estos reguladores están controlados localmente dentro de la célula. Parte de esta regulación espacial ocurre porque algunas proteínas G pequeñas pueden operar de modo antagonista. Por ejemplo, la Rho activa puede estimular vías que conducen a la inactivación de la Rac. Esto podría ayudar a asegurarse de que no hay estructuras del borde conductor que se formen en la parte posterior de la célula.

Las células en migración son dirigidas por moléculas quimiotácticas

En ciertas condiciones, las señales químicas extracelulares guían la locomoción de una célula en una dirección en particular. En algunos casos, el movimiento está guiado por moléculas insolubles en el sustrato subyacente, como en el ensayo de curación de heridas recién descrito. En otros casos, la célula detecta moléculas solubles y las sigue, a lo largo de un gradiente de concentración, hasta su fuente —un proceso conocido como **quimiotaxis**—. Por ejemplo, los leucocitos (glóbulos blancos sanguíneos) son guiados hacia una infección por un tripéptido secretado por muchas bacterias (Fig. 17-47a). En otro ejemplo, durante el desarrollo del músculo esquelético, una proteína de señal secretada llamada *factor de dispersión* guía la migración de los mioblastos a las localizaciones apropiadas en los esbozos de los miembros. Uno de los ejemplos mejor estudiados de quimiotaxis es la migración de las amebas *Dictyostelium* durante su respuesta a la falta de nutrientes. Cuando estas amebas del suelo se estresan, comienzan a secretar cAMP, que es un agente quimiotáctico extracelular de este organismo. Otras células de *Dictyostelium* elevan el gradiente de concentración del cAMP hacia su fuente (véase Fig. 17-47a). Así, las amebas se mueven una hacia la otra, agregándose como una babosa migratoria y luego se diferencian en un cuerpo fructificante en el cual se forman esporas resistentes a la falta de nutrientes.

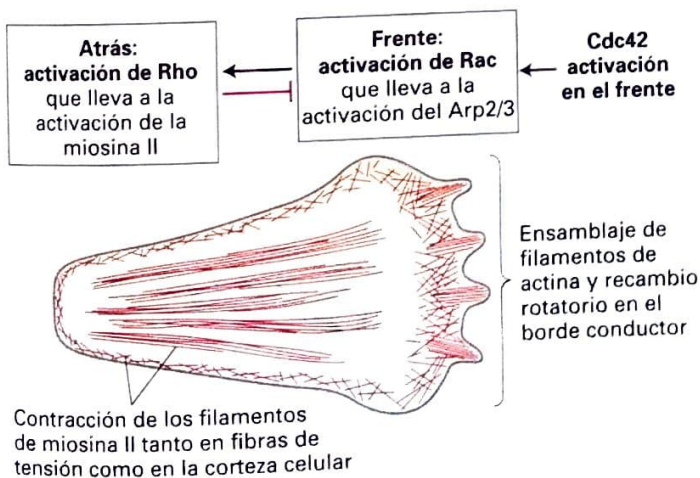


FIGURA 17-46 Contribución de la Cdc42, la Rac y la Rho al movimiento celular. La polaridad general de una célula en migración es controlada por la Cdc42, que se activa en el frente de la célula. La activación de la Cdc42 conduce a una Rac activa en el frente de la célula, lo que genera un borde conductor, y la Rho activa en la parte posterior, lo que provoca la activación y contracción de la miosina II. La Rho activa inhibe la activación de la Rac, asegurando la asimetría en las dos proteínas G activas.

A pesar de la variedad de moléculas quimiotácticas distintas —azúcares, péptidos, metabolitos celulares, lípidos de la pared o de la membrana celular—, todas operan por medio de un mecanismo común y familiar: la unión a los receptores de la superficie celular, la

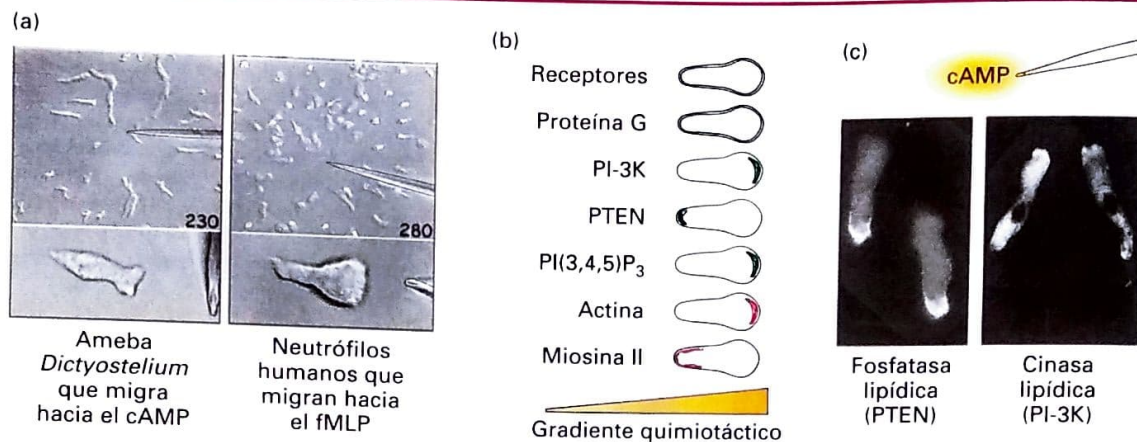


FIGURA EXPERIMENTAL 17-47 La quimiotaxis implica niveles elevados de fosfoinosítidos de señalización, que señalan al citoesqueleto de actina. (a) Las células de *Dictyostelium* migran hacia una pipeta de cAMP (izquierda) y los neutrófilos humanos (un tipo de leucocitos) migran hacia una pipeta con fMLP (Met-Leu-Phe formilado), un péptido quimiotáctico producido por las bacterias (derecha). En los dos paneles inferiores hay *Dictyostelium* individuales en quimiotaxis y células neutrofilicas que se ven muy semejantes a pesar de los 800 millones de años de evolución que las separan. (b) Resumen de los resultados de los estudios que exploran la localización de los

componentes de las vías de señalización (verde) en las células de *Dictyostelium* que tienen quimiotaxis hacia el cAMP. También se muestra la localización de la actina y de la miosina (rojo). (c) La enzima PI-3 cinasa, que genera PI(3,4,5)P₃, está enriquecida en el frente de las células atraídas por quimiotaxis, mientras que la PTEN, la fosfatasa que hidroliza a la PI(3,4,5)P₃, está enriquecida en la parte posterior. Estas distribuciones dan como resultado PI(3,4,5)P₃ elevado en el frente de las células, lo cual señala la polaridad del movimiento. (Parte [a] de C Parent, 2004, *Curr Opin Cell Biol* 16:4; parte [c] de M Iijima y cols., 2002, *Dev Cell* 3:469.)

activación de vías de señalización intracelulares y el remodelamiento del citoesqueleto mediante la activación o la inhibición de varias proteínas que se unen a la actina. Lo que resulta bastante sorprendente es que solo un 2% de diferencia en la concentración de las moléculas quimiotácticas entre el frente y la parte posterior de la célula sea suficiente como para inducir la migración celular dirigida. Resulta de igual modo sorprendente el hallazgo de que las vías de transducción de las señales internas empleadas en la quimiotaxis se hayan conservado entre las amebas *Dictyostelium* y los leucocitos humanos a pesar de casi mil millones de años de evolución.

Los gradientes quimiotácticos inducen niveles de fosfoinosítido alterados entre la parte anterior y posterior de una célula

Para investigar la forma en que las amebas *Dictyostelium* detectan un gradiente quimiotáctico, los investigadores han estudiado receptores de la superficie celular para el cAMP extracelular y vías de señalización corriente abajo en la expectativa de que éstas, de algún modo, detecten el gradiente de concentración. Antes de analizar los detalles, consideremos el modo en que un sistema de este tipo podría operar. Si una célula pudiera detectar una diferencia del 2% en la concentración en su longitud, resulta poco probable que la simple activación del ensamblaje de actina en 2% más en el frente que en la parte posterior condujera a un movimiento dirigido. En lugar de ello, debería haber algún mecanismo que amplificara esta pequeña diferencia de señal externa a una diferencia bioquímica interna grande. Una manera de hacer esto sería para que la célula restara la señal promedio del frente y la parte posterior y solo respondiera a la *diferencia de la señal*. Se cree que éste es el modo en que opera el sistema. Para tratar de comprender este mecanismo, los investigadores han puesto atención

en la concentración de los componentes activos de la vía de señalización para ver dónde ocurre la amplificación.

Las fotomicrografías de los receptores de cAMP marcados con proteína fluorescente verde (PFV) muestran que los receptores están distribuidos de modo uniforme sobre la superficie de una ameba (Fig. 17-47b); por lo tanto, debe establecerse un gradiente interno por otro componente de la vía de señalización. Dado que los receptores de cAMP señalan a través de proteínas G triméricas (Cap. 16), se marcó una subunidad de la proteína G trimérica y otras proteínas de señalización corriente abajo con PFV para mirar su distribución. Las fotomicrografías de fluorescencia muestran que la concentración de las proteínas G triméricas también es bastante uniforme. Corriente abajo de la proteína G trimérica está la PI-3 cinasa, una enzima que fosforila los fosfolípidos de membrana unidos a inositol (los fosfoinosítidos), tales como el PI4,5-bisfosfato [PI(4,5)P₂], creando un lípido de señalización PI3,4,5-trisfosfato [PI(3,4,5)P₃] (véase Fig. 16-25). Notablemente, la enzima PI-3 cinasa está muy enriquecida en el frente de las células en migración, al igual que sus productos. PTEN, la fosfatasa que desfosforila el lípido de señalización PI(3,4,5)P₃ nuevamente a PI(4,5)P₂, se encuentra enriquecida en la cola de la célula en migración (Fig. 17-47b, c). Se cree que esta asimetría se establece del siguiente modo. Antes de la exposición de la célula a un gradiente de cAMP, la fosfatasa PTEN se asocia de modo uniforme con la membrana plasmática. Cuando una célula "ve" un gradiente, se activa la PI-3 cinasa un poco más en el frente que en la parte posterior. Esto resulta en niveles ligeramente más elevados del fosfolípido de señalización en el frente. La asociación de la PTEN con la membrana es muy sensible al nivel de PI(3,4,5)P₃, de modo que ésta desaparece de modo preferencial de la zona del frente. Dado que es menos eficaz para desfosforilar el PI(3,4,5)P₃ en el frente y más eficaz para desfosforilarlo en la parte posterior, esto resulta en una fuerte asimetría de PI(3,4,5)P₃. Así, la fosfatasa PTEN contri-

buye a la sustracción basal necesaria para que una célula detecte un gradiente de quimioatrayente poco pronunciado.

La diferencia en la concentración local de la $PI(3,4,5)P_3$ ahora le señala al citoesqueleto de actina que se ensamble en un borde conductor en el frente y que se contraiga en la parte posterior (Fig. 17-47b) y la célula se encuentra en su camino hacia la fuente del quimioatrayente. Se ha implicado un mecanismo muy semejante en la quimiotaxis de los leucocitos. Esta polarización de la célula no es estable en ausencia del gradiente quimiotáctico, de modo tal que, si el gradiente cambia, como puede ocurrir con un leucocito que está a la caza de una bacteria en movimiento, la célula también cambiará su dirección y seguirá el gradiente hasta su fuente.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 17.7

Migración celular: mecanismo, señalización y quimiotaxis

- La migración celular implica la extensión de un borde conductor rico en actina en el frente de la célula, la formación de contactos adhesivos que se mueven hacia atrás con respecto a la célula y su posterior liberación, combinados con la contracción en la parte posterior para empujar la célula hacia adelante (véase Fig. 17-40).
- La migración celular también implica un ciclo endocítico indirecto, que toma moléculas de la membrana y de adhesión de la parte posterior de la célula y las inserta en el frente.
- El ensamblaje y la función de los filamentos de actina están controlados por vías de señalización a través de pequeñas proteínas que se unen al GTP y pertenecen a la familia Rho. La Cdc42 regula la polaridad global y la formación de filopodios, la Rac regula la formación de la red de actina a través del complejo Arp2/3, y la Rho regula tanto la formación de filamentos de actina por las forminas como la contracción a través de la regulación de la miosina II (véase Fig. 17-44).
- La quimiotaxis, el movimiento dirigido hacia un atrayente, implica vías de señalización que establecen diferencias en los fosoinositidos entre la parte frontal y la posterior de la célula, que a su vez regula al citoesqueleto de actina y la dirección de la migración celular (véase Fig. 17-47).

Perspectivas para el futuro

En este capítulo hemos visto que las células tienen intrincados mecanismos para el ensamblaje regulado espacial y temporalmente y para el recambio de microfilamentos con el fin de desempeñar muchas funciones. Los análisis bioquímicos de las proteínas que se unen a la actina acoplados con los inventarios de proteínas proporcionados por las secuencias de genomas completos han permitido catalogar muchas clases distintas de proteínas que se unen a la actina. Para comprender de qué modo este gran grupo de proteínas puede ensamblar estructuras específicas en una célula, será importante saber la concentración de todos los componentes, el modo en que interactúan y su regulación por vías de señalización. Aunque ésta puede parecer una tarea de enormes proporciones, los nuevos métodos microscópicos que permiten detectar la localización de interacciones específicas entre proteínas y la localización de muchas de las vías de señalización clave sugieren que se hará un rápido progreso en esta área.

Los inventarios de proteínas proporcionados por las secuencias genómicas también han documentado un gran número de familias de miosina, aunque las propiedades bioquímicas de muchos de estos motores o sus funciones biológicas aún no se han dilucidado. Nuevamente, desarrollos técnicos recientes que incluyen la capacidad de marcar motores con trazadores fluorescentes como la PFV o de anular su expresión con tecnologías de RNAi están proporcionando vías muy poderosas que permiten revelar las funciones motoras. Sin embargo, algunos aspectos importantes de los motores permanecen no explorados en gran medida. Por ejemplo, un motor que transporta un orgánulo a lo largo de un filamento primero debe unirse al orgánulo, luego transportarlo y finalmente liberarlo en destino. Sin embargo, se sabe poco acerca del modo en que estos eventos distintos se coordinan o de qué modo estos tipos de motores basados en la miosina regresan para recoger una nueva carga.

Hace 20 años se creía que todo el ensamblaje de la actina estaba impulsado por la activación del complejo Arp2/3. Luego, se descubrieron las actividades de nucleación y encasquetamiento de las forminas y, más recientemente, se han descubierto nucleadores de actina adicionales con nombres coloridos, como Spire, Cordon-bleu, WASH y WHAMM. Es probable que sigan descubriéndose nucleadores adicionales.

Finalmente, aunque hemos analizado en general los microfilamentos sin relación con un tejido en particular—excepto por las especializaciones que se encuentran en los músculos esquelético y liso—, muchas proteínas que unen actina muestran la expresión en tipos celulares específicos, de modo tal que la distribución y los niveles relativos de estas proteínas son a medida para cumplir funciones específicas en diferentes tipos celulares. Este es claramente el caso, según lo ha revelado el análisis proteómico, de la expresión de proteínas celulares específicas y por el hecho de que muchas enfermedades son una consecuencia de la expresión específica en los tejidos de las proteínas que unen actina o de las miosinas.

Palabras clave

actina 775	microtúbulos 775
proteínas de entrecruzamiento de actina 790	microvellosidades 773
complejo Arp2/3 784	proteínas motoras 775
proteína CapZ 783	miosina 793
proteína Cdc42 811	cinasa de la cadena ligera de miosina 805
migración celular 808	factor de promoción de la nucleación (NPF) 785
polaridad celular 774	golpe impulsor 797
quimiotaxis 813	profilina 782
cofilina 782	proteína Rac 811
haces contráctiles 804	proteína Rho 811
concentración crítica C _c 779	músculo esquelético 793
citoesqueleto 774	músculo liso 804
relación de trabajo 799	tamaño del paso 799
F-actina 777	fibras de tensión 776
filopodios 776	filamentos gruesos 801
formina 784	filamentos delgados 801
G-actina 777	timosina- β_4 783
filamentos intermedios 775	recambio rotatorio 781
lamelipodio 776	tropomodulina 783
borde conductor 776	tropomiosina 803
microfilamentos 775	proteína WASp 785

Revisión de los conceptos

1. Existen tres sistemas de microfilamentos del citoesqueleto en la mayoría de las células eucariotas. Compárelos en términos de composición, función y estructura.
2. Los filamentos de actina tienen una polaridad definida. ¿Qué es la polaridad del filamento? ¿Cómo se genera a nivel de las subunidades? ¿Cómo se detecta la polaridad de un filamento?
3. En las células, los filamentos de actina forman haces o redes. ¿De qué manera las células forman estructuras de este tipo y qué determina en forma específica si los filamentos de actina formarán un haz o una red?
4. Gran parte de nuestra comprensión del ensamblaje de actina en la célula deriva de experimentos que emplean actina purificada *in vitro*. ¿Qué técnicas pueden emplearse para estudiar el ensamblaje *in vitro*? Explique de qué manera opera cada una de estas técnicas. ¿Cuál de estas técnicas le diría a usted si la masa de filamentos de actina está comprendida por muchos filamentos cortos de actina o por menor cantidad de filamentos más largos?
5. Las formas predominantes de actina dentro de una célula son la ATP-G-actina y la ADP-F-actina. Explique el modo en que la interconversión del estado del nucleótido está acoplada con el ensamblaje y desensamblaje de las subunidades de actina. ¿Cuál sería la consecuencia del ensamblaje/desensamblaje de los filamentos de actina si una mutación evitara que la actina se uniera al ATP? ¿Cuál sería la consecuencia si una mutación evitara que la actina hidrolizara al ATP?
6. Los filamentos de actina presentes en el borde conductor de una célula que se desplaza se cree que sufren un recambio rotatorio. ¿Qué es el recambio rotatorio y qué da cuenta de esta conducta de ensamblaje?
7. Si bien la actina purificada puede ensamblarse reversiblemente *in vitro*, varias proteínas que se unen a ella regulan el ensamblaje de los filamentos de actina en una célula. Prediga el efecto del citoesqueleto celular de actina si se microinyectarán en forma independiente los siguientes anticuerpos que bloquearán la función del citoesqueleto de actina: profilina, timosina- β_4 , CapZ y complejo Arp2/3.
8. Prediga el modo en que la actina podría polimerizar en una semilla decorada en punta de flecha (como se muestra en la Fig. 17-9) en presencia de CapZ, tropomodulina o profilina-actina.
9. Compare y contraste los modos en los cuales la formina y la WASp se activan y de qué manera cada una de ellas estimula la formación de los filamentos de actina.
10. Hay al menos 20 tipos diferentes de miosinas. ¿Qué propiedades comparten todos los tipos y qué las hace diferentes? ¿Por qué la miosina II es la única capaz de producir fuerza contráctil?
11. La capacidad de la miosina de desplazarse a lo largo de un filamento de actina puede observarse con ayuda de un microscopio adecuadamente equipado. Describa de qué modo estos ensayos se realizan de forma típica. ¿Por qué se requiere ATP en ellos? ¿De qué manera se pueden emplear estos ensayos para determinar la dirección del movimiento de la miosina o la fuerza producida por ella?
12. Los haces contráctiles se presentan en células no musculares; estas estructuras están menos organizadas que los sarcómeros de las células musculares. ¿Cuál es el propósito de los haces contráctiles no musculares? ¿Cuál es el tipo de miosina presente en los haces contráctiles?
13. ¿De qué manera la miosina convierte la energía química liberada por la hidrólisis del ATP en trabajo mecánico?

14. La miosina II tiene una relación de trabajo del 10% y su tamaño de paso es de 8 nm. Por el contrario, la miosina V tiene una relación de trabajo más alta (alrededor de 70%) y realiza pasos de 36 nm cuando se desplaza a lo largo de un filamento de actina. ¿Qué diferencias entre las miosinas II y V dan cuenta de estas distintas propiedades? ¿De qué manera las diferentes estructuras y propiedades de la miosina II y la V reflejan sus diferentes funciones en las células?

15. La contracción del músculo esquelético y del músculo liso es desencadenada por un incremento del Ca^{2+} del citosol. Compare los mecanismos por los cuales cada tipo de músculo convierte un incremento del Ca^{2+} en una contracción.

16. La fosforilación de la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) por la proteína-quinasa A (PKA) inhibe la activación de la MLCK por la Ca^{2+} -calmodulina. Sustancias como el albuterol se unen al receptor adrenérgico- β , lo cual provoca un incremento en el cAMP de las células y la activación de la PKA. Explique por qué el albuterol es útil para tratar la contracción grave de las células de músculo liso que rodean las vías aéreas implicadas en un ataque de asma.

17. Varios tipos de células emplean el citoesqueleto de actina para impulsar la locomoción a lo largo de superficies. ¿De qué manera los distintos ensamblajes de los filamentos de actina están implicados en la locomoción?

18. Para moverse en una dirección específica, las células en migración deben utilizar señales extracelulares para establecer qué porción de la célula actuará como frente y cuál como parte posterior. Describa de qué manera las proteínas G parecen estar implicadas en las vías de señalización empleadas por las células en migración para determinar la dirección del movimiento.

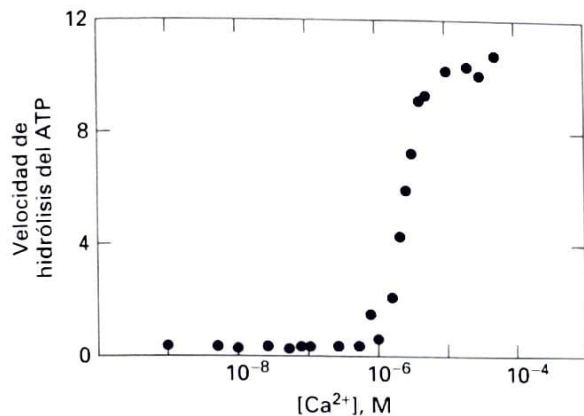
19. La movilidad celular se ha descrito como el movimiento de las bandas de rodadura de un tanque. En el borde conductor, los filamentos de actina se forman rápidamente en haces y redes que hacen protuberancias y mueven la célula hacia adelante. En la parte posterior, se rompen las adhesiones celulares y el extremo de la cola de la célula es arrastrado hacia adelante. ¿Qué proporciona la tracción para las células en movimiento? ¿De qué manera ocurre la translocación del cuerpo celular? ¿De qué manera las adhesiones de la célula se liberan a medida que la célula avanza?

Análisis de los datos

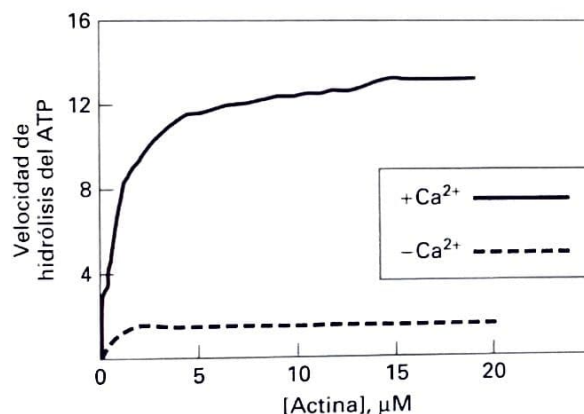
La miosina V es una miosina abundante en células no musculares responsables del transporte de carga tales como orgánulos en muchos tipos celulares. Estructuralmente, consiste en dos cadenas polipeptídicas idénticas que se dimerizan para formar un homodímero. Los dominios motores residen en el extremo N-terminal de cada cadena y contienen sitios de unión, tanto al ATP como a la actina. El dominio motor es seguido por una región de cuello que contiene seis motivos "IQ", cada uno de los cuales une calmodulina, una proteína de unión al Ca^{2+} . El dominio del cuello es seguido de una región capaz de formar espirales enrolladas, vía por la que se dimerizan ambas cadenas. Los 400 residuos de aminoácidos finales forman un dominio globular de la cola (DGT) al cual se une la carga. La miosina V consumiría grandes cantidades de ATP si su dominio motor estuviese siempre activo, y se han realizado varios estudios para comprender de qué manera se regula este motor.

a. La velocidad de la hidrólisis de ATP (es decir, las moléculas de ATP hidrolizadas por segundo por miosina V) fue medida en presencia

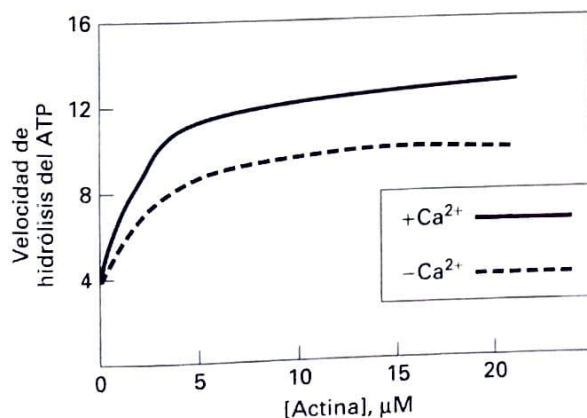
de cantidades crecientes de Ca^{2+} libre. La concentración citosólica de Ca^{2+} libre normalmente es inferior a 10^{-6} M, pero puede elevarse en áreas localizadas de la célula y, con frecuencia, se encuentra elevada en respuesta a un evento de señalización. ¿Qué sugieren estos datos acerca de la regulación de la miosina V?



b. En estudios adicionales, la actividad de ATPasa de la miosina V se midió en presencia de cantidades crecientes de F-actina en presencia de Ca^{2+} libre 10^{-6} M o en ausencia de éste. ¿Qué información adicional proporcionan estos datos acerca de la regulación de la miosina V?



c. Luego, se examinó el comportamiento de la miosina V trunca, que carece de su cola globular C-terminal, y se lo comparó con el comportamiento de la miosina V intacta. A partir de este experimento, ¿qué puede deducir acerca del mecanismo por el cual está regulada la miosina V?



Referencias

Referencias generales

- Bray, D. 2001. *Cell Movements*. Garland.
Howard, J. 2001. *The Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton*. Sinauer.
Kreis, T., and R. Vale. 1999. *Guidebook to the Cytoskeletal and Motor Proteins*. Oxford University Press.

Sitios web

- The myosin home page:
<http://www.mrc-lmb.cam.ac.uk/myosin/myosin.html>
The kinesin home page:
<http://www.cellbio.duke.edu/kinesin/>

Microfilamentos y estructuras de actina

- Holmes, K. C., et al. 1990. Atomic model of the actin filament. *Nature* **347**:44-49.
Kabsch, W., et al. 1990. Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature* **347**:37-44.
Pollard, T. D., and J. A. Cooper. 2009. Actin, a central player in cell shape and movement. *Science* **326**:1208-1212.
Pollard, T. D., L. Blanchoin, and R. D. Mullins. 2000. Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **29**:545-576.

Dinámica de los filamentos de actina

- Paavilainen, V. O., et al. 2004. Regulation of cytoskeletal dynamics by actin-monomer-binding proteins. *Trends Cell Biol.* **14**:386-394.
Theriot, J. A. 1997. Accelerating on a treadmill: ADF/cofilin promotes rapid actin filament turnover in the dynamic cytoskeleton. *J. Cell Biol.* **136**:1165-1168.

Mecanismo de ensamblaje de los filamentos de actina

- Campellone, K. G., and M. D. Welch. 2010. A nucleator arms race: cellular control of actin assembly. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**:237-251.
Chesarone, M. A., et al. 2010. Unleashing formins to remodel the actin and microtubule cytoskeletons. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**:62-74.
Goode, B. L., and M. J. Eck. 2007. Mechanism and function of formins in the control of actin assembly. *Ann. Rev. Biochem.* **76**:593-627.
Gouin, E., M. D. Welch, and P. Cossart. 2005. Actin-based motility of intracellular pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**:35-45.
Higgs, H. N. 2005. Formin proteins: a domain-based approach. *Trends Biochem. Sci.* **30**:342-353.
Pruyne, D., et al. 2002. Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed end association. *Science* **297**:612-615.
Rouiller, I., et al. 2008. The structural basis of actin filament branching by the Arp2/3 complex. *J. Cell Biol.* **180**:887-895.

Organización de las estructuras celulares basadas en actina

- Bennett, V., and A. J. Baines. 2001. Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiol. Rev.* **81**:1353-1392.
Fehon, R.G., A. I. McClatchey, and A. Bretscher. 2010. Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**:276-287.
McGough, A. 1998. F-actin-binding proteins. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **8**:166-176.
Stossel, T. P., et al. 2001. Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**:138-145.

Las miosinas: proteínas motoras basadas en la actina

- Berg, J. S., B. C. Powell, and R. E. Cheney. 2001. A millennial myosin census. *Mol. Biol. Cell* **12**:780-794.

Mermall, V., P. L. Post, and M. S. Mooseker. 1998. Unconventional myosin in cell movement, membrane traffic, and signal transduction. *Science* **279**:527-533.

Rayment, I. 1996. The structural basis of the myosin ATPase activity. *J. Biol. Chem.* **271**:15850-15853.

Vale, R. D. 2003. The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* **112**:467-480.

Vale, R. D., and R. A. Milligan. 2000. The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. *Science* **288**:88-95.

Movimientos impulsados por la miosina

Bretscher A. 2003. Polarized growth and organelle segregation in yeast—the tracks, motors, and receptors. *J. Cell Biol.* **160**:811-816.

Clark, K. A., et al. 2002. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* **18**:637-706.

Grazier, H. L., and S. Labeit. 2004. The giant protein titin: a major player in myocardial mechanics, signaling, and disease. *Circ. Res.* **94**:284-295.

Migración celular: mecanismo, señalización y quimiotaxis

Borisy, G. G., and T. M. Svitkina. 2000. Actin machinery: pushing the envelope. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**:104-112.

Burridge, K., and K. Wennerberg. 2004. Rho and Rac take center stage. *Cell* **116**:167-179.

Etienne-Manneville, S. 2004. Cdc42—the centre of polarity. *J. Cell Sci.* **117**:1291-1300.

Etienne-Manneville, S., and A. Hall. 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**:629-635.

Manahan, C. L., et al. 2004. Chemoattractant signaling in Dictyostelium discoideum. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**:223-253.

Pollard, T. D., and G. G. Borisy. 2003. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**:453-465.

Ridley, A. J., et al. 2003. Cell migration: integrating signals from the front to back. *Science* **302**:1704-1709.

Small, J. V., T. Strada, E. Vignat, and K. Rottner. 2002. The lamellipodium: where motility begins. *Trends Cell Biol.* **12**:112-120.

Una mirada a la contracción muscular

H. Huxley y J. Hanson, 1954, *Nature* **173**:973-976

La contracción y relajación de los músculos estriados nos permiten desempeñar todas nuestras tareas diarias. ¿De qué manera ocurre esto? Los científicos han buscado durante mucho tiempo el modo en que las células musculares fusionadas, llamadas miofibrillas, difieren de otras células que no pueden desempeñar movimientos potentes. En 1954, Jean Hanson y Hugh Huxley publicaron sus estudios de microscopía sobre la contracción muscular, que demostraron el mecanismo por el que ésta ocurre.

Antecedentes

La capacidad de los músculos para desempeñar trabajo ha sido vista durante mucho tiempo como un proceso fascinante. La contracción muscular voluntaria es desempeñada por músculos estriados, que reciben su nombre por su aspecto cuando se ven al microscopio. Hacia 1950, los biólogos que estudiaban las miofibrillas habían dado nombre a muchas de las estructuras que observaban bajo el microscopio. Una unidad contráctil, denominada sarcómero, está constituida por dos regiones principales llamadas banda A y banda I. La banda A contiene dos estriaciones gruesas intensamente coloreadas y una estriación delgada. La banda I está constituida principalmente por estriaciones claras divididas por una línea coloreada oscura conocida como disco Z. Aunque estas estructuras habían sido caracterizadas, su papel en la contracción muscular no quedaba claro. Al mismo tiempo, los bioquímicos también intentaron resolver este problema buscando las proteínas que son más abundantes en las miofibrillas que en las células no musculares. Encontraron que los músculos contienen grandes cantidades de las proteínas estructurales actina y miosina en un complejo entre ambas. La actina y la miosina forman polímeros que pueden acortarse cuando se los trata con trifosfato de adenosina (ATP).

Con estas observaciones en mente, Hanson y Huxley comenzaron su estudio de estriaciones transversales en el músculo. Al

cabo de unos pocos años, unieron los datos bioquímicos con las observaciones microscópicas y desarrollaron un modelo de contracción muscular que aún permanece vigente en la actualidad.

El experimento

Hanson y Huxley principalmente emplearon la microscopía de contraste de fases en sus estudios de músculos estriados, que aislaron de conejo. La técnica les permitió obtener imágenes claras del sarcómero y hacer cuidadosas mediciones de las bandas A e I. Al tratar los músculos con una diversidad de sustancias y de estudiarlos luego al microscopio de contraste de fases, fueron capaces de combinar con éxito la bioquímica con la microscopía para describir la estructura muscular, así como el mecanismo de la contracción.

En el primer conjunto de estudios, Hanson y Huxley emplearon sustancias que se conoce que extraen de modo específico la miosina o la actina de las miofibrillas. En primer término, trataron las miofibrillas con una sustancia química que remueve específicamente la miosina del músculo. Emplearon microscopía de contraste de fases para comparar las miofibrillas no tratadas con aquellas que tenían la miosina extraída. En el músculo no tratado observaron la estructura sarcomérica identificada previamente, que incluía la banda A coloreada en oscuro. Cuando miraron a las células con la miosina extraída, sin embargo, éstas carecían de la banda A que se teñía de oscuro. Luego, extrajeron la actina de las células musculares a las que se les había extraído la miosina. Cuando extrajeron tanto la miosina como la actina de la miofibrilla, no pudieron ver una estructura identificable al microscopio de contraste de fases. A partir de sus experimentos, concluyeron que la miosina se localizaba principalmente en la banda A, mientras que la actina se encontraba todo a lo largo de la miofibrilla.

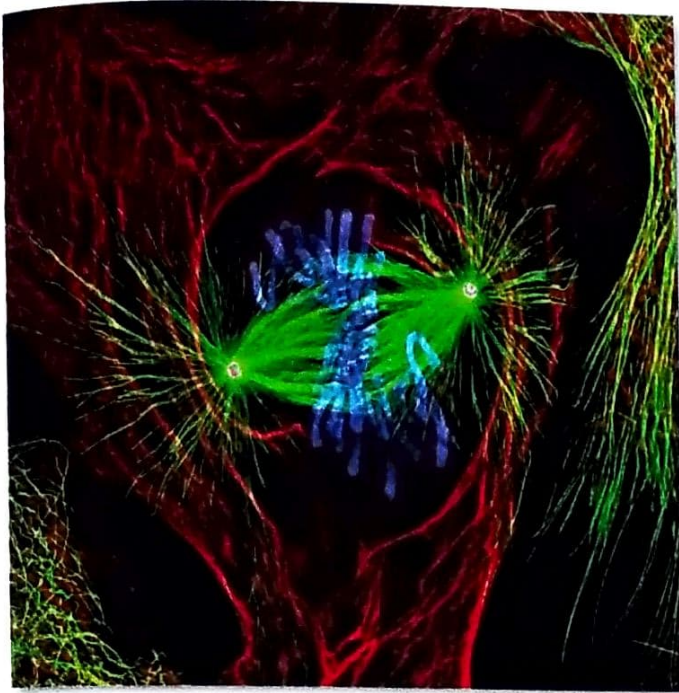
Con una mejor comprensión de la naturaleza bioquímica de las estructuras musculares, Huxley y Hanson estudiaron el mecanismo de la contracción muscular. Aislaron

miofibrillas individuales de tejido muscular y las trataron con ATP, haciendo que se contrajeran a velocidad lenta. Con el empleo de esta técnica pudieron tomar fotografías de varias etapas de la contracción muscular observadas mediante microscopía de contraste de fases. Además, pudieron inducir de modo mecánico el estiramiento al manipular el cubreobjetos, lo que les permitió observar también el proceso de relajación. Con estas técnicas manuales, examinaron el modo en que la estructura de la miofibrilla se modifica durante la contracción y el estiramiento.

En primer término, Huxley y Hanson trataron las miofibrillas con ATP, luego fotografiaron las imágenes que observaron al microscopio de contraste de fases. Estas imágenes les permitieron medir las longitudes de las bandas A e I en varias etapas de la contracción. Cuando miraron miofibrillas que se contraían libremente, notaron un acortamiento reiterado de la banda I, que se teñía ligeramente, mientras que la longitud de la banda A permanecía constante (Fig. 1). Dentro de la banda A observaron la formación de un área de densidad creciente durante la contracción.

A continuación, los dos científicos examinaron el modo en que la estructura de las miofibrillas se modifica durante un estiramiento muscular simulado. Estiraron las miofibrillas aisladas, montadas en portaobjetos, manipulando el cubreobjetos. Una vez más, fotografiaron las imágenes de microscopía de contraste de fases y midieron las longitudes de las bandas A e I. Durante el estiramiento, la longitud de la banda I se incrementaba en lugar de acortarse, como ocurría en la contracción. Nuevamente, la longitud de la banda A permaneció sin modificarse. La zona densa que se formaba en la banda A durante la contracción se hacía menos densa durante el estiramiento.

A partir de sus observaciones, Hanson y Huxley desarrollaron un modelo de contracción y estiramiento muscular (Fig. 1). En su modelo, los filamentos de actina de la banda I son arrastrados a la banda A durante la contracción y, así, la banda I se acorta. Esto permite la interacción aumen-



Célula pulmonar de tritón en mitosis, teñida para visualizar centrosomas (magenta), microtúbulos (verde), cromosomas (azul) y filamentos intermedios de queratina (rojo). (Cortesía de A. Khochjakor, de *Nature* 408:423-24 [2005]).

Organización y movimiento celular II: microtúbulos y filamentos intermedios

Como hemos aprendido en el capítulo previo, hay tres tipos de filamentos que constituyen el citoesqueleto de las células animales: los microfilamentos, los microtúbulos y los filamentos intermedios. ¿Por qué han evolucionado estos tres tipos distintos de filamentos? Parece probable que sus propiedades físicas sean adecuadas para diferentes funciones. En el Capítulo 17, describimos el modo en que los microfilamentos de actina con frecuencia se entrecruzan en redes de haces para formar estructuras flexibles y dinámicas, y a fin de servir como senderos para las muchas clases distintas de motores de miosina. De modo similar, los **microtúbulos** son tubos rígidos que pueden existir como una estructura simple, que se extiende hasta 20 μm en las células o en distribuciones en haces como los que se ven en estructuras especializadas de la superficie celular, tales como los cilios y los flagelos. Una consecuencia de su diseño tubular es la capacidad de los microtúbulos de generar fuerzas de tracción y empuje sin colapsarse, propiedad que le permite a los tubos individuales recorrer grandes distancias dentro de una célula y a los haces deslizarse uno sobre otro, como ocurre en los flagelos y en el huso mitótico. La capacidad de los microtúbulos de recorrer grandes distancias dentro de la célula, junto con su polaridad intrínseca, es explotada por los motores

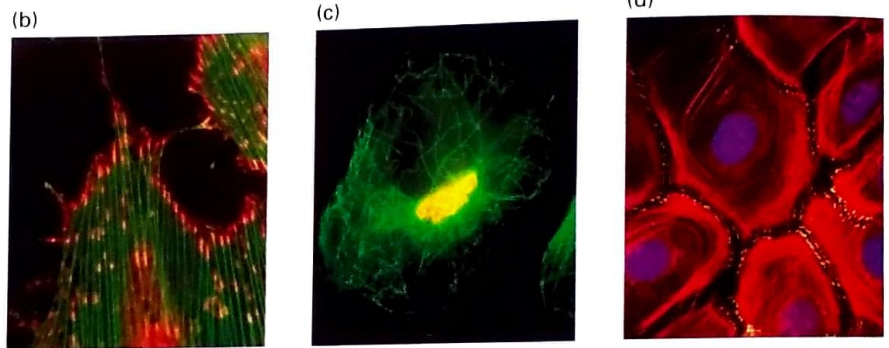
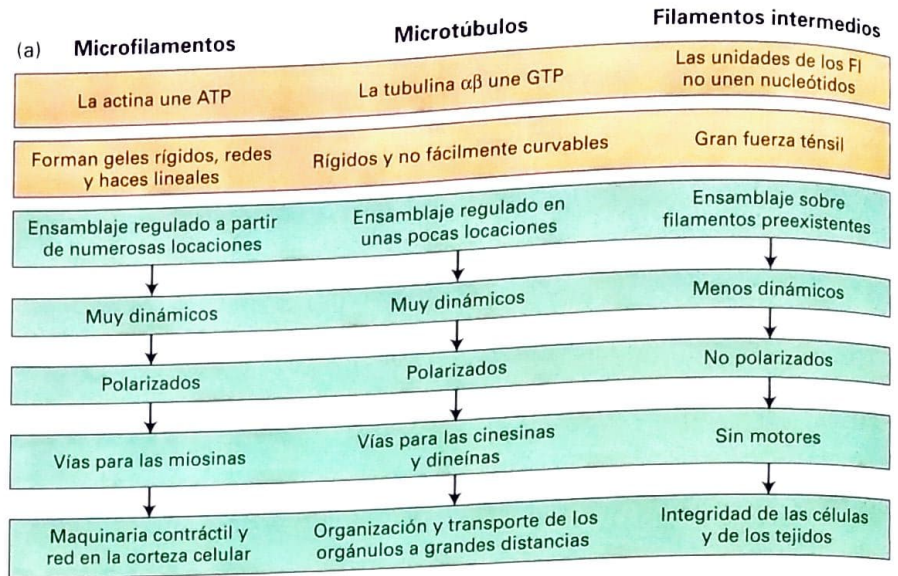
dependientes de microtúbulos que los emplean como sendas para el transporte de orgánulos a grandes distancias. Los microtúbulos pueden ser muy dinámicos (ensamblándose y desensamblándose a partir de sus extremos), proporcionando a la célula la flexibilidad para alterar la organización microtubular si fuera necesario.

Al contrario de lo que ocurre con los microfilamentos y los microtúbulos, los **filamentos intermedios** tienen una gran fuerza ténsil y han evolucionado para soportar fuerzas y tensiones mucho mayores. Con propiedades similares a la de fuertes cuerdas moleculares, están idealmente adecuados para proporcionar integridad estructural a las células y los tejidos, así como para contribuir a la organización celular. Los filamentos intermedios no tienen una polaridad intrínseca como los microfilamentos y los microtúbulos, de modo que no resulta sorprendente que no haya proteínas motoras conocidas que empleen los filamentos intermedios como vías. Aunque analizamos los microtúbulos y los filamentos intermedios en conjunto en este capítulo (y su localización en el citoplasma puede verse superficialmente de un modo bastante semejante), veremos que su dinámica y funciones son muy distintas. En la Figura 18-1 se presenta un resumen de las similitudes y diferencias entre los tres sistemas del citoesqueleto.

CONTENIDO

18.1 Estructura y organización de los microtúbulos	822	18.5 Cilios y flagelos: estructuras de superficie construidas sobre microtúbulos	844
18.2 Dinámica de los microtúbulos	827	18.6 Mitosis	849
18.3 Regulación de la estructura y dinámica de los microtúbulos	830	18.7 Filamentos intermedios	860
18.4 Cinesinas y dineínas: proteínas motoras de los microtúbulos	833	18.8 Coordinación y cooperación entre elementos del citoesqueleto	865

FIGURA 18-1 Panorama de las propiedades físicas y funciones de los tres sistemas del citoesqueleto en las células animales. (a) Propiedades biofísicas y bioquímicas (anaranjado) y biológicas (verde), que se muestran para cada tipo de filamento. Las fotomicrografías muestran ejemplos de cada tipo de filamento en un contexto celular particular, pero nótese que los microtúbulos también forman otras estructuras y los filamentos intermedios asimismo tapizan la superficie interna del núcleo. (b) Células cultivadas teñidas para actina (verde) y sitios de unión de la actina al sustrato (anaranjado). (c) Localización de los microtúbulos (verde) y del aparato de Golgi (amarillo). Nótese la localización central del aparato de Golgi, que se ubica allí por el transporte a lo largo del microtúbulo. (d) Localización de las citoqueratinas (rojo), de un tipo de filamento intermedio y de un componente de los desmosomas (amarillo) en células epiteliales. Las citoqueratinas de células individuales están unidas entre sí a través de los desmosomas (Parte [b] cortesía de K. Burridge. Parte [c] cortesía de W. Brown. Parte [d] cortesía de E. Fuchs.)



Este capítulo cubre cinco tópicos principales. Primero, analizamos la estructura y dinámica de los microtúbulos y sus proteínas motoras. En segundo lugar, examinamos el modo en que los microtúbulos y sus motores contribuyen al movimiento de los cilios y flagelos. En tercer lugar, analizamos el papel de los microtúbulos en el huso mitótico (una maquinaria molecular que segrega de modo preciso a los cromosomas duplicados). En cuarto lugar, exploramos los papeles de las diferentes clases de filamentos intermedios que proporcionan estructura a la envoltura nuclear, así como fuerza y organización a las células y los tejidos. Aunque se estudian los microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios en forma individual, los tres sistemas del citoesqueleto no actúan de forma independiente entre sí y consideraremos algunos ejemplos de esta interdependencia en la última sección de este capítulo.

18.1 Estructura y organización de los microtúbulos

En los días iniciales de la microscopía electrónica, los biólogos celulares notaron la existencia de largos túbulos en el citoplasma que llamaron **microtúbulos**. Se vieron microtúbulos morfológicamente similares constituyendo las fibras del huso mitótico, como componentes de los axones y como elementos estructurales en los cilios y flagelos (Fig. 18-2a, b). Un cuidadoso examen de los microtúbulos individuales de varias fuentes vistos en cortes transversales indicó que todos están consti-

tuidos por 13 unidades longitudinales repetidas (Fig. 18-2c), llamadas ahora **protofilamentos**, lo cual sugiere que los distintos microtúbulos tienen una estructura en común. Se encontró que los microtúbulos purificados del cerebro consistían en una proteína principal, la **tubulina** y proteínas asociadas, llamadas **proteínas asociadas a microtúbulos** (MAP). La tubulina purificada sola puede ensamblarse en un microtúbulo en condiciones favorables, dado que es el componente estructural de la pared de los microtúbulos. Las MAP, como veremos, ayudan a mediar el ensamblaje y la dinámica de los microtúbulos. En esta sección, consideramos la estructura general y organización de los microtúbulos antes de pasar a un análisis más detallado de su dinámica y regulación en las Secciones 18.2 y 18.3.

Las paredes de los microtúbulos son estructuras polarizadas, construidas a partir de dímeros de tubulina $\alpha\beta$

La tubulina aislada en forma pura y soluble consiste en dos subunidades muy relacionadas, llamadas tubulina α y tubulina β , cada una con un peso molecular de aproximadamente 55 000 daltons. Los análisis genómicos revelan que los genes que codifican tanto la tubulina α como la β están presentes en todos los eucariontes, con considerable expansión del número de genes en los organismos multicelulares. Por ejemplo, las levaduras en gemación tienen dos genes

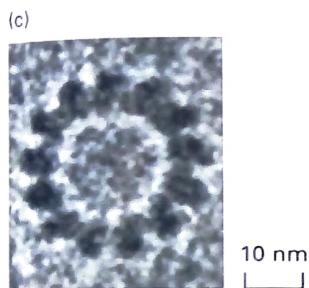
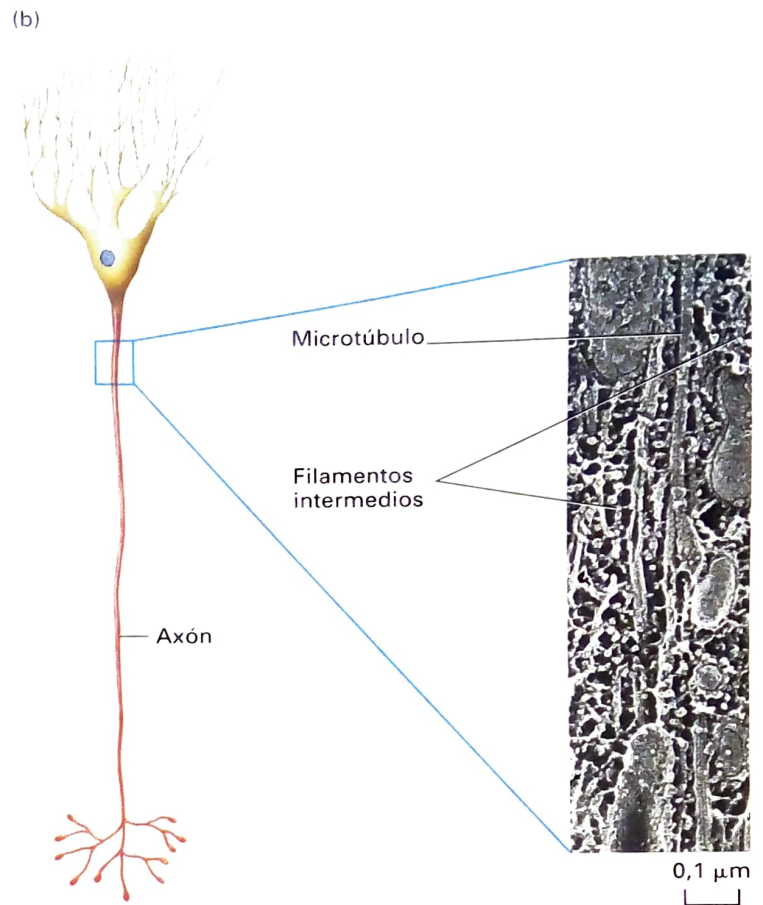


FIGURA 18-2 Los microtúbulos se encuentran en muchas ubicaciones diferentes y todos tienen estructuras similares. (a) Superficie del epitelio ciliado que tapiza un oviducto de conejo visto en microscopía electrónica de barrido. Los cilios que se agitan, los cuales tienen un centro formado por microtúbulos, impulsan los óvulos hacia el oviducto. (b) Los microtúbulos y filamentos intermedios se congelan rápidamente y se visualiza un axón en el



que se hizo una criofractura profunda en microscopía electrónica de transmisión. (c) Vista de gran aumento de un microtúbulo individual que muestra 13 unidades repetidas conocidas como protofilamentos (Parte [a] tomada de R. G. Kessels y R. H. Kardon, 1975, *Tissues and Organs*, W. H. Freeman y Compañía. Parte [b] tomada de N. Hirokawa, 1982, *J. Cell. Biol.* **94** 129; cortesía de N. Hirokawa. Parte [c] cortesía de C. Bouchet-Marquis, 2007, *Biology of the Cell* **99** 45.)

que especifican para tubulina α y uno para tubulina β , mientras que el nematodo del suelo *Caenorhabditis elegans* tiene nueve genes que codifican tubulina α y seis para tubulina β . Además de la tubulina α y la β , todos los eucariontes también tienen genes que especifican para una tercera tubulina, la tubulina γ , que está implicada en el ensamblaje de los microtúbulos como analizaremos en breve. Isoformas adicionales de tubulina se han descubierto también presentes solamente en organismos que poseen estructuras celulares llamadas centriolos y cuerpos basales, lo cual sugiere que estas isoformas de la tubulina son importantes para estas estructuras. Como veremos en este capítulo, los centriolos y los cuerpos basales son estructuras especializadas que algunos organismos emplean para nuclear y organizar el ensamblaje de los microtúbulos.

Cada una de las subunidades α y β del dímero de tubulina puede unir una molécula de GTP (Fig. 18-3a). El GTP en la subunidad de tubulina α nunca está hidrolizado y está atrapado en la interfase entre las subunidades α y β . Por el contrario, el sitio de unión a GTP presente en la subunidad β se encuentra en la superficie del dímero. El GTP unido por la subunidad β puede ser hidrolizado y el

GDP resultante puede intercambiarse por GTP libre. En condiciones adecuadas, los dímeros solubles de tubulina pueden ensamblarse en microtúbulos (Fig. 18-3b). Como vimos en el Capítulo 17 para la polimerización de la actina, la ATP-G-actina se añade preferencialmente a un extremo del filamento, designado como el extremo (+) porque es el extremo favorecido para el ensamblaje. Una vez que se ha incorporado al filamento, el ATP unido se hidroliza a ADP y P_i . De modo similar, los dímeros de tubulina en los cuales la subunidad β ha unido el GTP se añaden preferencialmente a un extremo del microtúbulo, también designado como extremo (+). Como veremos, el GTP se hidroliza una vez que la tubulina se ha incorporado al microtúbulo, pero al contrario que lo que ocurre con la hidrólisis de ATP en un filamento de actina, esta hidrólisis de GTP tiene efectos pronunciados en la conducta del extremo (+) del microtúbulo.

Los microtúbulos están compuestos por 13 protofilamentos asociados por los lados, que forman un túbulo cuyo diámetro externo es de aproximadamente 25 nm (véase Fig. 18-3b). Cada uno de los 13 protofilamentos es una hebra de dímeros de tubulina- $\alpha\beta$ longitudinalmente dispuesta de modo tal que las subunidades alternan

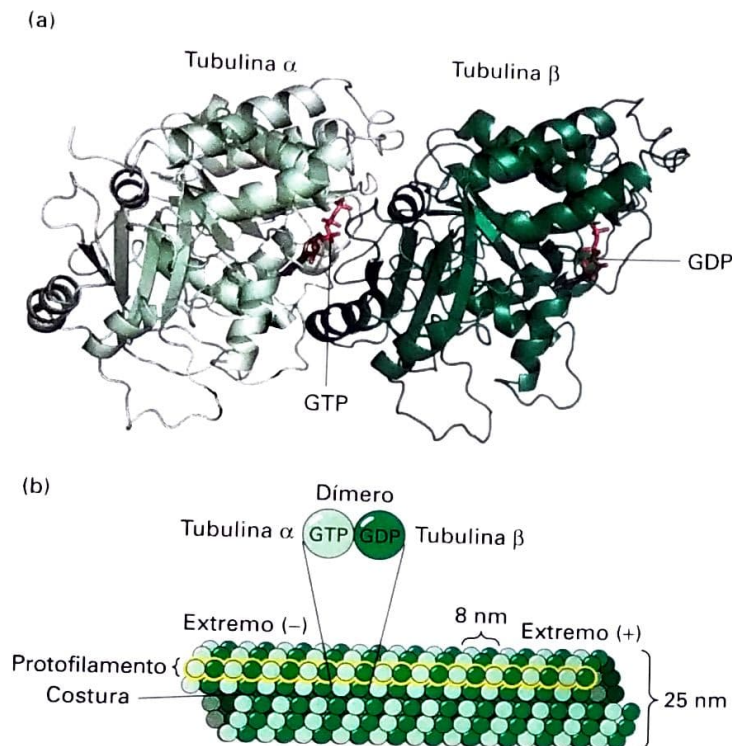


FIGURA 18-3 Estructura de los dímeros de tubulina y su organización en microtúbulos. (a) Diagrama de cinta del dímero de tubulina. El GTP unido al monómero de tubulina α no es intercambiable, mientras que el GDP unido al monómero de tubulina β puede intercambiarse por GTP libre. (b) Organización de las subunidades de tubulina en un microtúbulo. Los dímeros están alineados extremo a extremo en protofilamentos, que se empaquetan uno junto a otro para formar la pared del microtúbulo. Los protofilamentos están ligeramente apilados de modo tal que la tubulina α de un protofilamento se encuentra en contacto con la tubulina α de los protofilamentos vecinos, excepto en la costura, donde una subunidad α se contacta con una subunidad β . El microtúbulo muestra una polaridad estructural en aquellas subunidades que se añaden preferentemente en el extremo en el que están expuestos los monómeros de tubulina. Este extremo del microtúbulo se conoce como extremo (+). (Parte [a] modificada de E. Nogales y cols., 1998, *Nature* 391 199, cortesía de E. Nogales.)

tiene una polaridad general. El extremo con las subunidades β expuestas es el extremo (+), mientras que el extremo con las subunidades α expuestas es el (-). En los microtúbulos, los heterodímeros de protofilamentos adyacentes están ligeramente escalonados, formando filas inclinadas de monómeros de tubulina α y β en la pared de los microtúbulos. Si se sigue una hilera de subunidades β , que por ejemplo forman una espiral alrededor de un microtúbulo en una vuelta completa, esta terminará exactamente tres subunidades por encima del protofilamento, lindando con una subunidad α . De este modo, todos los microtúbulos tienen una única *costura* longitudinal, en la que una subunidad α de un protofilamento se pone en contacto con la subunidad β de otro adyacente.

La mayoría de los microtúbulos de una célula consisten en un tubo simple, un microtúbulo *singlete*, construido con 13 protofilamentos. En raros casos los microtúbulos *singlete* contienen más de unos pocos protofilamentos. Por ejemplo, ciertos microtúbulos de las neuronas de los gusanos nematodos contienen 11 o 15 protofilamentos. Además de la estructura simple de *singlete*, los microtúbulos en *doblete* o *triplete* se encuentran en estructuras especializadas como los cilios o los flagelos (microtúbulos en *doblete*) y los centriolos y cuerpos basales (microtúbulos en *triplete*), estructuras que exploraremos más tarde en este capítulo. Cada *doblete* o *triplete* contiene un microtúbulo completo con 13 protofilamentos (llamado *túbulo A*) y uno o dos *túbulos* adicionales (B y C), cada uno formado por 10 protofilamentos (Fig. 18-4).

Los microtúbulos se ensamblan a partir de MTOC para generar organizaciones diversas

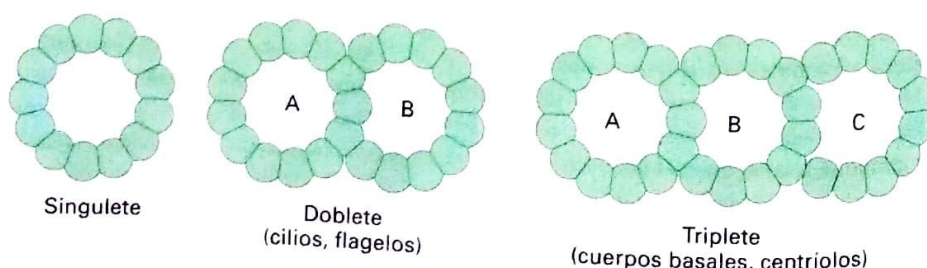
Con la identificación de la tubulina como el principal componente estructural de los microtúbulos, los anticuerpos contra tubulina se generaron y usaron en la microscopía de inmunofluorescencia para localizar los microtúbulos en las células (Fig. 18-5a, b). Este enfoque, acoplado con la descripción de los microtúbulos vistos en microscopía electrónica, mostró que estos se ensamblan a partir de sitios específicos para generar muchos tipos diferentes de organización.

La fase de nucleación del ensamblaje de microtúbulos es una reacción tan desfavorable que la nucleación espontánea no desempeña un papel significativo en el ensamblaje de los microtúbulos *in vivo*. En lugar de ello, todos los microtúbulos se nuclean a partir de estructuras conocidas como **centros de organización de los microtúbulos** o **MTOC**. En la mayoría de los casos, el extremo (-) del microtúbulo permanece anclado en el MTOC, mientras que el extremo (+) se extiende alejándose de él.

El **centrosoma** es el principal MTOC de las células animales. En las células que no están en mitosis, conocidas también como células

en un protofilamento y cada tipo de subunidad se repite cada 8 nm. Dado que todos los dímeros de tubulina $\alpha\beta$ en un protofilamento se encuentran orientados del mismo modo, cada protofilamento tiene una subunidad α en un extremo y una subunidad β en el otro (de manera que los protofilamentos tienen una **polaridad intrínseca**). En un microtúbulo, todos los protofilamentos asociados lateralmente tienen la misma polaridad, de modo que el microtúbulo también

FIGURA 18-4 Microtúbulos en *singlete*, *doblete* y *triplete*. En corte transversal un microtúbulo típico, un *singlete*, es un tubo simple construido a partir de 13 protofilamentos. En un microtúbulo en *doblete*, un conjunto adicional de 10 protofilamentos forman un segundo *túbulo* (B) al fusionarse a la pared de un *singlete* (A). La unión de otros 10 protofilamentos al haz (B) de un microtúbulo en *doblete* crea un *túbulo* (C) y una estructura de *triplete*.



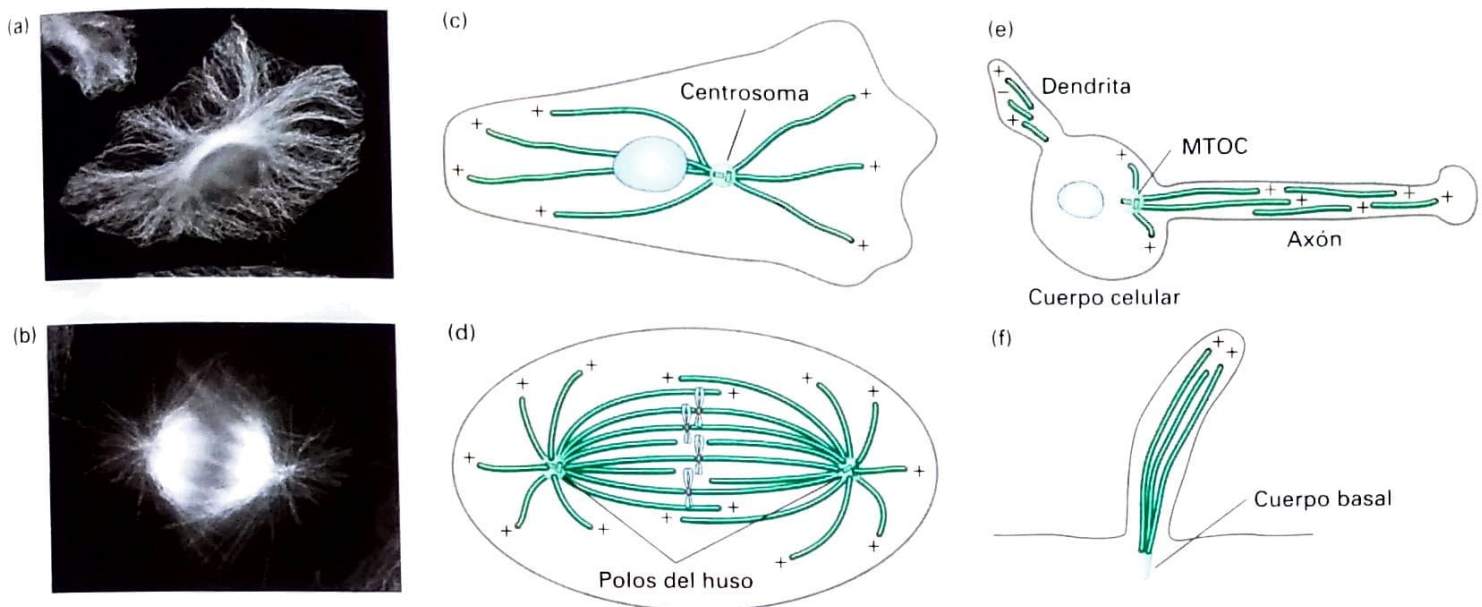


FIGURA 18-5 Los microtúbulos se ensamblan a partir de centros organizadores de microtúbulos (MTOC). Distribución de los microtúbulos en las células en cultivo según se ve por microscopía de inmunofluorescencia, empleando anticuerpos contra la tubulina en una célula en interfase (a) y una célula en mitosis (b). (c-f) Diagramas de distribución de los microtúbulos en las células y estructuras, todos los cuales están ensamblados a partir de diferentes MTOC. En una célula en interfase (c), el MTOC se llama centrosoma (el núcleo

está indicado con un ovalo azul), en una célula en mitosis (d), los dos MTOC se llaman polos del huso (los cromosomas se muestran en azul); en una neurona (e), los microtúbulos de ambos axones y las dendritas se ensamblan a partir de un MTOC presente en el cuerpo celular y luego se liberan de él; los microtúbulos que constituyen el tallo de un cilio o flagelo (f) se ensamblan a partir de un MTOC conocido como un cuerpo basal. La polaridad de los microtúbulos está indicada por (+) y (-) (Parte [a] cortesía de A. Bretscher Parte [b] cortesía de T. Wittmann.)

en *interfase*, el centrosoma generalmente está localizado cerca del núcleo, produciendo una configuración de microtúbulos con sus extremos (+) que radian hacia la periferia de la célula (Fig. 18-5c). Esta disposición radial proporciona vías para la organización de las proteínas motoras basadas en los microtúbulos, así como para organizar y transportar compartimientos limitados por membrana, como los que comprenden las vías secretora y endocítica. Durante las mitosis, las células reorganizan por completo sus microtúbulos para formar un huso bipolar, ensamblado a partir de dos centrosomas también conocidos como *polos del huso*, a fin de segregar con precisión copias de los cromosomas duplicados (Fig. 18-5d). En otro ejemplo las neuronas tienen prolongaciones largas, llamadas axones, en las cuales se transportan los orgánulos en ambas direcciones a lo largo de los microtúbulos (Fig. 18-5e). Los microtúbulos de los axones, que pueden alcanzar hasta 1 metro de longitud, no son continuos y han sido liberados desde el centrosoma; sin embargo, todos tienen la misma polaridad. En las mismas células, los microtúbulos de las dendritas tienen polaridad mixta, aunque la importancia funcional de esto no está clara. En los cilios y los flagelos (Fig. 18-5f), los microtúbulos se ensamblan a partir de un MTOC llamado *cuerpo basal*. Como mencionaremos más adelante, los vegetales no tienen centrosomas y cuerpos basales, sino que usan otros mecanismos para nuclear el ensamblaje de los microtúbulos.

La microscopía electrónica muestra que los centrosomas de las células animales consisten en un par de **centríolos** dispuestos de forma ortogonal, cilíndricos, rodeados por un material en apariencia amorfo llamado **material pericentriolar** (Fig. 18-6a, puntas de flecha). Los centriolos, que tienen aproximadamente 0,5 μm de

longitud y 0,2 μm de diámetro, son estructuras muy organizadas y estables que consisten en nueve conjuntos de tripletes de microtúbulos, los cuales están íntimamente relacionados en estructura con los cuerpos basales que se encuentran en la base de los cilios y los flagelos. No son los centriolos en sí los que nuclean la configuración microtubular citoplasmática, sino los factores presentes en el material pericentriolar. Un componente crítico es el **complejo anular de tubulina- γ** (*TuRC- γ*) (Figs. 18-6b y 18-7). El γ -TuRC se localiza en el material pericentriolar y consiste en muchas copias de tubulina- γ asociadas con otras varias proteínas. Se cree que el γ -TuRC actúa como un molde de lavadora dividida a fin de unir tubulina- $\alpha\beta$ para la formación de un nuevo microtúbulo, con el extremo (-) asociado con el γ -TuRC y el extremo (+) libre para ensamblarse. Además de nuclear el ensamblaje de los microtúbulos, los centrosomas se anclan y regulan la dinámica de los extremos (-) de los microtúbulos, que se localizan allí.

Los cuerpos basales tienen una estructura similar a la del centriolo y son los MTOC que se encuentran en la base de los cilios y los flagelos. Los túbulos A y B de sus microtúbulos triplete proporcionan un molde para el ensamblaje de los microtúbulos, los cuales constituyen la estructura central de los cilios y flagelos.

Trabajos recientes han revelado un mecanismo adicional para la nucleación de los microtúbulos en las células animales, que también involucra al γ -TuRC. Un complejo proteico denominado **complejo augmina**, formado por 8 polipéptidos, puede unirse al lado de los microtúbulos existentes, reclutar luego γ -TuRC y nuclear el ensamblaje de los nuevos. Como analizaremos en una sección posterior, el complejo de augmina contribuye al ensamblaje de microtúbulos en el huso mitótico.

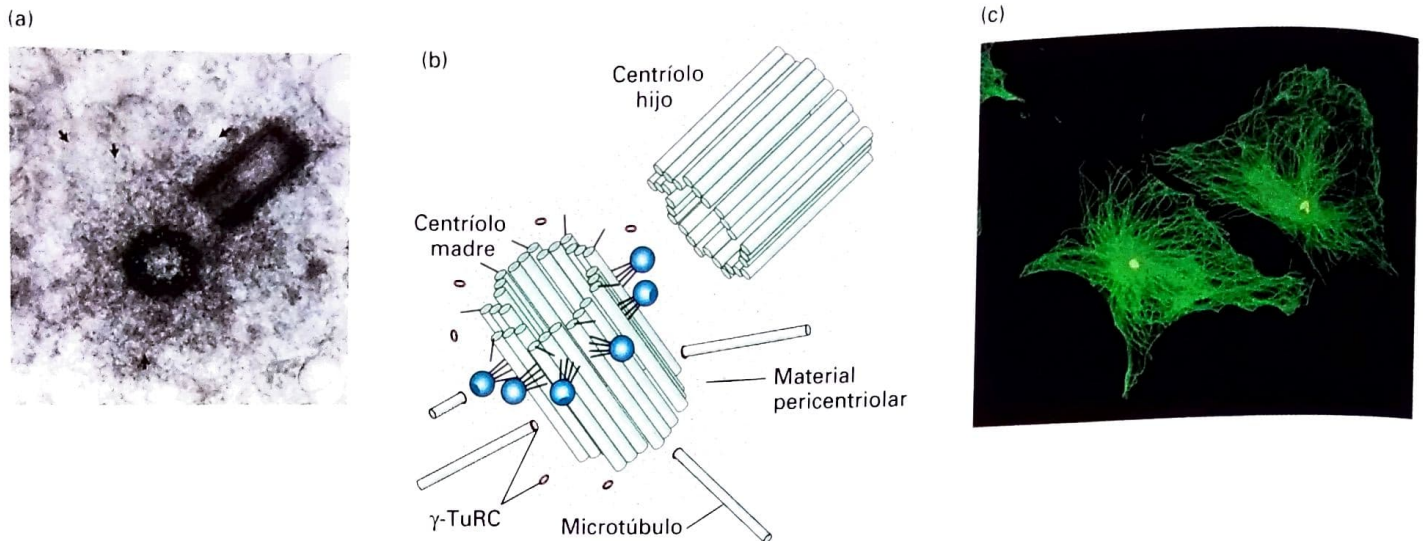


FIGURA 18-6 Estructura de los centrosomas. (a) Corte fino de un centrosoma de una célula animal que muestra los dos centriolos perpendiculares entre sí, rodeados por material pericentriolar (flechas). (b) Diagrama de un centrosoma que muestra los centriolos madre e hijo, cada uno de los cuales consiste en nueve tripletes de microtúbulos unidos, embebidos en material pericentriolar que contiene estructuras nucleantes TuRC- γ . El centriolo madre es diferente

del hijo, dado que tiene apéndices distales (esferas azules). (c) Microscopia de inmunofluorescencia que muestra la configuración de microtúbulos (verde) en una célula animal en cultivo y la localización de MTOC, empleando un anticuerpo contra una proteína del centrosoma (amarillo). (Parte [a] y [b] tomadas de G. Sluder, 2005, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6:743. Parte [c] cortesía de R. Kuriyama.)

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 18.1

Estructura y organización de los microtúbulos

- La tubulina es el principal componente estructural de los microtúbulos (véase Fig. 18-3) con la cual se vinculan las proteínas asociadas a los microtúbulos (MAP).
- La tubulina libre existe como un dímero $\alpha\beta$, en la que la subunidad α se une a un GTP atrapado y no hidrolizable, y la β se une a un GTP intercambiable e hidrolizable.
- La tubulina $\alpha\beta$ se ensambla en microtúbulos que tienen 13 protofilamentos asociados lateralmente, con una subunidad α expuesta en el extremo (-) y una subunidad β en el extremo (+) de cada protofilamento.
- En los cilios y flagelos, así como en los centriolos y cuerpos basales, existen microtúbulos en doblete o triplete, en los cuales los microtúbulos adicionales tienen 10 protofilamentos (véase Fig. 18-4).
- Todos los microtúbulos se nuclean a partir de centros organizadores de microtúbulos (MTOC) y muchos permanecen anclados en él por su extremo (-). Así, el extremo alejado del MTOC siempre es un extremo (+).
- El centrosoma es el MTOC que nuclea la disposición radial de microtúbulos en células animales no mitóticas; dos centrosomas, o polos del huso, son los MTOC que nuclean los microtúbulos del huso mitótico; y los cuerpos basales son los MTOC que ensamblan los microtúbulos de los cilios y los flagelos (véase Fig. 18-5).
- Los centrosomas consisten en dos centriolos y material pericentriolar que contiene el complejo TuRC- γ (véanse Figs. 18-6 y 18-7).

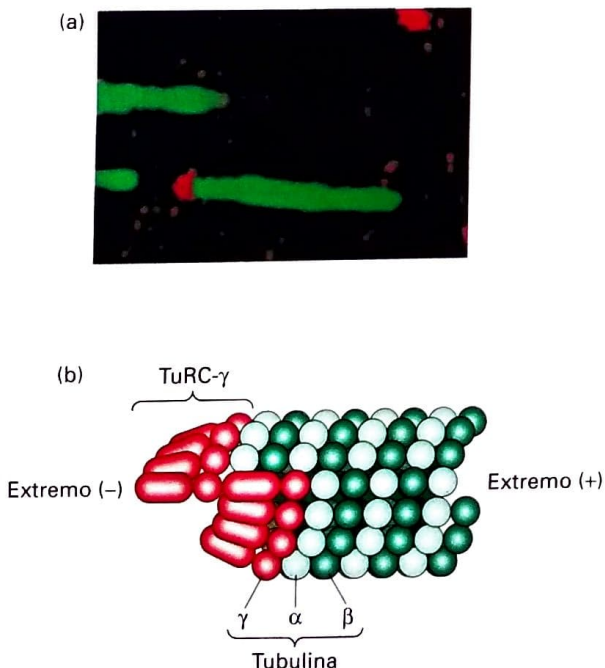


FIGURA 18-7 Complejo del anillo de tubulina γ (TuRC- γ) que nuclea el ensamblaje de los microtúbulos. (a) Una fotomicrografía de inmunofluorescencia de microtúbulos ensamblados in vitro está marcada en verde y un componente del TuRC- γ está marcado en rojo, mostrando que se encuentra específicamente localizado en un extremo del microtúbulo. (b) Modelo del modo en que el TuRC- γ podría nuclear el ensamblaje de un microtúbulo al formar un molde correspondiente al extremo (-) de un microtúbulo. (Parte [a] modificada de T. J. Keating y G. G. Borisy, 2000, *Nature Cell Biol.* 2:352, cortesía de T. J. Keating y G. G. Borisy.)

18.2 Dinámica de los microtúbulos

Los microtúbulos son estructuras dinámicas debido a que se ensamblan y desensamblan en sus extremos. El grado de dinámica puede variar enormemente, con un promedio de tiempo de vida del microtúbulo de menos de 1 minuto para las células en mitosis y aproximadamente 5-10 minutos para los microtúbulos que constituyen el arreglo radial que vemos en las células animales que no están en mitosis. El espectro de vida del microtúbulo es más largo en los axones, y mucho más largo en los cilios y los flagelos. Para averiguar de qué manera ocurren estas diferencias, analizamos las propiedades dinámicas de los microtúbulos y el modo en que esta conducta contribuye a su organización celular.

Los microtúbulos individuales exhiben inestabilidad dinámica

Experimentos iniciales revelaron que la mayoría de los microtúbulos de las células animales se desensamblarán cuando estas se enfríen a 4 °C y se repolimerizarán cuando las células se recalienten nuevamente a 37 °C. Los investigadores notaron que esta propiedad intrínseca de los microtúbulos podría ser explotada para purificar los componentes microtubulares. Dado que el tejido cerebral es rico en microtúbulos, se prepararon extractos solubles de cerebros de cerdo a 4 °C; estos extractos clarificados luego se calentaron a 37 °C para inducir el ensamblaje de los microtúbulos. Los microtúbulos ensamblados se reunieron en una pastilla por centrifugación, se separaron del sobrenadante y luego se desensamblaron añadiendo una solución amortiguadora a 4 °C. Después de otro ciclo de ensamblaje por recalentamiento, reunión y desensamblaje por enfriamiento, los investigadores recuperaron *proteína microtubular*, un término colectivo para la tubulina- $\alpha\beta$ y las proteínas asociadas a los microtúbulos (MAP). Posteriormente, pudieron fraccionar la proteína microtubular a tubulina- $\alpha\beta$ pura y las MAP para estudiar sus conductas por separado. Los investigadores descubrieron que la polimerización de la tubulina- $\alpha\beta$ dimérica en microtúbulos está catalizada en gran medida por la presencia de MAP.

Aunque se ha dedicado un enorme esfuerzo de investigación a caracterizar las propiedades generales de la polimerización de una proteína microtubular en solución, su relevancia general fue superada por estudios posteriores que examinaron las propiedades de los microtúbulos individuales. Sin embargo, algunas lecciones aprendidas a partir de estos estudios iniciales *in vitro* son importantes para la biología de los microtúbulos. En primer lugar, para que se produzca el ensamblaje la concentración de tubulina- $\alpha\beta$ debe estar por encima de una *concentración crítica* (C_c), exactamente como vimos para la polimerización de la actina (véase Fig. 17-8). En segundo término, a concentraciones de tubulina- $\alpha\beta$ más altas que la C_c para la polimerización, los dímeros se añaden con más rapidez a un extremo del microtúbulo que al otro (Fig. 18-8). Como ocurre con el ensamblaje de la F-actina, el extremo preferido para el ensamblaje se designa como extremo (+), que es el extremo con la tubulina- β expuesta. El extremo (-) tiene tubulina- α expuesta (véase Fig. 18-3b).

Cuando se estudian las propiedades generales del ensamblaje de los microtúbulos, uno supone que todos los microtúbulos se comportan de modo similar. Sin embargo, cuando los investigadores examinaron la conducta de los microtúbulos individuales en una población, encontraron que esto no es así. La conducta de los microtúbulos individuales se examinó en un experimento muy sencillo. Se

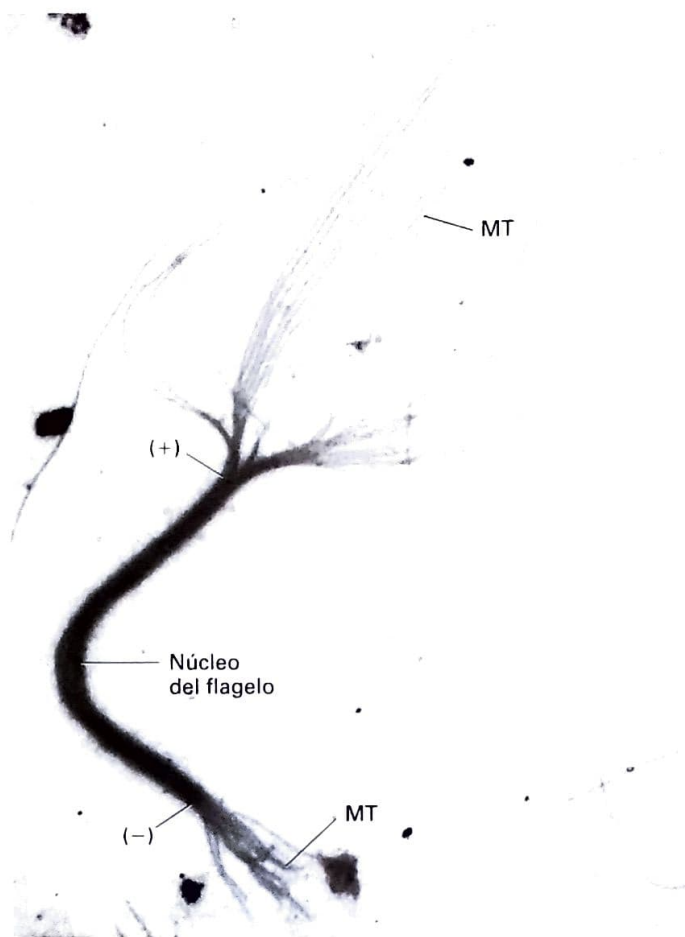


FIGURA EXPERIMENTAL 18-8 Los microtúbulos crecen preferentemente en el extremo (+).

Fragmento de un haz de microtúbulos de un flagelo fue usado como un núcleo para la adición *in vitro* de tubulina $\alpha\beta$. El fragmento del flagelo que resulta nucleador es el haz grueso que se ve en esta fotomicrografía electrónica y los microtúbulos recién formados (MT) radian a partir de sus extremos. La mayor longitud de los microtúbulos en un extremo, el extremo (+), indica que las subunidades de tubulina se añaden preferentemente a este. (Cortesía de G. Borisy)

ensamblaron *in vitro* y luego se estiraron para romperlos en trozos más pequeños, cuyas longitudes individuales pudieran ser analizadas por microscopía. En estas condiciones, se esperaría que todos los microtúbulos cortos crecieran o se encogieran, dependiendo de la concentración de tubulina libre. No obstante, los investigadores encontraron que parte de los microtúbulos aumentaban de longitud, mientras que otros se acortaban muy rápidamente —indicando así la existencia de dos poblaciones de microtúbulos distintas—. Estudios adicionales mostraron que los microtúbulos individuales podrían crecer y luego experimentar rápidamente una *catástrofe* hacia una fase de encogimiento, durante la cual el microtúbulo sufre una despolimerización muy rápida. Más aún, en ocasiones un extremo de un microtúbulo en despolimerización puede atravesar un *rescate* y comenzar a crecer nuevamente (Fig. 18-9). Aunque este fenómeno se vio en primer término *in vitro*, el análisis de tubulina marcada con fluorescencia microinyectada a células vivas mostró que los microtúbulos de las células también pasan por períodos de crecimiento y en-

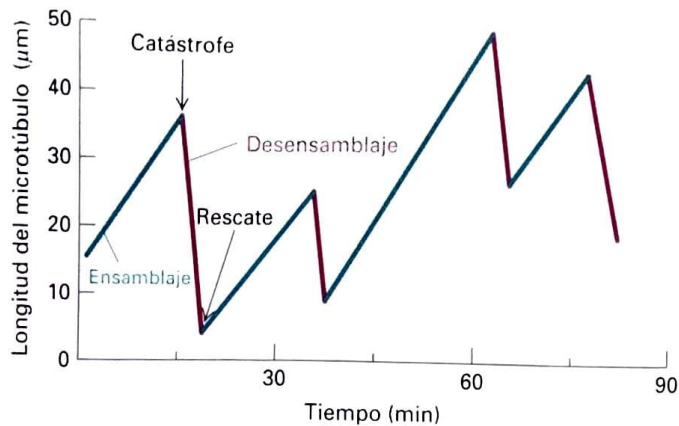


FIGURA 18-9 Inestabilidad dinámica de los microtúbulos in vitro. Los microtúbulos individuales pueden verse al microscopio óptico y sus longitudes pueden ser representadas en diferentes momentos durante el ensamblaje y el desensamblaje. Estos últimos proceden cada uno a velocidades uniformes, pero hay una gran diferencia entre la velocidad de ensamblaje y la de desensamblaje, como se ve por las diferentes pendientes de las líneas. El acortamiento de un microtúbulo es mucho más rápido ($7 \mu\text{m}/\text{min}$) que su crecimiento ($1 \mu\text{m}/\text{min}$). Note las transiciones abruptas a la etapa de encogimiento (catástrofe) y la etapa de elongación (rescate). (Adaptado de P. M. Bayley, K. K. Sharma y S. R. Martin, 1994, en *Microtubules*, Wiley-Liss, p. 118.)

cogimiento (Fig. 18-10). Este proceso de alternar entre el crecimiento y el encogimiento se conoce como *inestabilidad dinámica*. Así, la vida dinámica de un extremo de un microtúbulo está determinada por la velocidad de crecimiento, la frecuencia de catástrofes, la velocidad de despolimerización y la frecuencia de rescates. Como veremos luego, estas características de la dinámica de los microtúbulos se controlan in vivo. Dado que los extremos (–) de los microtúbulos de las células animales en general están anclados en un MTOC, esta naturaleza dinámica es más relevante para el extremo (+) del microtúbulo.

¿Cuál es la base molecular de la inestabilidad dinámica? Si usted presta cuidadosa atención a la microscopía electrónica de los extremos de microtúbulos en crecimiento y encogimiento, puede ver que son muy distintos. Un microtúbulo en crecimiento tiene un extremo

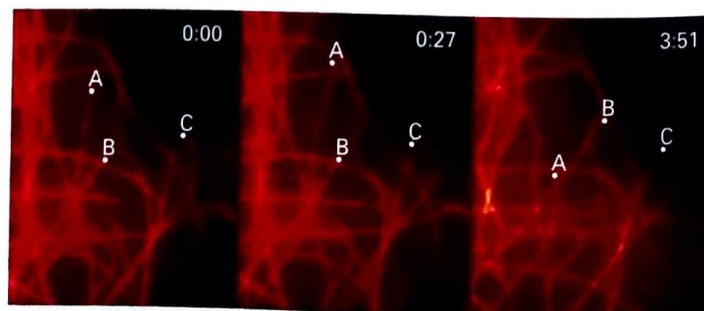
relativamente romo, mientras que un extremo en despolimerización tiene protofilamentos que se desprenden como cuernos de carnero (Fig. 18-11). De hecho, el extremo creciente del microtúbulo no es simplemente un extremo romo, sino una estructura corta y aplanada con forma de hoja, hecha por la adición de dímeros de tubulina a los extremos de los protofilamentos, que luego se enrolla a lo largo de la costura para formar el microtúbulo cilíndrico.

Estudios recientes proporcionaron una explicación estructural simple para las dos clases de extremos de los microtúbulos. Como notamos previamente, la subunidad β del dímero de tubulina- $\alpha\beta$ está expuesta al extremo (+) de cada protofilamento. Empleando un análogo de GDP, los investigadores han encontrado que los protofilamentos individuales diseñados artificialmente (donde no hay interacciones laterales) constituidos por dímeros repetidos de tubulina- $\alpha\beta$ que contienen GDP-tubulina β son curvos, como un cuerno de carnero. Sin embargo, los protofilamentos individuales construidos artificialmente, hechos por dímeros de tubulina- $\alpha\beta$ que contienen GTP tubulina β son rectos. Así, los microtúbulos en crecimiento con extremos romos terminan en GTP-tubulina- β , mientras que los que están encogiéndose con extremos enrollados terminan en GDP-tubulina- β . Por lo tanto, si las moléculas de GTP en las tubulinas- β terminales se hidrolizan sobre un microtúbulo que ha detenido su crecimiento, un extremo de un microtúbulo inicialmente romo se curvará y se asegurará el desarrollo de una fase de catástrofe. Estas relaciones se resumen en la Figura 18-11.

Estos resultados tienen una implicación adicional y, para comprenderla, debemos considerar el microtúbulo en crecimiento con mayor detalle. La adición de un dímero al extremo (+) de un protofilamento en un microtúbulo en crecimiento implica una interacción entre la subunidad β terminal preexistente y la nueva subunidad α . Esta interacción aumenta la hidrólisis de GTP a GDP en la subunidad β , inicialmente terminal. Sin embargo, la tubulina- β del dímero recién añadido contiene GTP. Así, cada protofilamento en un microtúbulo en crecimiento tiene mayormente tubulina-GDP- β a lo largo de su longitud y está encasquetado por uno o dos dímeros terminales que contienen tubulina- β -GTP. Como mencionamos previamente, un protofilamento *aislado* que contenga tubulina- β -GDP se curva a lo largo de su longitud, de modo que cuando está presente en un microtúbulo, ¿por qué no se rompe y desprende? Las interacciones laterales protofilamento-protofilamento en el casquete de tubulina

VIDEO: Ensamblaje de los microtúbulos en las células en cultivo

FIGURA EXPERIMENTAL 18-10 La microscopía de fluorescencia revela el crecimiento y encogimiento de los microtúbulos individuales in vivo. La tubulina marcada con fluorescencia fue microinyectada a fibroblastos humanos en cultivo. Las células fueron enfriadas para que los microtúbulos preexistentes se despolimerizarán en dímeros de tubulina y luego se incubaron a 37°C para permitir la repolimerización, incorporando de esta manera la tubulina fluorescente a todos los microtúbulos de las células. Al microscopio de fluorescencia, pasados 0 y 27 segundos y 3 minutos con 51 segundos (paneles de izquierda a derecha), se observó una región de la periferia celular. En este período, varios microtúbulos se alargaron y acortaron. Los puntos marcados como A, B y C marcan la posición de los extremos de estos. (Modificado de P. J. Sammak y G. Borisy, 1988, *Nature* 332:724.)



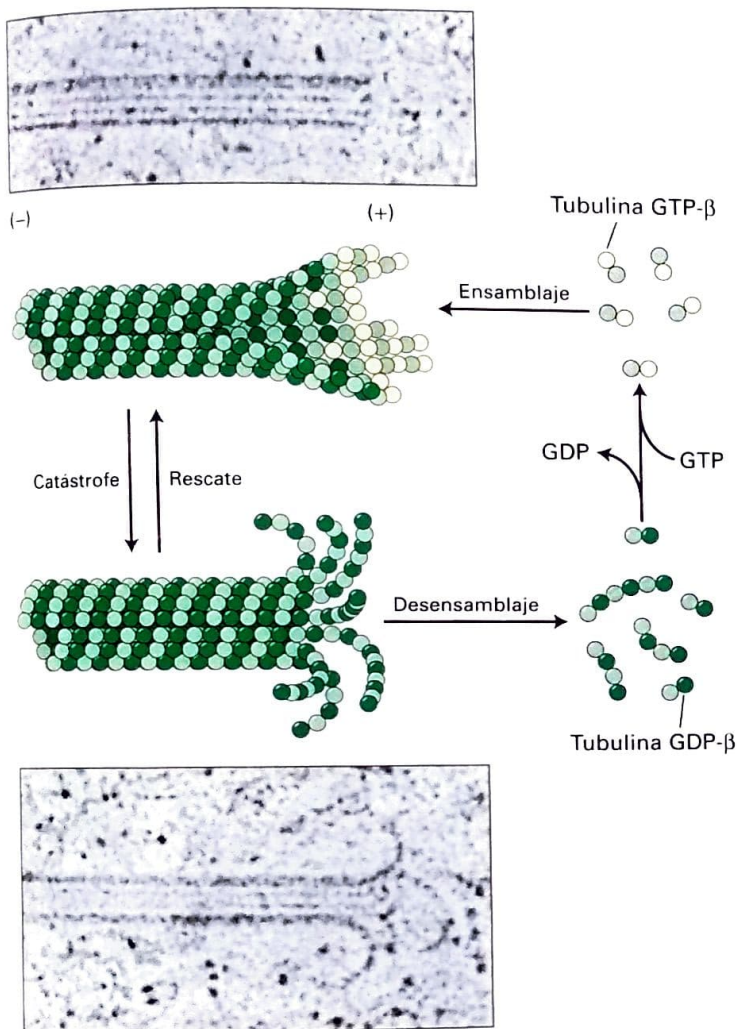


FIGURA 18-11 La inestabilidad dinámica depende de la presencia o ausencia de un casquete de tubulina β -GTP. Imágenes tomadas al microscopio electrónico de muestras congeladas de un microtúbulo en crecimiento (arriba) y de un microtúbulo que está encogiéndose (abajo). Nótese que el extremo del microtúbulo creciente tiene un extremo romo, mientras que el que está encogiéndose presenta curvaturas, como si fueran las astas de un carnero. El diagrama muestra que un microtúbulo con GTP-tubulina- β en el extremo de cada protofilamento se ve fuertemente favorecido para crecer. Sin embargo, un microtúbulo que tenga GDP-tubulina- β en los extremos de los protofilamentos forma una estructura curva que se desensamblará rápidamente. El cambio de las fases de crecimiento a encogimiento (llamado de rescate y catástrofe) puede ocurrir y la velocidad de este cambio está regulada por proteínas asociadas. (Imágenes tomadas de E-M Mandelkow y cols., 1991, *J. Cell Biol.* **114**:977. Diagrama modificado de A. Desai y T. J. Mitchison, 1997, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**:83-117.)

β -GTP son lo suficientemente fuertes como para no permitir que el microtúbulo se desprenda en su extremo —y así, los protofilamentos que se encuentran por detrás del casquete de tubulina- β -GTP están limitados para desprenderse (véase Fig. 18-11). La energía liberada por la hidrólisis de GTP de las subunidades que se encuentran por detrás del casquete es almacenada dentro de la red como una costura estructural, la cual espera ser liberada cuando se pierda el casquete de tubulina- β -GTP. Si el casquete de tubulina- β -GTP se pierde, la energía almacenada puede hacer su trabajo si cierta estructura, como un

cromosoma, se une al extremo del microtúbulo que está desensamblándose. Como veremos, la energía almacenada contribuye al movimiento de los cromosomas durante la etapa de anafase de la mitosis.

¿De qué manera un microtúbulo en desensamblaje repentinamente puede ser rescatado para continuar su crecimiento? Una posible respuesta a este problema desconcertante ha sido sugerida recientemente. Empleando un anticuerpo que solo reconoce la tubulina- β -GTP y no la tubulina- β -GDP, los investigadores han encontrado que pueden presentarse “islas” de tubulina- β -GTP a lo largo de la longitud de un microtúbulo ensamblado. Parece probable que cuando un microtúbulo en desensamblaje se encuentre con una de estas islas de tubulina- β -GTP, el desensamblaje se pause y pueda provocar un rescate.

El ensamblaje localizado y la “búsqueda y captura” ayudan a organizar los microtúbulos

Hemos presentado dos conceptos centrales con relación a la organización de los microtúbulos y la dinámica de los extremos (+): los microtúbulos se ensamblan a partir de sitios localizados conocidos como MTOC y los microtúbulos individuales pueden sufrir inestabilidad dinámica. Estos dos procesos juntos contribuyen a la distribución de los microtúbulos en las células.

En una célula en interfase en cultivo, los microtúbulos se encuentran nucleándose constantemente a partir del centrosoma y diseminándose, “buscando” al azar el espacio citoplasmático. La frecuencia de catástrofes y rescates, junto con las velocidades de crecimiento y encogimiento, determinan la longitud de cada microtúbulo: si este está sujeto a una alta frecuencia de catástrofes y nada de rescate, se encogerá hasta el centrosoma y desaparecerá, mientras que si tiene pocas catástrofes y es rápidamente rescatado continuará creciendo. Si la búsqueda de microtúbulos encuentra una diana adecuada en una estructura celular u orgánulo, el extremo del microtúbulo puede unirse a la estructura. El orgánulo o estructura celular “capturado” por el microtúbulo estabiliza su extremo (+) y lo protege de las catástrofes, mientras que los microtúbulos no unidos tienen una frecuencia mayor de desensamblaje. De este modo, la dinámica del extremo de los microtúbulos es un determinante muy importante del ciclo de vida y función de los microtúbulos. La “búsqueda y captura” es parte de un mecanismo que determina la organización general de los microtúbulos en una célula. Más aún, al cambiar la velocidad de nucleación o la dinámica local de los microtúbulos y sitios de captura, una célula puede cambiar rápidamente su distribución general de microtúbulos. Veremos luego que esto es lo que ocurre cuando la célula entra en mitosis.

Los fármacos que afectan la polimerización de la tubulina son útiles experimentalmente y para el tratamiento de enfermedades



La naturaleza conservada de las tubulinas y su compromiso esencial en los procesos críticos tales como la mitosis, los hacen su diana primaria para fármacos naturales y sintéticos que afectan la polimerización o la despolimerización. Históricamente, el primer fármaco de este tipo conocido fue la colchicina, presente en extractos del azafrán silvestre, que se une a los dímeros de tubulina impidiendo

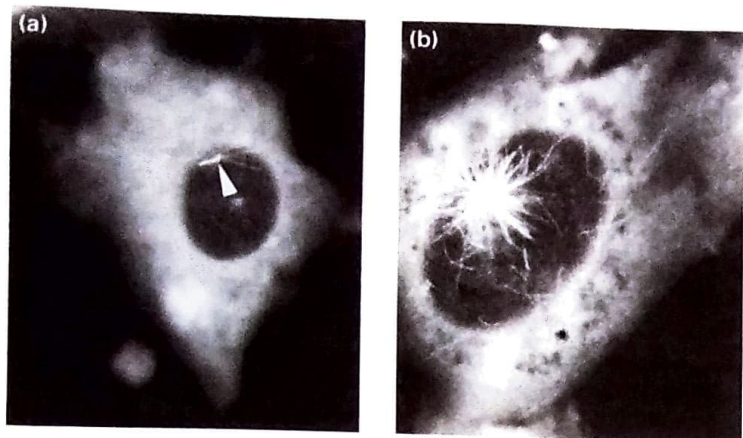


FIGURA EXPERIMENTAL 18-12 Los microtúbulos crecen a partir de MTOC. Para investigar a partir de qué lugar se ensamblan los microtúbulos *in vivo*, un fibroblasto cultivado fue tratado con colchicina hasta que casi se desensamblaron todos los microtúbulos citoplasmáticos. Luego, la célula fue teñida con anticuerpos contra tubulina y visualizada al microscopio de inmunofluorescencia. (a) La colchicina luego se lavó para permitir el reensamblaje de los microtúbulos. El panel (b) muestra las primeras etapas del reensamblaje que revelan que los microtúbulos crecen a partir del MTOC en la región central por encima del núcleo (áreas oscuras). Nótese en el panel (a) el cilio primario (cabeza de flecha; analizado en la Sección 18.5) asociado con el centrosoma; no es despolarizado por el tratamiento con colchicina en estas condiciones. Nótese también la fluorescencia desde el citoplasma, que proviene de dímeros de tubulina $\alpha\beta$ no despolimerizados. (Tomado de M. Osborn y K. Weber, 1976, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**:867-871.)

que se polimericen para formar túbulos. Dado que la mayoría de los microtúbulos se encuentran en estado de equilibrio entre dímeros y polímeros, la adición de colchicina secuestra todos los dímeros libres en el citoplasma, lo que da como resultado la pérdida de microtúbulos debidos a su recambio natural. El tratamiento de las células cultivadas con colchicina durante un período breve da como resultado la despolimerización de todos los microtúbulos citoplasmáticos, dejando al centrosoma que contiene tubulina y es más estable (Fig. 18-12a). Cuando la colchicina se lava para permitir el nuevo crecimiento de los microtúbulos, puede verse que crecen desde el centrosoma, revelando su capacidad para nuclear el ensamblaje de nuevos microtúbulos (Fig. 18-12b).

La colchicina se ha empleado durante cientos de años para el alivio del dolor articular de la gota aguda (un paciente famoso fue el rey Enrique VIII de Inglaterra, tratado con colchicina para aliviar sus dolores). Un bajo nivel de colchicina alivia la inflamación causada por la dinámica de los microtúbulos de los leucocitos, tornándolos incapaces de migrar eficientemente al sitio de la inflamación.

Además de la colchicina, varios otros fármacos se unen al dímero de tubulina y evitan que este forme polímeros. Estos incluyen a la podofilotoxina (del enebro) y al nocodazol (un fármaco sintético).

El taxol, un alcaloide vegetal del árbol de tejo del Pacífico, se une a los microtúbulos contra la despolimerización. Dado que el taxol evita que las células se dividan inhibiendo la mitosis, se lo ha empleado para el tratamiento de algunos cánceres tales como el de mamas y ovarios, en los que las células son especialmente sensibles a estos fármacos. ■

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 18.2

Dinámica de los microtúbulos

- Los extremos (+) de los microtúbulos individuales pueden sufrir inestabilidad dinámica, con períodos alternantes de crecimiento o encogimiento rápido (véase Fig. 18-10).
- La mayoría de la tubulina β de los microtúbulos está unida a GDP. En los microtúbulos en crecimiento, los extremos (+) están encasquetados por la tubulina-GTP- β y son romos o ligeramente extendidos. Los microtúbulos que se encogen han perdido el casquete de tubulina β -GTP, lo que hace que los protofilamentos se desprendan y se desensamblen (véase Fig. 18-11).
- Los microtúbulos en crecimiento almacenan la energía derivada de la hidrólisis del GTP en la red de microtúbulos, de modo que tienen el potencial de hacer trabajo cuando se desensamblan.
- Los microtúbulos ensamblados a partir del centrosoma y que exhiben inestabilidad dinámica pueden “buscar” en el citoplasma para estructuras u orgánulos con dianas apropiadas y “capturarlos”, lo cual resulta en la estabilización del extremo (+) del microtúbulo. De este modo, el ensamblaje acoplado con la “búsqueda y captura” puede contribuir a la distribución general de los microtúbulos en una célula.

18.3 Regulación de la estructura y dinámica de los microtúbulos

La pared de los microtúbulos está construida a partir de dímeros de tubulina- $\alpha\beta$ y la tubulina- $\alpha\beta$ muy purificada se ensamblará *in vitro* en microtúbulos. Pero el ensamblaje de los microtúbulos *in vitro* puede incrementarse en gran medida por la presencia de proteínas asociadas a los microtúbulos (MAP) que los estabilizan. Las MAP estabilizantes representan solo una clase de proteína que interactúa con la tubulina en los microtúbulos; otras clases desestabilizan los microtúbulos o modifican sus propiedades de crecimiento. Analizaremos las diferentes clases en esta sección. La regulación de la estructura de los microtúbulos y de su dinámica es crítica para el adecuado funcionamiento celular. Como veremos más adelante, los microtúbulos son los principales organizadores de los orgánulos en las células animales y su estabilidad y dinámica están adecuadas a la función específica de la célula en cualquier momento dado. Por ejemplo, la dinámica de los microtúbulos se incrementa notablemente cuando la célula entra en mitosis para permitir que esta construya una nueva organización microtubular, el huso mitótico.

Los microtúbulos están estabilizados por proteínas que se unen a los lados

Varias clases distintas de proteínas estabilizan a los microtúbulos, muchas de ellas mostrando una expresión específica para un tipo celular característico. Entre las mejor estudiadas está la familia de proteínas *tau*, que incluye a la propia tau y a las proteínas llamadas MAP2 y MAP4. La tau y la MAP2 son proteínas neuronales, mientras que la

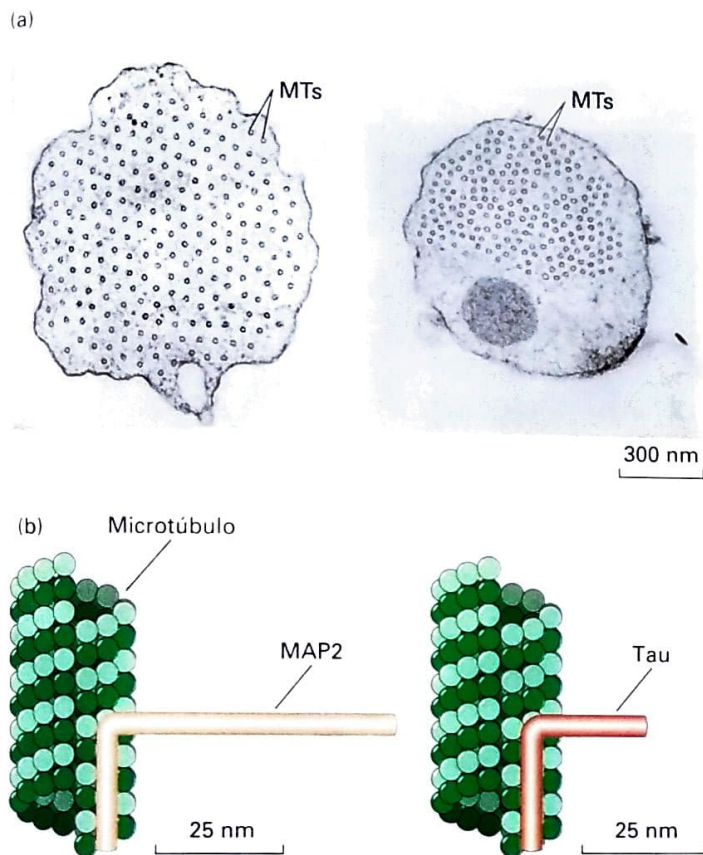


FIGURA EXPERIMENTAL 18-13 El espaciamento de los microtúbulos depende de la longitud del dominio de proyección de las proteínas asociadas a los microtúbulos. Las células de los insectos transfectadas para expresar MAP2 (que tiene un brazo largo) o para expresar la proteína tau (que tiene un brazo corto), desarrollan prolongaciones largas similares a los axones. (a) Fotomicrografías electrónicas de cortes transversales a través de la prolongación inducida por la expresión de MAP2 (izquierda) o tau (derecha) en células transfectadas. Nótese que el espaciamento entre los microtúbulos (MT) en las células que contienen MAP2 es más grande que en las que contienen tau. Ambos tipos celulares contienen aproximadamente el mismo número de microtúbulos, pero el efecto de la MAP2 es aumentar el calibre de la prolongación de tipo axónico. (b) Diagramas de asociación entre los microtúbulos y las MAP. Nótese la diferencia en las longitudes de los brazos de proyección en la MAP2 y la tau. (Parte [a] tomada de J. Chen y cols., 1992, *Nature* **360**:674)

MAP4 es expresada por otros tipos celulares y en general no está presente en las neuronas. Estas proteínas tienen un diseño modular con dos dominios clave. Un dominio consiste en una secuencia con carga positiva de 18 residuos (los cuales se repiten de tres a cuatro veces) y se une a la superficie de la tubulina negativamente cargada. El segundo dominio se proyecta en ángulo recto a partir del microtúbulo (Fig. 18-13). Se cree que las proteínas tau estabilizan los microtúbulos y también actúan como espaciadoras entre ellos. La MAP2 se encuentra solamente en las dendritas de las neuronas, en las que forma puentes cruzados fibrosos entre los microtúbulos y vincula a estos con los filamentos intermedios. La tau, que es mucho más pequeña que la mayoría del resto de las MAP, está presente tanto en los axones como en las dendritas. La base de esta selectividad aún es un misterio.

Cuando las MAP estabilizantes cubren la pared externa de un microtúbulo, pueden incrementar la velocidad de crecimiento de los microtúbulos o suprimir la frecuencia de las catástrofes. En muchos casos, la

actividad de las MAP está regulada por la fosforilación reversible de su dominio de proyección. Las MAP fosforiladas son incapaces de unirse a los microtúbulos, de modo que la fosforilación promueve el desensamblaje microtubular. Por ejemplo, la cinasa que regula la afinidad de los microtúbulos (MARK/Par-1) es un modulador central de las proteínas tau. Algunas MAP, como la MAP4, también son fosforiladas por una *cinasa dependiente de ciclina* (CDK) que desempeña un papel central en el control de las actividades de las proteínas durante el ciclo celular (Capítulo 19).

Las +TIP regulan las propiedades y funciones del extremo (+) de los microtúbulos

Además de su participación en la unión lateral, como las proteínas tau, las MAP han sido identificadas en asociación con los extremos (+) de los microtúbulos. En muchos casos solamente se asocian con los extremos (+) en crecimiento, no en encogimiento (Fig. 18-14a, b). Las MAP de esta clase se conocen como +TIP, por su denominación en inglés (*plus end tracking proteins*). Si bien hay varios mecanismos por los cuales las +TIP reconocen el extremo (+) de un microtúbulo en crecimiento, se cree que la asociación de una +TIP principal llamada EB1 (por su nombre en inglés, *end-binding-1* o unión al extremo-1) lo hace a través de la interacción con una estructura única, la cual solo está presente en los microtúbulos en crecimiento (Fig. 18-14c). La característica única más obvia de un microtúbulo en crecimiento es la naturaleza más roma de su extremo (+), de modo tal que tal vez esto es lo que reconozca la EB1. Sin embargo, la localización de la EB1 se extiende mucho más atrás a lo largo del microtúbulo y no se limita solo al extremo con la terminal roma, sugiriendo que este modelo simple no está contándonos toda la historia. La mayoría de las otras +TIP se asocian con el extremo (+), ya sea uniendo la EB1 o requiriendo EB1 para asociarse allí, y generalmente se dice que están “haciendo *autostop*” (“*hitchhiking*”) sobre la EB1 (véase la Fig. 18-14d).

Las +TIP son muy importantes en la vida de un microtúbulo, dado que pueden modificar sus propiedades de varias maneras. En primer lugar, las proteínas como la EB1 promueven el crecimiento de los microtúbulos incrementando la polimerización en el extremo (+). En segundo lugar, otras +TIP pueden reducir la frecuencia de las catástrofes, promoviendo de este modo el crecimiento de los microtúbulos. Una tercera clase vincula al extremo (+) del microtúbulo con otras estructuras celulares, tales como la corteza celular, la F-actina y, como veremos más adelante durante nuestro debate acerca de la mitosis, los cromosomas; una característica clave de este sistema dinámico es que cuando está “buscando” crecimiento de microtúbulos y una +TIP encuentra una diana adecuada, el microtúbulo puede ser “capturado” y estabilizado. Aun otro tipo de +TIP vincula los extremos (+) de los microtúbulos a las membranas; por ejemplo, la vinculación a la proteína del retículo endoplasmático transmembrana STIM promueve la extensión dependiente de microtúbulos del retículo endoplasmático tubular (analizado en la Sección 18.4; véase Fig. 18-27).

Otras proteínas que se unen a los extremos regulan el desensamblaje de los microtúbulos

También existen mecanismos para incrementar el desensamblaje de los microtúbulos. Aunque la mayoría de la regulación de la dinámica de los microtúbulos parece ocurrir en el extremo (+), en algunas situaciones como la mitosis puede ocurrir en ambos extremos.

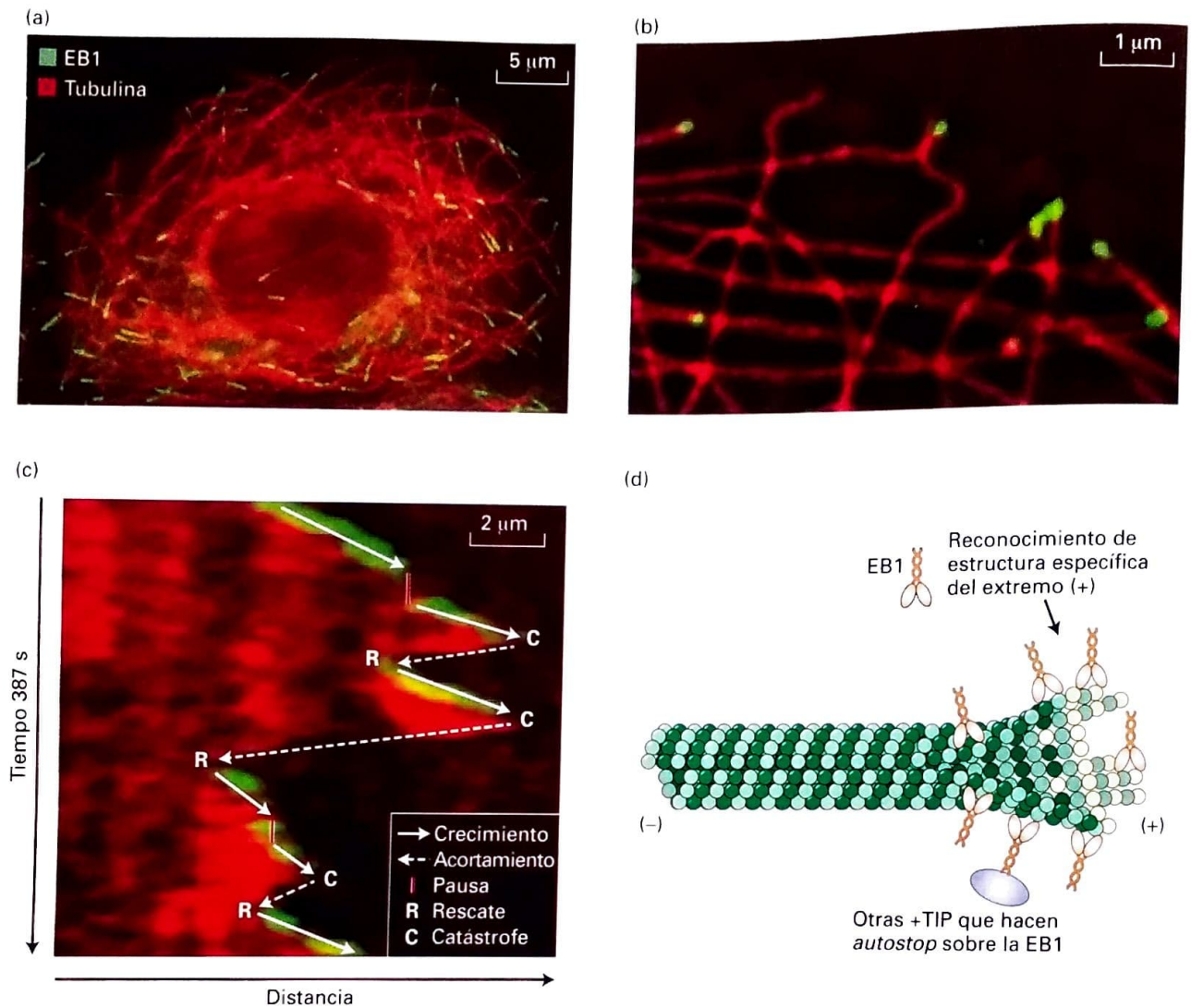


FIGURA EXPERIMENTAL 18-14 La proteína EB1 +TIP se asocia dinámicamente con los extremos (+) de los microtúbulos. (a) Célula cultivada teñida con anticuerpos contra la tubulina (rojo) y la proteína EB1 +TIP (verde). La EB1 está enriquecida en la región del extremo (+) del microtúbulo. (b) Borde de una célula viva que expresa EB3-PFV (verde) y tubulina α mCherry (rojo). La EB3, muy relacionada con la EB1, se encuentra en los extremos de ciertos microtúbulos. (c) El complejo EB3-PFV se asocia selectivamente con los microtúbulos en crecimiento, como se ve en el llamado "quimógrafo". En esta figura, se hizo un seguimiento de la dinámica de un microtúbulo individual (rojo) y uno EB3 (verde) en una célula viva que se muestra en (b), tomando la misma región de fotografías secuenciales a partir de una película y haciendo un segui-

miento desde la base hasta la parte superior. En la parte superior, puede verse el inicio de la película con el microtúbulo encasquetado por la EB3. Bajando en la figura, puede seguirse la dinámica del microtúbulo en el tiempo, a medida que crece y se encoge. Cuando el microtúbulo crece, permanece encasquetado por la EB3. Cuando el crecimiento del microtúbulo se detiene o este se encoge, la EB3 ya no está asociada con el extremo, sino que se reasocia cuando se reanuda el crecimiento. Resumen diagramático de la dinámica del microtúbulo. (d) Posible mecanismo por el cual la EB1 se une a un microtúbulo en crecimiento y el modo en que otras proteínas pueden "hacer autostop" sobre la EB1. [Partes (a) (c) cortesía del Dr. A. Akhmanova, Cell Biology, Utrecht University, The Netherlands y Dr. M. Steinmetz, Biomolecular Research, Paul Scherrer Institut, Villigen PSI, Switzerland.]

Se conocen varios mecanismos para la desestabilización de los microtúbulos. Uno de ellos involucra a la familia de proteínas de la kinesina-13. Como analizamos en la Sección 18.4, la mayoría de las kinesinas son motores moleculares, pero las proteínas kinesina 13 son una clase diferente que se une y curva el extremo de los protofilamentos de tubulina a la conformación GDP- β -tubulina. Estas facilitan entonces la eliminación de los dímeros de tubulina terminales, incrementando así en gran medida la frecuencia de las catástrofes (Fig. 18-15a). Actúan

catalíticamente en el sentido de que requieren hidrolizar ATP para remover de modo secuencial los dímeros de tubulina terminales.

Otra proteína, conocida como la estamina/Op18, también aumenta la tasa de catástrofes. Originalmente se identificó como una proteína que se sobreexpresaba, en gran medida, en ciertos cánceres; a esto se debe parte de su nombre (Oncoproteína 18). La estamina/Op18 es una pequeña proteína que une dos dímeros de tubulina en una conformación curvada, similar a la GDP- β -tubulina (Fig. 18-15b). Puede

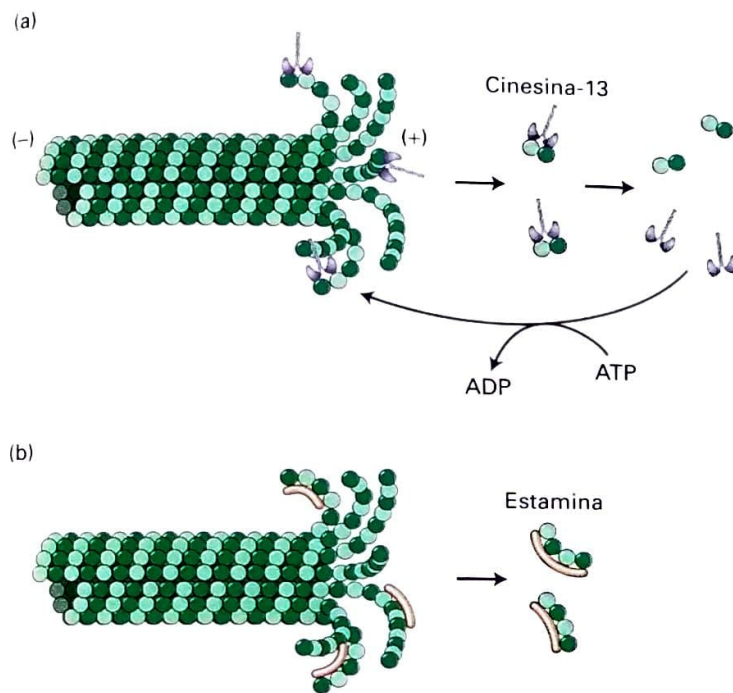


FIGURA 18-15 Proteínas que desestabilizan los extremos de los microtúbulos. (a) Un miembro de la familia de la cinesina-13 enriquecido en los extremos del microtúbulo puede incrementar el desensamblaje de dicho extremo [aunque se muestra la despolimerización del extremo (+), la cinesina-13 también puede despolimerizar el extremo (-)]. Estas proteínas son ATPasas y el ATP incrementa su actividad al disociarlas del dímero de tubulina $\alpha\beta$. (b) La estamina se une selectivamente a protofilamentos curvos e incrementa su disociación desde el extremo del microtúbulo. La actividad de la estamina es inhibida por la fosforilación.

funcionar incrementando la hidrólisis de GTP en el dímero terminal de la tubulina y ayudando en su disociación desde el extremo del microtúbulo. Como podría esperarse para un regulador de los extremos de los microtúbulos, está sujeta a regulación negativa mediante la fosforilación por una gran variedad de cinasas. De hecho, se ha encontrado que la estamina/Op18 es inactivada por fosforilación cerca del borde conductor de las células móviles, lo que contribuye al crecimiento preferencial de los microtúbulos hacia el frente de la célula.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 18.3

Regulación de la estructura y dinámica de los microtúbulos

- Los microtúbulos pueden estabilizarse con proteínas que se asocian lateralmente a ellos (MAP) (véase Fig. 18-13).
- Algunas MAP, llamadas +TIP, se unen selectivamente a los extremos (+) crecientes de los microtúbulos y pueden alterar las propiedades dinámicas de estos o localizar componentes para la búsqueda del extremo (+) del microtúbulo (véase Fig. 18-14).
- Los extremos de los microtúbulos pueden desestabilizarse por algunas proteínas, como la familia de la cinesina-13 y la Op18/estamina, para aumentar la frecuencia de las catástrofes (véase Fig. 18-15).

18.4 Cinesinas y dineínas: proteínas motoras de los microtúbulos

Los orgánulos de las células con frecuencia son transportados a lo largo de distancias de muchos micrómetros en rutas bien definidas del citoplasma y entregados a ubicaciones intracelulares particulares. La difusión sola no puede dar cuenta de la velocidad, direccionalidad y destino de estos procesos de transporte. Los hallazgos hechos en experimentos iniciales con células pigmentadas de escamas de pescados y células nerviosas demostraron por primera vez que los microtúbulos funcionan como vías en el transporte intracelular de varios tipos de "cargas".

Como ya hemos analizado, la polimerización y la despolimerización de los microtúbulos pueden operar empleando la energía proporcionada por la hidrólisis de GTP. Además, las **proteínas motoras** se mueven a lo largo de los microtúbulos impulsadas por la hidrólisis de ATP. Se sabe que hay dos familias principales de proteínas motoras (**cinesinas** y **dineínas**) que median el transporte a lo largo de los microtúbulos. En esta sección analizaremos el modo en que estas proteínas motoras operan y los papeles que desempeñan en las células en interfase. En secciones posteriores analizaremos sus funciones en los cilios y los flagelos, así como en la mitosis.

Los orgánulos de los axones son transportados a lo largo de los microtúbulos en ambas direcciones

Una neurona debe proporcionar constantemente nuevos materiales (proteínas y membranas) a las terminales axónicas, a fin de reabastecer aquellos que se han perdido en la exocitosis de los neurotransmisores en la unión (sinapsis) con otra célula (Capítulo 22). Dado que las proteínas y las membranas son primariamente sintetizadas en el cuerpo celular, estos materiales deben ser transportados a lo largo del axón, el cual en algunas neuronas puede incluso llegar a medir un metro hasta la región de la sinapsis. Este movimiento de materiales es llevado a cabo en los microtúbulos, que están orientados todos con sus extremos (+) hacia la terminal axónica (véase Fig. 18-5e).

Los resultados de los experimentos clásicos de pulso y caza, en los cuales los precursores radioactivos se microinyectaron en los ganglios de la raíz dorsal cerca de la médula espinal y luego se siguieron en su recorrido a lo largo de sus axones nerviosos, mostraron que el **transporte axónico** ocurre desde el cuerpo celular a lo largo del axón. Otros experimentos mostraron que el transporte también puede ocurrir en dirección inversa, por ejemplo, hacia el cuerpo celular. El transporte **anterógrado** procede desde el cuerpo celular hacia las terminales sinápticas y está asociado con el crecimiento axónico y la entrega de vesículas sinápticas. En la dirección opuesta, **retrograda**, las membranas "viejas" de las terminales sinápticas se mueven a lo largo del axón rápidamente hacia el cuerpo celular, donde pueden ser degradadas en los lisosomas. Los hallazgos hechos en experimentos de este tipo también revelaron que diferentes materiales se mueven a velocidades diferentes (Fig. 18-16). El material que se mueve más rápido, las vesículas limitadas por membrana, tiene una velocidad de aproximadamente 3 $\mu\text{m/s}$ o 250 mm/día (por lo cual se requiere aproximadamente de cuatro días para que viaje desde un cuerpo celular de su espalda a lo largo de un axón que termina en su pulgar del pie). El material que se mueve más lentamente comprende subunidades de tubulina y neurofilamentos (los filamentos intermedios que se encuentran en las neuronas), se mueve solo una fracción de milímetro por día. Los orgánulos como las mitocondrias se mueven a lo largo del axón a una velocidad intermedia.

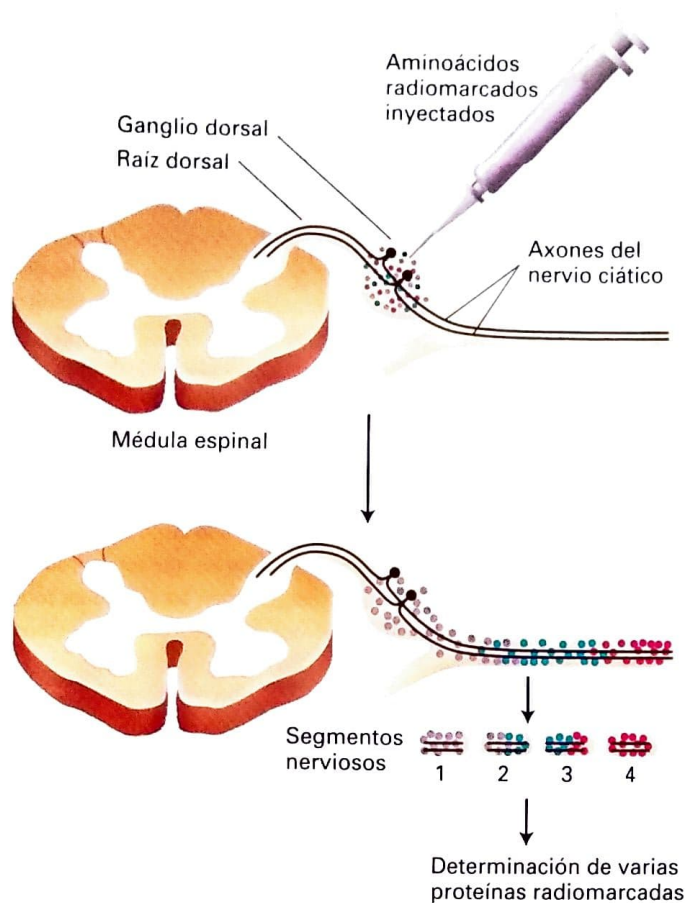


FIGURA EXPERIMENTAL 18-16 La velocidad del transporte axónico in vivo puede determinarse mediante radiomarcación y electroforesis en gel. Los cuerpos celulares de las neuronas del nervio ciático se encuentran localizados en los ganglios de la raíz dorsal (cerca de la médula espinal). Los aminoácidos radiactivos inyectados a estos ganglios en animales de experimentación se incorporan a proteínas recién sintetizadas, que luego son transportadas a lo largo del axón hasta la sinapsis. Los animales se sacrifican en varios momentos después de la inyección y el nervio ciático seccionado se corta en pequeños segmentos para ver qué tan lejos han sido transportadas las proteínas radiomarcadas; pueden ser identificadas después de electroforesis en gel y autorradiografía. Las manchas rojas, azules y púrpura representan grupos de proteínas transportadas a lo largo del axón a diferentes velocidades: las rojas con más rapidez y las púrpuras, con menos.

Los neurobiólogos han hecho uso extensivo del axón gigante de calamar para estudiar el movimiento de los orgánulos a lo largo de los microtúbulos. Implicado en la regulación del sistema de propulsión de agua del calamar, el adecuadamente llamado axón gigante puede tener hasta 1 mm de diámetro, que es aproximadamente 100 veces más ancho que un axón promedio de mamífero. Más aún, al apretar el axón como si fuera un tubo de dentífrico, se elimina el citoplasma (también conocido como axoplasma), lo cual puede ser observado luego por video microscopía. El movimiento de vesículas a lo largo de los microtúbulos en este sistema libre de células requiere ATP; su velocidad es similar a la del transporte axónico rápido en las células intactas y puede proceder tanto en dirección anterógrada como retrógrada (Fig. 18-17a). La microscopía electrónica de la misma región del citoplasma del axón revela orgánulos unidos a microtúbulos individuales (Fig. 18-17b). Estos experimentos pioneros in vitro establecieron en forma

definitiva que los orgánulos se mueven a lo largo de los microtúbulos individuales y que su movimiento requiere ATP.

Los hallazgos de experimentos verde (PFV) se inyectaban a células marcadas con proteína fluorescente (PFV) se inyectaban a células marcadas con proteína fluorescente se pausan frecuentemente cultivadas sugieren que los neurofilamentos se pausan frecuentemente a medida que se mueven a lo largo de un axón. Si bien la velocidad máxima de los neurofilamentos es semejante a la de las vesículas que se mueven con rapidez, sus numerosas pausas hacen bajar la velocidad promedio de transporte. Estos hallazgos sugieren que no hay una diferencia fundamental entre el transporte axónico rápido y el lento, aunque la razón por la cual el transporte de los neurofilamentos se detiene periódicamente se desconoce.

La cinesina-1 impulsa el transporte anterógrado de vesículas a lo largo de los axones hacia el extremo (+) de los microtúbulos

La proteína responsable del transporte anterógrado de orgánulos fue purificada por primera vez a partir de extractos de axones. Los investigadores encontraron que al mezclar tres componentes (los orgánulos purificados de axones de calamar, un extracto axónico citoplasmático libre de orgánulos y microtúbulos estabilizados por taxol), los orgánulos podían verse moviéndose a lo largo de los microtúbulos en una manera dependiente del ATP. Sin embargo, si se omitía el extracto axónico, los orgánulos nunca se unían ni se movían a lo largo de los microtúbulos, sugiriendo que el extracto contribuye con una proteína que tanto une los orgánulos a los microtúbulos como los transporta a lo largo de ellos (es decir, una proteína motora). La estrategia para purificar la proteína motora se basó en observaciones adicionales de orgánulos que se movían sobre los microtúbulos. Se sabía que si el ATP era hidrolizado a ADP, los orgánulos se desprendían de los microtúbulos. Sin embargo, si se añadía el análogo de ATP no hidrolizable AMPPNP, los orgánulos permanecían asociados a los microtúbulos pero no se movían. Esto sugirió que el motor unía los orgánulos a los microtúbulos muy estrechamente en presencia de AMPPNP, pero luego era liberado de los microtúbulos cuando el AMPPNP se reemplazaba por ATP y se hidrolizaba seguidamente a ADP. Los investigadores emplearon esta pista para purificar el motor.

La cinesina-1 aislada de los axones gigantes de calamar es un dímero de dos cadenas pesadas, cada una de las cuales está asociada con una cadena ligera, con un peso molecular total de aproximadamente 380 000. La molécula comprende un par de dominios de la cabeza globulares conectados por un dominio vinculante flexible corto a un tallo central largo y terminando en un par de dominios de la cola globulares pequeños que se asocian con las cadenas ligeras (Fig. 18-18). Cada dominio lleva a cabo una función particular: el dominio de la cabeza se une a los microtúbulos y al ATP y es responsable de la actividad motora adelante; el dominio vinculante es crítico para la movilidad hacia adelante; el dominio de tallo está implicado en la dimerización de las dos cadenas pesadas; y el dominio de la cola es responsable de la unión a los receptores en la membrana de las cargas.

El movimiento de las vesículas dependiente de la cinesina-1 puede ser seguido por ensayos de movilidad in vitro similares a los que se emplearon para estudiar los movimientos dependientes de miosina (véase Fig. 17-23). En un tipo de ensayo, una vesícula o una cuenta plástica cubierta con cinesina-1 se añade a un portaobjeto junto con un preparado de microtúbulos estabilizados.

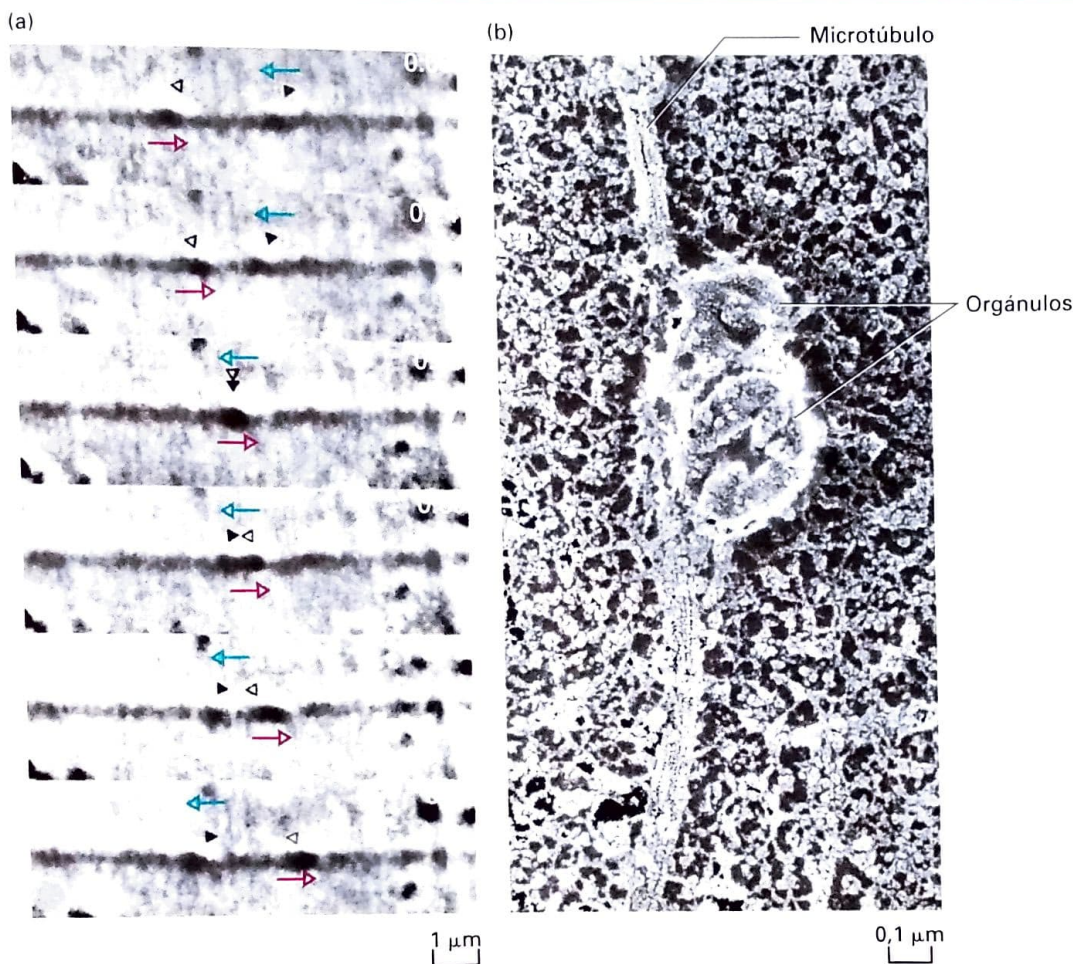


FIGURA EXPERIMENTAL 18-17 La microscopia CID demuestra el transporte in vitro de vesículas dependientes de los microtúbulos. (a) El citoplasma fue exprimido desde un axón gigante de calamar con un rodillo a un cubreobjetos de vidrio. Después de añadir una solución amortiguadora con ATP al preparado, se lo vio por microscopia de contraste de interferencia diferencial (CID) y se grabaron las imágenes en un videocasete. En las imágenes secuenciales que se muestran, los dos orgánulos indicados mediante los triángulos abiertos y los sólidos se mueven en direcciones opuestas (señaladas por las flechas coloreadas

a lo largo del mismo filamento) uno sobre otro y continúan en sus direcciones originales. El tiempo transcurrido en segundos aparece en la esquina superior derecha de cada cuadro del video. (b) Una región del citoplasma similar a la que se muestra en la parte (a) fue criosecada, sombreada por rotación con platino y visualizada al microscopio electrónico. Las dos estructuras grandes unidas a un microtúbulo son visibles y supuestamente constituyen pequeñas vesículas que estaban moviéndose a lo largo del microtúbulo cuando se congeló el preparado (Vese B. J. Schnapp y cols., 1985, *Cell* **40**:455, cortesía de B. J. Schnapp, R. D. Vale, M. P. Sheetz y T. S. Reese.)

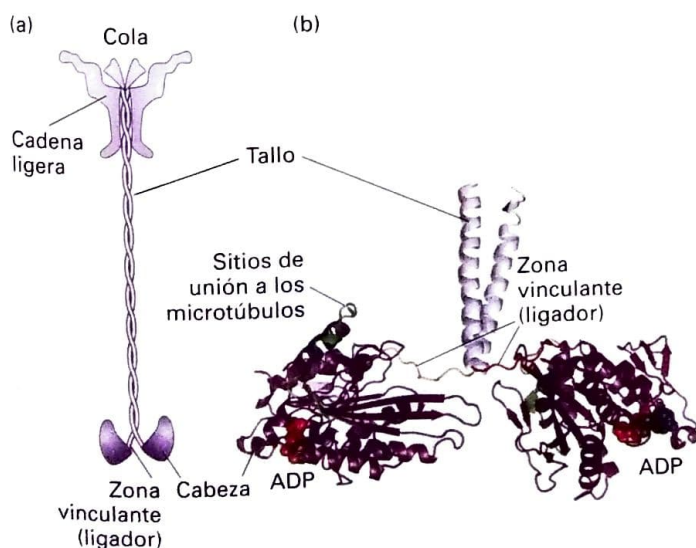
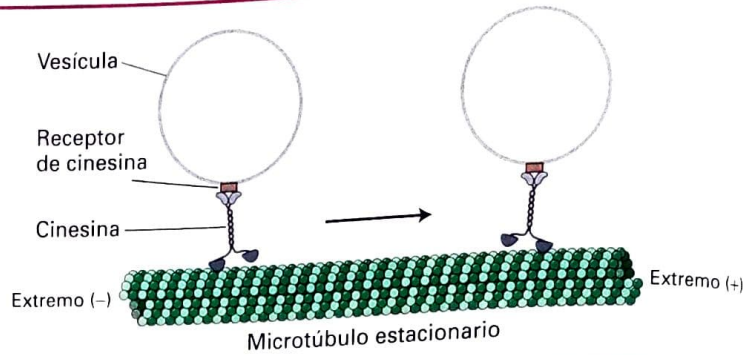


FIGURA 18-18 Estructura de la cinesina-1. (a) Representación de la cinesina-1 que muestra sus dos cadenas pesadas enrolladas una con otra, cada una con un dominio motor en la región de la cabeza. Cada cabeza está unida al tallo de espiral enrollada mediante un dominio de un ligador vinculante flexible. Dos cadenas ligeras se asocian con la cola de la cadena pesada. (b) Estructura de rayos X de las cabezas de cinesina con los sitios que unen microtúbulo y nucleótido (y contienen ADP) indicados, incluyendo los ligadores y el inicio de la región del tallo. (Parte [a] modificada de R. D. Vale, 2003, *Cell* **112**:467. Parte [b] cortesía de E. Mandelkow y E. M. Mandelkow, adaptado de M. Thormählen y cols., 1998, *J. Struct. Biol.* **122** 30.)

FIGURA 18-19 Modelo del transporte de vesículas catalizado por cinesina-1. Las moléculas de cinesina-1, unidas a receptores presentes en la superficie de la vesícula, las transportan desde el extremo (-) al extremo (+) de un microtúbulo estacionario. Se requiere ATP para el movimiento. (Adaptado de R. D. Vale y cols., 1985, *Cell* **40**:559 y T. Schroer y cols., 1988, *J. Cell Biol.* **107**:1785.)



En presencia de ATP, pueden observarse microscópicamente cuentas en movimiento a lo largo de un microtúbulo en una dirección. Los investigadores encontraron que las cuentas cubiertas con cinesina-1 siempre se movían desde el extremo (-) al (+) de un microtúbulo (Fig. 18-19). Así, la cinesina-1 es una proteína motora de los microtúbulos dirigida hacia el extremo (+) y la evidencia adicional muestra que media el transporte axónico anterógrado.

Las cinesinas forman una gran familia de proteínas con funciones diversas

Después del descubrimiento de la cinesina-1, una diversidad de proteínas con dominios motores semejantes fueron identificadas tanto en los ensayos de detección genéticos como empleando enfoques de la

biología molecular. Actualmente, hay 14 clases conocidas de cinesinas en los animales, definidas por compartir homología de secuencias de aminoácidos con el dominio motor de la cinesina-1. Las proteínas de la superfamilia de la cinesina están codificadas por aproximadamente 45 genes del genoma humano. Si bien las funciones de todas estas proteínas aún no han sido descubiertas, algunas de las cinesinas mejor estudiadas están implicadas en procesos tales como el transporte de orgánulos, de mRNA y cromosómico, el deslizamiento de los microtúbulos y la despolimerización de estos.

Como ocurre con las distintas clases de motores de miosina, en las distintas familias de cinesinas los dominios motores conservados se encuentran fusionados con una variedad de dominios no motores específicos de la clase (Fig. 18-20). Mientras que la cinesina-1 tiene dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas, los miembros

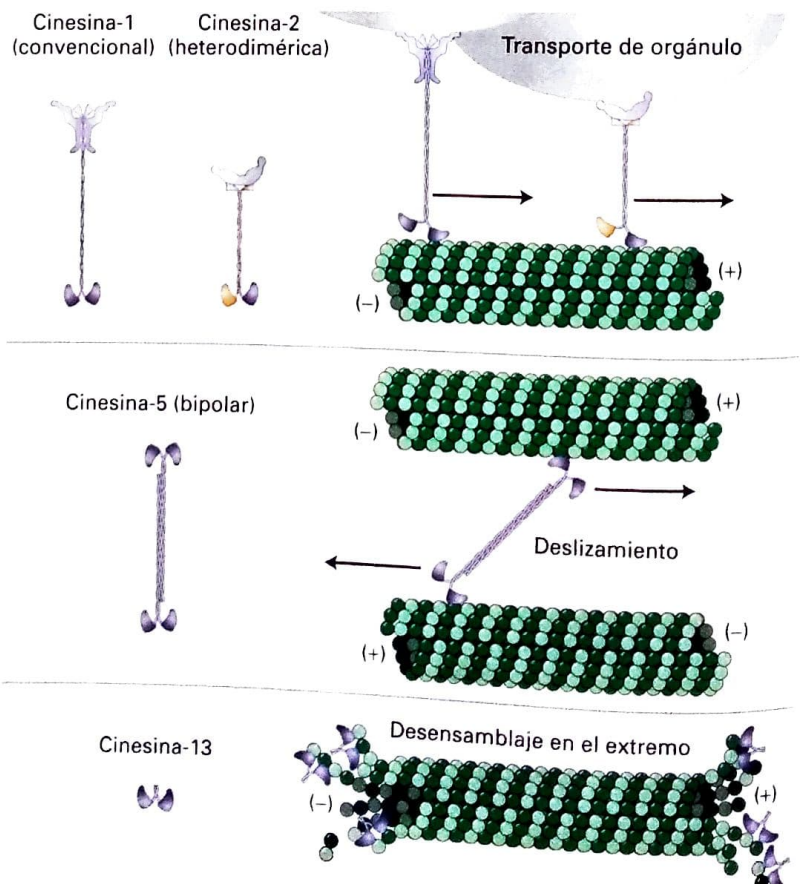


FIGURA 18-20 Estructura y función de miembros seleccionados de la superfamilia de las cinesinas. La cinesina-1, que incluye la cinesina original aislada de los axones de calamar, es un motor de microtúbulos dirigido al extremo (+) implicado en el transporte de orgánulos. La familia de la cinesina-2 tiene dos cadenas pesadas distintas pero muy relacionadas y una tercera subunidad que transporta carga; esta clase también transporta orgánulos de modo dirigido hacia el extremo (+). La familia de la cinesina-5 tiene cuatro cadenas pesadas ensambladas de modo bipolar para interactuar con dos microtúbulos antiparalelos y también se mueve hacia el extremo (+). Los miembros de la familia de la cinesina-13 tienen el dominio motor en el medio de sus cadenas pesadas y no tienen actividad motora pero desestabilizan los extremos de los microtúbulos (véase también la Fig. 18-15a). Los miembros adicionales de la familia de las cinesinas se mencionan en el texto. A distintas cinesinas se les han dado nombres muy distintos; nosotros empleamos la nomenclatura unificada descrita en C. J. Lawrence y cols., 2004, *J. Cell Biol.* **167**:19-22. (Diagramas modificados de R. D. Vale, 2003, *Cell* **112**:467.)

de la familia de la cinesina-2 (implicados también en el transporte de orgánulos) tienen dos dominios motores diferentes relacionados en la cadena pesada y un tercer polipéptido que se asocia con la cola y une la carga. Los miembros de la familia bipolar de la cinesina-5 tienen cuatro cadenas pesadas, que forman motores bipolares los cuales pueden entrecruzar los microtúbulos antiparalelos y, al desplazarse hacia el extremo (+) de cada microtúbulo, se deslizan uno más allá del otro. Los motores de la cinesina-14 son la única clase conocida que se mueve hacia el extremo (-) de un microtúbulo; esta clase funciona en la mitosis. Un tipo adicional, el de la familia de la cinesina-13, tiene dos subunidades pero con el dominio de la cinesina conservado en el medio del polipéptido. Las proteínas cinesina-13 no tienen actividad motora, pero recuérdese que estas son proteínas especiales que hidrolizan ATP, las cuales pueden incrementar la despolimerización de los extremos de los microtúbulos (véase Fig. 18-15).

La cinesina-1 es un motor muy procesivo

¿De qué manera la cinesina-1 se mueve a lo largo de un microtúbulo? Las técnicas de marcaje con fluorescencia y atrapamiento óptico, similares a las empleadas para caracterizar la miosina (véanse las Figs. 17-28, 17-29 y 17-30), se han empleado para estudiar el modo en que la cinesina-1 se mueve a lo largo de un microtúbulo y de qué manera la hidrólisis de ATP se convierte a trabajo mecánico. Estos experimentos demuestran que es un motor muy procesivo (al que le lleva cientos de pasos avanzar mano sobre mano a lo largo de un microtúbulo sin disociarse). Durante este proceso, la molécula de dos cabezas realiza pasos de 8 nm desde un dímero de tubulina hasta el siguiente, siguiendo el sendero del mismo protofilamento en el microtúbulo. Esto implica que cada cabeza *individual* realiza pasos de 16 nm. Las dos cabezas operan de modo muy coordinado, de modo tal que una siempre está unida al microtúbulo.

El ciclo del ATP del movimiento de la cinesina-1 se comprende más fácilmente considerando, en primer término, el ciclo justo después de que el motor ha dado un paso (Fig. 8-21a). En este momento, el motor tiene una cabeza líder sin nucleótidos (condición en la cual está fuertemente unida a un dímero de tubulina en un protofilamento) y una cabeza unida a ADP, que está débilmente asociada con el protofilamento. Entonces, el ATP se une a la cabeza líder (Fig. 18-21a, paso 1) y esta unión induce un cambio de conformación en el dominio vinculante de modo tal que, en lugar de dirigirse hacia atrás, se balancea hacia adelante y “se fija” en su cabeza asociada. Este movimiento de balanceo da como resultado que el dominio vinculante rote hacia adelante y, dado que se encuentra unido hacia la cabeza rezagada, balancea la cabeza de arrastre –como si lanzara a una bailarina de ballet– en posición para transformarse en la cabeza líder (Fig. 18-21a, paso 2). La nueva cabeza líder encuentra al sitio de unión siguiente sobre el microtúbulo (Fig. 18-21a, paso 3 y Fig. 18-21b). La unión de la cabeza líder al microtúbulo induce a la cabeza líder a que libere ADP, mientras que la cabeza de arrastre hidroliza ATP a ADP y P_i , liberándolo (Fig. 18-21a, paso 4). Ahora el ATP puede unirse a la cabeza conductora para repetir el ciclo y permitir que la proteína de otro paso a lo largo del microtúbulo. Hay dos características de este ciclo que aseguran que una cabeza siempre está fuertemente unida al microtúbulo. En primer lugar, el dominio de la cabeza se une estrechamente al microtúbulo en los estados libres de nucleótido, ATP y ADP+ P_i , pero se une débilmente en el estado ADP. En segundo lugar, las dos cabezas se comunican (cuando la cabeza líder

se une al microtúbulo y libera ADP, se convierte de un estado de unión débil a un estado de unión fuerte). Este mensaje es comunicado a la cabeza unida al ATP que está rezagada, fuertemente asociada con el microtúbulo. Esta cabeza rezagada es estimulada para que hidrolice ATP, liberando P_i y convirtiéndose a un estado de unión débil. Dado que este ciclo requiere que una cabeza siempre esté firmemente unida a un dímero de tubulina de un protofilamento, la cinesina-1 puede realizar miles de pasos a lo largo de un microtúbulo sin desasociarse y, por lo tanto, es excepcionalmente procesiva a medida que avanza sobre un microtúbulo.

Cuando la estructura de rayos X de la cabeza de cinesina fue determinada, resultó sorprendente el hecho de que el núcleo catalítico tenga la misma estructura global que las miosinas (Fig. 18-22). Esto ocurre a pesar de que no hay conservación en la secuencia de aminoácidos entre ambas proteínas, lo cual constituye un fuerte argumento en favor de que la evolución convergente generó en dos ocasiones un pliegue que puede utilizar la hidrólisis de ATP para generar trabajo. Más aún, el mismo tipo de estructura tridimensional puede verse en las proteínas pequeñas que unen GTP, tales como la Ras, que sufren un cambio de conformación cuando se hidroliza el GTP (véase Fig. 15-7).

Los motores de dineína transportan orgánulos hacia el extremo (-) de los microtúbulos

Además de los motores de cinesina, que median primariamente el transporte anterógrado de los orgánulos dirigido hacia el extremo (+), las células emplean otro motor, la *dineína citoplasmática*, para transportar orgánulos de forma retrógrada hacia el extremo (-) de los microtúbulos. Esta proteína motora es muy grande, está formada de dos subunidades grandes (> 500 kDa), dos subunidades intermedias y dos pequeñas. Es responsable del transporte retrógrado dependiente de ATP de los orgánulos hacia los extremos (-) de los microtúbulos en los axones, así como de muchas otras funciones que consideraremos en las secciones siguientes. Comparadas con las miosinas y las cinesinas, la familia de las proteínas relacionadas con la dineína no es muy diversa.

Al igual que la cinesina-1, la dineína citoplasmática es una molécula de dos cabezas, construida alrededor de dos cadenas pesadas idénticas o casi idénticas. Sin embargo, dado el enorme tamaño del dominio motor, la dineína no ha sido tan bien caracterizada en términos de su actividad mecanoquímica. Una única cadena pesada de dineína consiste en una diversidad de dominios distintos (Fig. 18-23). Consiste en un *tallo*, al cual se unen otras subunidades de la dineína y que se asocia con su carga a través de la dinactina (véase más abajo). La siguiente parte de la cadena pesada es un *enlazador* que, como analizamos más adelante, desempeña una función crítica durante la actividad motora dependiente del ATP. Una gran parte de la cadena pesada de la dineína constituye la *cabeza* que contiene el dominio AAA *ATPasa*, el cual consiste en seis repeticiones que se ensamblan en una estructura con forma de flor, dentro de la cual radica la actividad de la ATPasa. Embebida entre la cuarta y la quinta repetición AAA, se encuentra el *ligadores* que sobresale de la estructura y contiene la región que se une a los microtúbulos. La microscopía electrónica, combinada con imágenes de rayos X logradas recientemente sobre la estructura de la cadena pesada de la dineína, proporciona una idea general del modo en que la dineína podría operar. Antes de un golpe impulsor, el tallo se une a la región vinculante que se encuentra entre los dominios AAA y se asocia con la primera y tercera repetición AAA (Fig. 18-24a y b, paneles de la

ARCHIVOS DE AUDIO (INGLÉS): Movimiento de la kinesinas a lo largo del microtúbulo
ANIMACIÓN FOCALIZADA: Ciclo de pasos de la kinesina sobre los microtúbulos

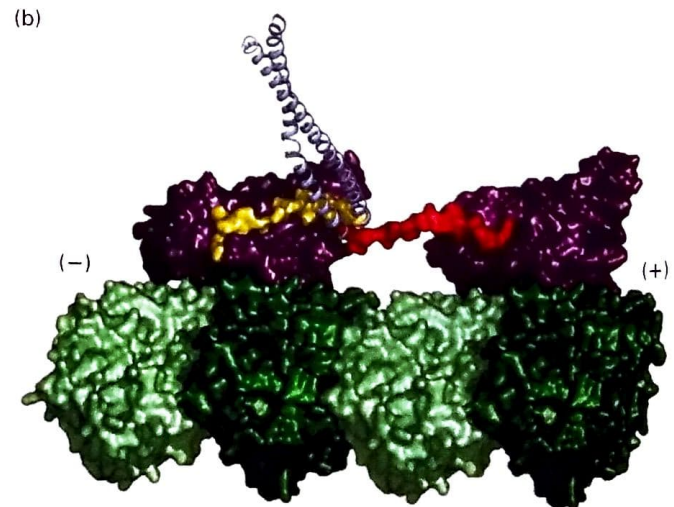
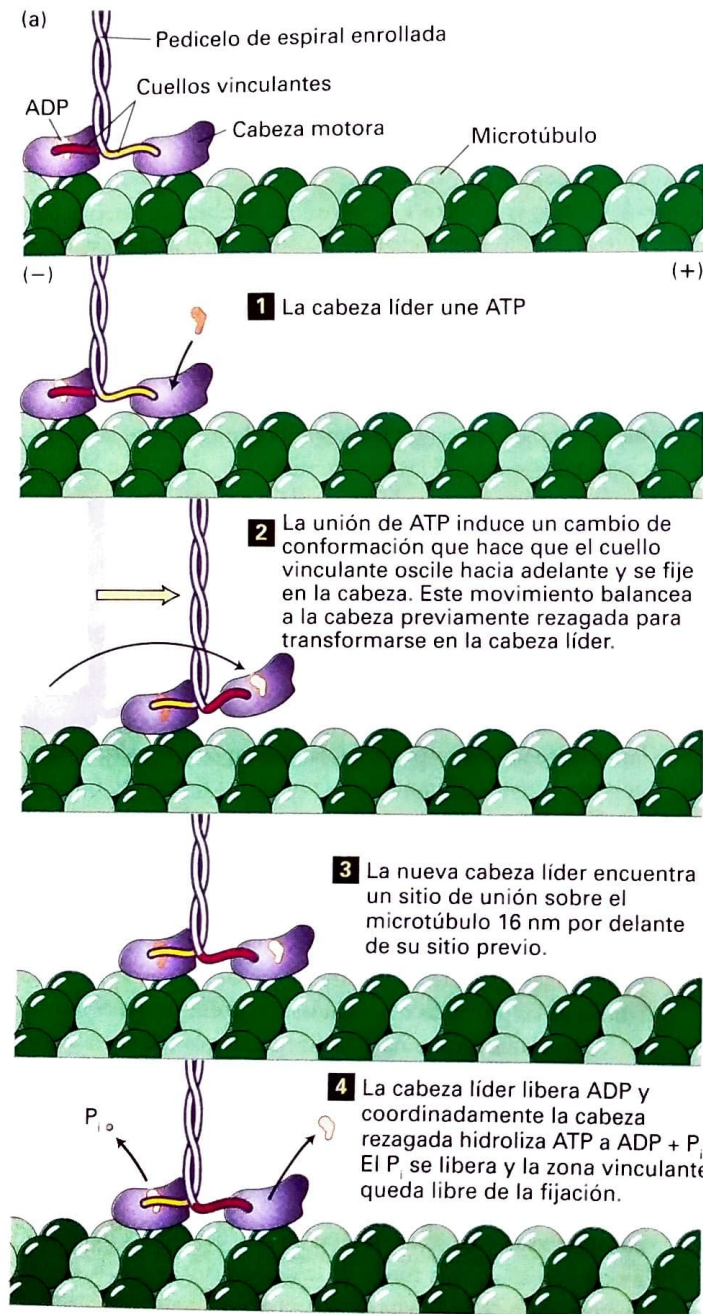


FIGURA 18-21 La kinesina-1 emplea ATP para “caminar” sobre un microtúbulo. (a) En este diagrama, las dos cabezas de kinesina se muestran con dominios de unión coloreados de modo diferencial (amarillo y rojo) para distinguirlos. Se muestra el inicio del ciclo después de que la kinesina ha dado un paso, con la cabeza líder fuertemente unida al microtúbulo y no por algún nucleótido, mientras que la cabeza arrastrada está débilmente unida al microtúbulo y tiene ADP unido. La cabeza líder luego une ATP (paso **1**), lo que induce un cambio de conformación que hace que la región del ligadores amarillo oscile hacia adelante y se fije a su dominio de cabeza asociado, arrastrando entonces a la cabeza rezagada hacia adelante (paso **2**). La nueva cabeza líder ahora encuentra un sitio de unión a 16 nm más adelante en el microtúbulo, al

cual se une débilmente (paso **3**). La cabeza líder ahora libera el ADP y se une fuertemente al microtúbulo, lo cual hace que la cabeza rezagada hidrolice ATP a ADP y P_i (paso **4**). El P_i se libera y la cabeza arrastrada se convierte a un estado de unión débil y también libera el dominio vinculante o ligadores anclado. El ciclo ahora se repite para otro paso. (b) Modelo estructural de dos cabezas de kinesina (púrpura) unidas a un protofilamento de un microtúbulo. La cabeza rezagada, a la izquierda, tiene ATP unido y se ha apartado de la otra cabeza en la posición líder. Nótese de qué manera el dominio vinculante (amarillo) está unido a la cabeza rezagada, mientras que el dominio vinculante (rojo) de la cabeza líder aún está libre. (Parte [a] modificada de R. D. Vale y R. A. Milligan, 2000, *Science* **288**:88. Parte [b] basada en E. P. Sablin y R. J. Fletterick, 2004, *J. Biol. Chem.* **279**:15707-15710.)

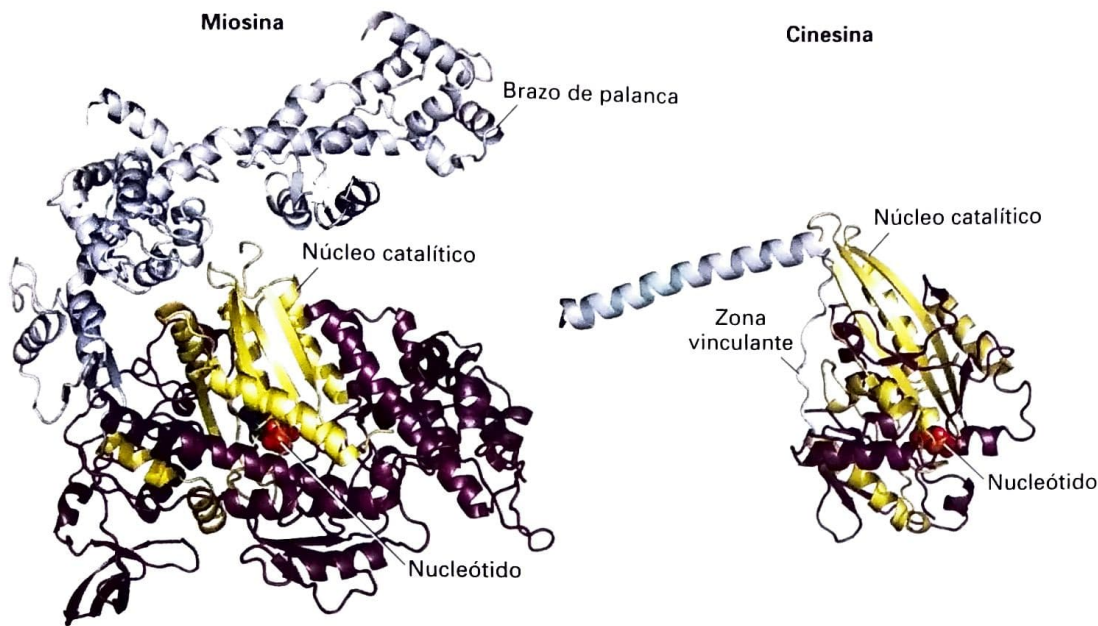


FIGURA 18-22 Evolución estructural convergente de los núcleos de las cabezas de miosina y cinesina que unen ATP. Los núcleos catalíticos comunes de la miosina y de la cinesina se muestran en amarillo, el nucleótido en rojo, y el brazo de palanca (para la miosina-II) así como el dominio vinculante (para la cinesina-1) en púrpura claro. (Modificado de R. D. Vale y R. A. Milligan, 2000, *Science* 288:88.)

izquierda). A través de la unión de ATP y su hidrólisis, el anillo AAA cambia de conformación ligeramente y el dominio vinculante se asocia con la primera y quinta repetición AAA. Este cambio de conformación rota la molécula para acercar el tallo y el ligadores, dando como resulta-

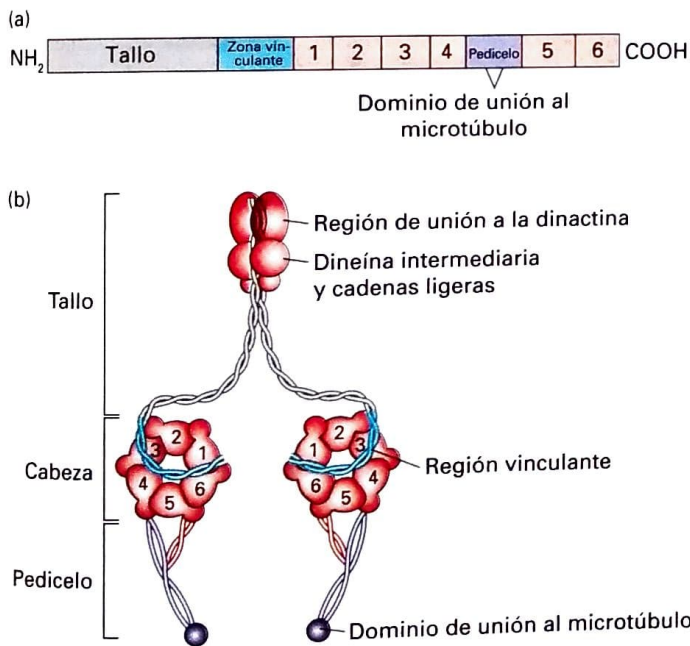


FIGURA 18-23 La estructura del dominio de la dineína citoplasmática. (a) La cadena pesada de la dineína, que consiste en más de 4000 residuos de aminoácidos, tiene varios dominios distintos. Siguiendo al tallo y a los dominios aminoácidos, hay seis repeticiones AAA (en anaranjado, numeradas de 1 a 6) de ligadores, hay seis repeticiones AAA (en anaranjado, numeradas de 1 a 6) de ligadores, hay seis repeticiones AAA (en anaranjado, numeradas de 1 a 6) de ligadores, hay seis repeticiones AAA (en anaranjado, numeradas de 1 a 6) de ligadores. La proteína termina en el dominio helicoidal α que sostiene al ligadores (b). Las seis repeticiones AAA adoptan una estructura semejante a la de los pétalos de una flor. De esta surge un dominio de ligadores de espiral enrollada con un sitio de unión a los microtúbulos en el extremo. Varias subunidades adicionales se asocian con la región del tallo y vinculan la dineína a la carga a través de la dinactina. (Modificado de R. D. Vale, 2003, *Cell* 112:467.)

do el transporte de la carga hacia el extremo (-) del microtúbulo (Fig. 18-24a y b, paneles de la derecha).

A diferencia de lo que ocurre con la cinesina-1, la dineína citoplasmática no puede mediar el transporte de carga por sí misma. En lugar de ello, el transporte relacionado con dineína en general requiere de la *dinactina*, un complejo proteico grande que simultáneamente une la dineína a su carga y regula su actividad (Fig. 18-25). La dinactina consiste en 11 tipos distintos de subunidades, organizadas funcionalmente en dos dominios. Un dominio está construido alrededor de ocho copias de la proteína relacionada con actina, Arp1, que se ensambla en un filamento corto. El extremo que corresponde al (+) de este filamento tiene un casquete formado por CapZ, la misma proteína de encaquetamiento que se une al extremo (+) de un filamento de actina (véase Fig. 17-12); varias subunidades están asociadas con el extremo (-). Este dominio que contiene Arp1 es responsable de la unión de carga. El segundo dominio de la dinactina consiste en una proteína larga llamada p150^{Glued}, que contiene el sitio de unión a la dineína y también tiene un sitio de unión a un microtúbulo en un extremo. La *dinamitina* es una proteína que mantiene juntos a los dos dominios de la dinactina –la proteína dinamitina recibe su nombre porque cuando se sobreexpresa se disocia (o “estalla”), separando los dos dominios, transformándolos en un complejo no funcional–. Esta característica ha resultado de mucha utilidad experimentalmente, porque permitió a los investigadores identificar procesos que son dependientes de dineína-dinactina, los cuales están interrumpidos en células que sobreexpresan la dinamitina. El sitio de unión a los microtúbulos de la dinactina le permite estar laxamente unida a un microtúbulo a medida que el motor de la dineína avanza a lo largo del microtúbulo (Fig. 18-25c), ayudando a que el complejo dinactina-dineína permanezca asociado con el microtúbulo. Así, las principales funciones de la dinactina son unirse a la carga y transformar a la dineína en más procesiva.

¿De qué manera está regulada la dineína? Se ha encontrado que la subunidad p150^{Glued} de la dinactina se une a +TIP EB1, permitiendo que la dineína se asocie con el extremo (+) creciente de los microtúbulos. ¿Por qué la dineína se asociaría con los extremos (+) de los microtúbulos, si es un motor dirigido hacia el extremo (-)? Investigaciones recientes sugieren que cuando la dineína está

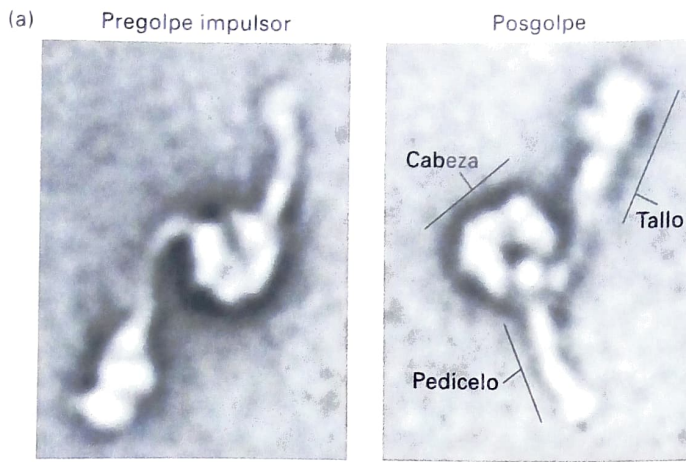
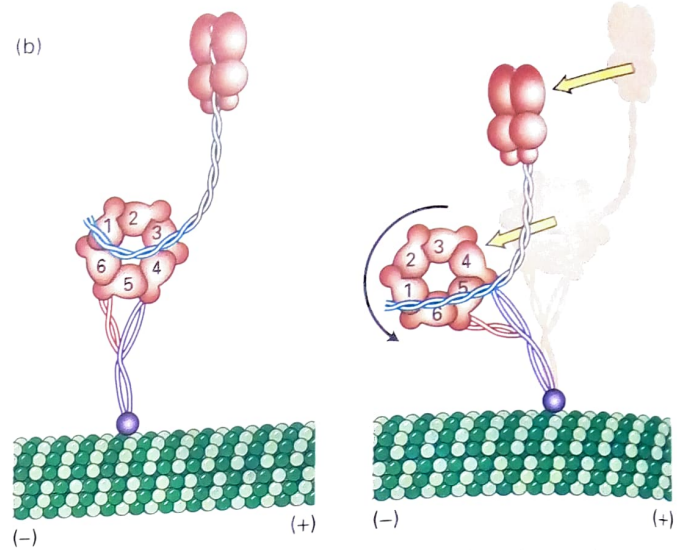


FIGURA 18-24 El golpe impulsor de la dineína. (a) Múltiples imágenes de moléculas de dineína purificadas de una sola cabeza, en sus estados previo al golpe impulsor y posterior a este, registrados mediante un microscopio electrónico y luego promediados. La imagen de la izquierda muestra a la dineína en el estado ADP + P, que representa el estado previo al golpe impulsor y la imagen de la derecha la muestra en un estado posgolpe impulsor libre de



nucleótidos. (b) Comparación de las imágenes combinadas con datos estructurales recientemente adquiridos, que muestran que el mecanismo de generación de fuerzas implica un cambio de orientación de la cabeza con relación al tallo, provocando un movimiento del ligadores que se une al microtúbulo. (Parte [a] modificada de S. A. Burgess y cols., 2003, *Nature* **421**:715; cortesía de S. A. Burgess. Parte [b] basado en la estructura de la dineína de A. P. Carter y cols., *Science* **331**:1159-1165.)

asociada con el extremo (+) de los microtúbulos por medio de la interacción dinactina-EB1, se mantiene unida en una conformación inactiva. Cuando el microtúbulo creciente alcanza la corteza celular, la dineína inactiva y la dinactina encuentran allí un activador. Ahora la dineína se vuelve activa, asociándose con la corteza y traccionando sobre el microtúbulo que la hizo llegar hasta la corteza. Se ha mostrado que este mecanismo ayuda a orientar el huso mitótico en las levaduras y probablemente se aplique a otras situaciones también.

Además de la subunidad p150^{Glued} reguladora de la dinactina, existen otros reguladores de la actividad de la dineína. Un grupo de proteínas, dos de las cuales son LIS1 y NudE, están implicadas en la regulación de la actividad de la dineína. La NudE une el intermediario de dineína y las cadenas ligeras a la LIS1 (Fig. 18-26a). Luego, la LIS1 interactúa con el dominio de ATPasa de la dineína para alargar el golpe impulsor, haciendo que este motor sea más procesivo en condiciones de elevada carga. Defectos de la LIS1 provocan la enfermedad fatal conocida como lisencefalia de Miller-Dieker (a partir de la cual la protei-

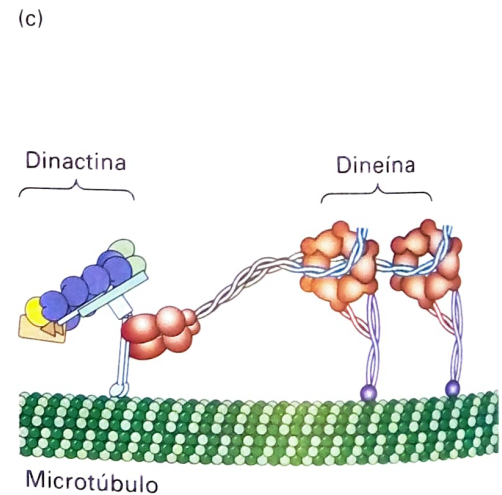
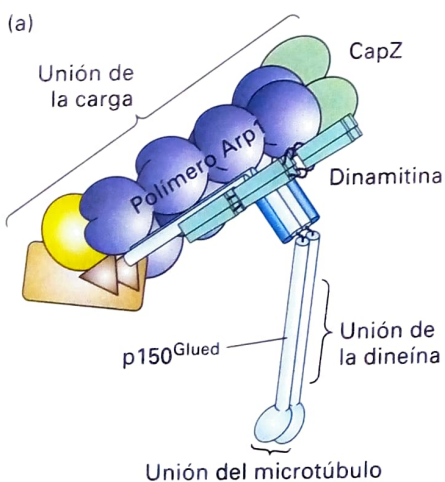
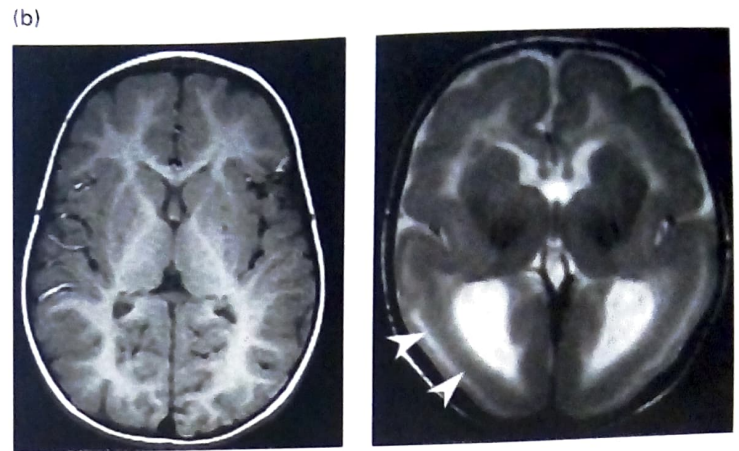
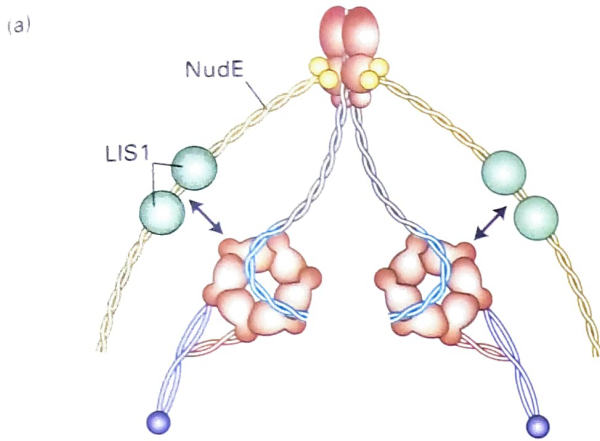


FIGURA 18-25 El complejo de dinactina que vincula la dineína a la carga. (a) Un dominio del complejo une la carga y está construido alrededor de un filamento corto, hecho por aproximadamente seis subunidades de la proteína Arp1 relacionada con la actina encasquetada por CapZ. Otro dominio consiste en la proteína p150^{Glued}, que tiene un sitio de unión al microtúbulo en su extremo distal y también está implicada en unir dineína citoplasmática al complejo. La dinactina mantiene las dos partes del complejo de dinactina

juntas. (b) Fotomicrografía electrónica de una réplica en metal del complejo de dinactina aislado del cerebro. El minifilamento Arp1 (púrpura) y el brazo lateral dinactina/p150^{Glued} (verde) son destacados. (c) Diagrama que muestra el modo en que el complejo de dinactina y el de dineína pueden interactuar entre sí y con un microtúbulo. (Parte [a] modificada de T. A. Schroer, 2004, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**:759. Parte [b] tomada de D. M. Eckley y cols., 1999, *J. Cell Biol.* **147**:307.)



Normal

Paciente LIS1

FIGURA EXPERIMENTAL 18-26 La proteína LIS1 regula la dineína y se requiere para el desarrollo del cerebro. (a) Modelo del modo en que NudE se asocia con la dineína para permitir que la LIS1 interactúe con el dominio de la ATPasa de la cadena pesada de la dineína. (b) Imágenes de resonancia

magnética (IRM) de un cerebro normal y uno de un paciente con lisencefalia de Miller-Dieker, que carece de la función LIS1. Nótese la ausencia de pliegues en el cerebro del paciente. (Parte [a] modificada de M. Kato y W. B. Dobyns, 2003, *Hum. Mol. Genet.* 12 R89-R96.)

na tomó su nombre); lisencefalia significa “cerebro liso”, dado que los pliegues y surcos corticales faltan en los cerebros de los pacientes con esta enfermedad (Fig. 18-26b). Las mutaciones en la LIS1 resultan en defectos tanto en la mitosis como en la migración de las neuronas desde la zona ventricular a la placa cortical en el desarrollo temprano, lo cual da como resultado el fenotipo de cerebro liso y defectos en el desarrollo mental, así como muchas otras anomalías. ■

Las cinesinas y las dineínas cooperan en el transporte de orgánulos a través de la célula

Tanto los miembros de la familia de la dineína como los de la cinesina desempeñan papeles importantes en la organización dependiente de microtúbulos de los orgánulos en las células (Fig. 18-27). Dado que la orientación de los microtúbulos está determinada por el MTOC, la di-

VIDEO: Transporte de las vesículas de secreción a lo largo de los microtúbulos
VIDEO: Transporte de las vesículas de secreción a lo largo de los microtúbulos desde el retículo endoplasmático hasta el Golgi

FIGURA 18-27 Transporte de orgánulos por los motores de los microtúbulos. Las dineínas citoplasmáticas (rojo) median el transporte retrógrado de orgánulos hacia el extremo (-) de los microtúbulos (centro celular); las cinesinas (púrpura) median el transporte anterógrado hacia el extremo (+) (periferia celular). La mayoría de los orgánulos tienen uno o más motores basados en microtúbulos asociados a ellos. Debería notarse que la asociación de los motores con los orgánulos varía según el tipo celular, de modo que algunas de estas asociaciones pueden no existir en todas las células, mientras que otras que no se muestran aquí también existen. ERGIC = compartimiento intermedio del RE al Golgi.

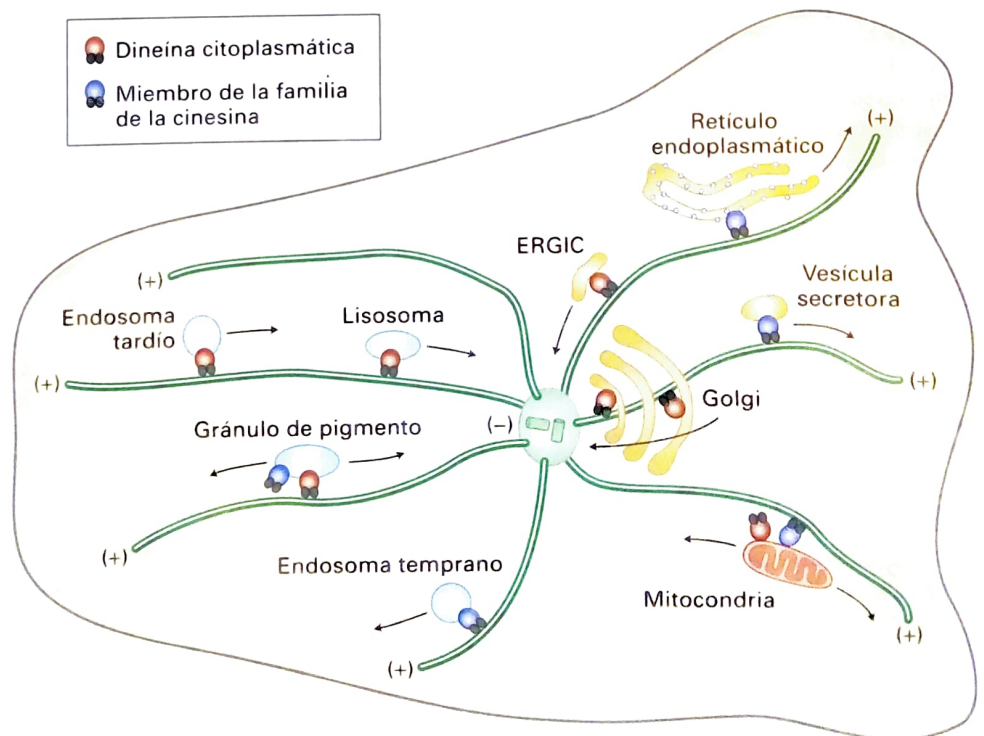
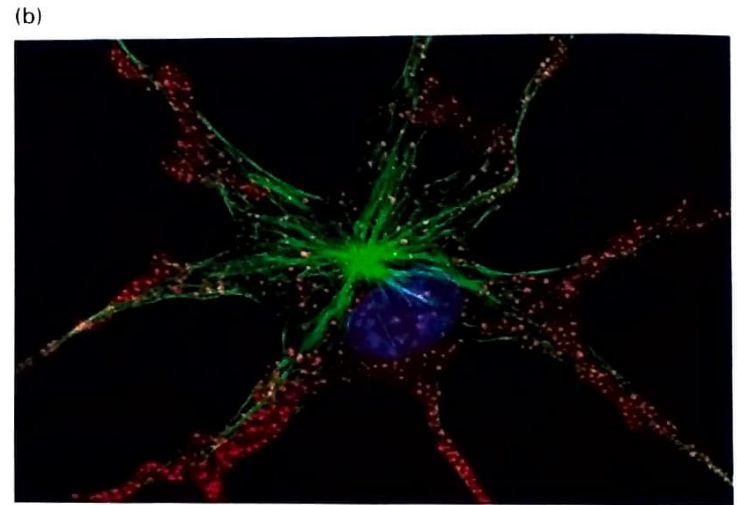
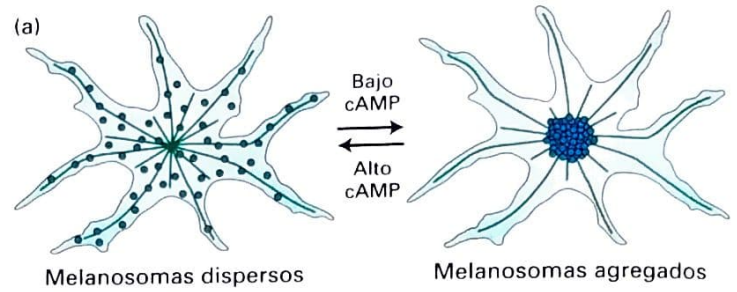


FIGURA 18-28 Movimiento de los gránulos de pigmento en los melanóforos de rana. (a) Diagrama de la reorganización basada en microtúbulos de los melanosomas, de acuerdo con el nivel de cAMP. Los melanosomas se agregan por acción de la dineína citoplasmática y se dispersan por la kinesina-2. (b) Visualización de los melanosomas en el estado disperso, vistas al microscopio de inmunofluorescencia para los microtúbulos (verde), el DNA nuclear (azul) y los gránulos de pigmento (rojo). (Parte [a] modificada de V. Gelland y S. Rogers, <http://www.cellbio.duke.edu/kinesin/Pigment-aggregation.html>. Parte [b] tomada de S. Rogers, www.itq.uiuc.edu/exhibits/gallery/).



rección del transporte (hacia el centro de la célula o desde este) depende de la proteína motora. Por ejemplo, el aparato de Golgi se reúne en la vecindad del centrosoma, donde se encuentran los extremos (–) de los microtúbulos y es llevado allí por la dineína-dinactina. Además, la carga de secreción que surge del retículo endoplasmático es transportada al Golgi por la dineína-dinactina. Por el contrario, el retículo endoplasmático se esparce a través del citoplasma y es transportado allí por la kinesina-1, que se mueve hacia los extremos periféricos (+) de los microtúbulos. Algunos orgánulos de la vía endocítica están asociados con dineína-dinactina; estos incluyen los endosomas y los lisosomas tardíos. Se ha demostrado que las kinesinas transportan mitocondrias, así como carga no membranosa, tal como mRNA específicos que codifican proteínas que deben estar localizadas durante el desarrollo.

Hemos visto de qué modo la kinesina-1 transporta orgánulos de modo anterógrado a lo largo de los axones. ¿Qué le ocurre al motor cuando alcanza el extremo de un axón? La respuesta es que es transportado nuevamente de modo retrógrado sobre orgánulos transportados por la dineína citoplasmática. Así, la kinesina-1 y la dineína pueden asociarse con el mismo orgánulo y debe existir un mecanismo que apague un motor a la vez que activa otro, aunque estos mecanismos aún no se comprenden en su totalidad.

Mucho de lo que sabemos acerca de la regulación del transporte de orgánulos dependiente de microtúbulos proviene de estudios que emplean peces (p. ej., el pez ángel) o los melanóforos de rana. Los melanóforos son células de la piel de los vertebrados que contienen cientos de gránulos de pigmento oscuro llenos de melanina, llamados melanosomas. Los melanóforos tienen o bien los gránulos de pigmento dispersos (en cuyo caso la piel se ve más oscura) o agregados en el centro, lo que hace ver la piel más clara (Fig. 18-28). Estos cambios en el color de la piel, mediados por los neurotransmisores en los peces y regulados por hormonas en las ranas, sirven para camuflar a los peces e incrementar las interacciones sociales de la rana. El movimiento de los gránulos está mediado por cambios en el cAMP intracelular y depende de los microtúbulos. Los estudios que investigan qué motores están involucrados han demostrado que la dispersión de los gránulos de pigmento requiere kinesina-2, mientras que la agregación requiere dineína-dinactina citoplasmática. Las primeras pistas acerca del modo en que podrían estar coordinadas estas actividades, provinieron del hallazgo de que la sobreexpresión de la dinamitina inhibía el transporte de los gránulos en ambos sentidos. Este sorprendente resultado fue explicado cuando se encontró que la dinactina se une no solamente a la dineína citoplasmática, sino también a la kinesina-2 (pudiendo coordinar la actividad de ambos motores).

La asociación de la dineína y la kinesina-2 con el mismo orgánulo no está limitada a los melanosomas; recientemente, se ha su-

gerido que estos motores podrían cooperar para localizar de modo apropiado los endosomas/lisosomas tardíos y las mitocondrias en algunas células. Así, el concepto de que los orgánulos pueden tener diversos motores asociados con ellos no es la excepción, sino un tema emergente.

Las modificaciones de la tubulina distinguen diferentes microtúbulos y sus motores de accesibilidad

La estabilidad y las funciones de diferentes clases de microtúbulos se ven afectadas por modificaciones postraduccionales. Si bien se han detectado múltiples tipos de modificaciones, restringimos nuestro análisis a las que se comprenden mejor –la acetilación de la lisina, la destirosilación, la poliglutamilación y la poliglicilación (Fig. 18-29a)– y sus consecuencias funcionales.

Dos de estas modificaciones se encuentran solo en la tubulina α y están ausentes en la tubulina β . La primera es la **acetilación** del grupo amino ϵ de un residuo específico de lisina de una tubulina α que se encuentra en el interior del microtúbulo; los microtúbulos con esta lisina acetilada se hallan en estructuras estables de microtúbulos tales como los centriolos, los cuerpos basales y los cilios primarios (los cilios primarios se tratan en la Sección 18.5). De hecho, las células incapaces de acetilar tubulina tienen cilios primarios defectuosos, mientras que aquellas en las que la acetilación no puede eliminarse resultan en cilios primarios de estabilidad inusual. La segunda modificación de la tubulina α se relaciona con su tirosina C-terminal. Esta tirosina puede ser

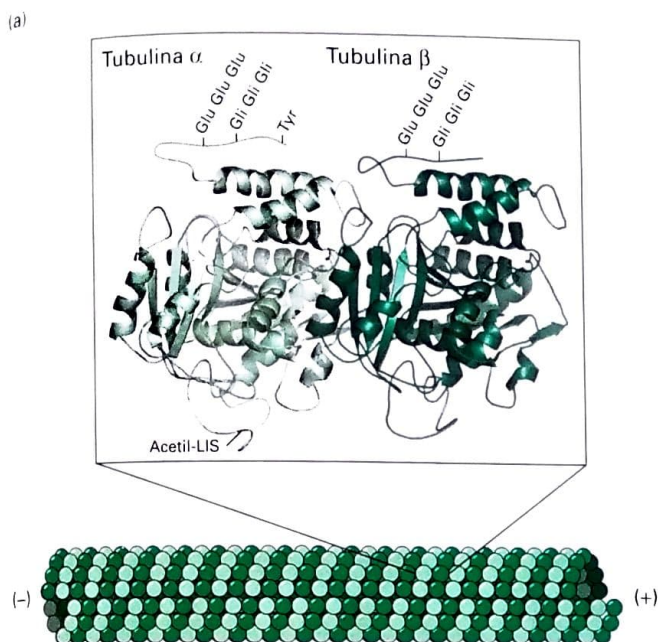
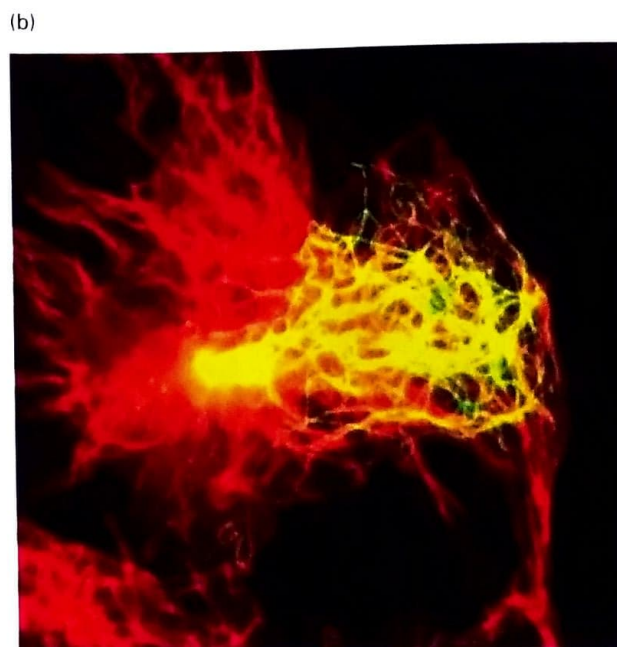


FIGURA EXPERIMENTAL 18-29 Las modificaciones postraduccionales de la tubulina afectan la estabilidad y función de los microtúbulos. (a) Estructura de la tubulina α y β que muestra los sitios de acetilación de la lisina de la superficie interna del microtúbulo, así como la poliglutamilación, poliglicilación y destirosilación sobre la superficie externa. Cabe destacar que se cree que la poliglutamilación y la poliglicilación son mutuamente excluyentes, de modo tal que no ocurrirían normalmente al mismo tiempo. (b) Los microtú-



bulos destirosilados se orientan preferentemente hacia el borde conductor de una célula en movimiento. Una célula que migra hacia la derecha está teñida para microtúbulos totales (rojo) y destirosilados (verde). La imagen resultante muestra los microtúbulos destirosilados enriquecidos hacia el frente de la célula en amarillo, que resulta de una combinación del rojo y el verde [parte (a) modificada de J. W. Hamond, D. Cai y K. J. Verhey, 2008, *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**: 71-76. Parte (b) cortesía de Greg Gunderson].

específicamente eliminada por una carboxipeptidasa que funciona solo cuando se encuentra unida a la superficie de los microtúbulos, donde elimina secuencialmente las tirosinas C-terminales de subunidades de tubulina α . Estos microtúbulos *destirosilados* son más estables, dado que son más resistentes a la despolimerización por parte de las despolimerizadoras de la familia de la cinesina-13. Más aún, en las células en migración estos microtúbulos más estables generalmente se orientan hacia el frente de la célula. Cuando un microtúbulo estable se despolimeriza, la subunidad de tubulina α del dímero $\alpha\beta$ tiene una tirosina C-terminal añadida nuevamente por la acción de una tirosina ligasa que solo actúa sobre la tubulina soluble y el dímero de tubulina $\alpha\beta$ ahora puede ser empleado por un nuevo microtúbulo.

Las regiones C-terminales de las tubulinas α y β son muy ricas en residuos de ácido glutámico y hay enzimas específicas que pueden modificarlos. Nuevamente, estas modificaciones se producen solo después del ensamblaje del microtúbulo. Las colas pueden ser modificadas por *poliglutamilación*, en la que se vincula una cadena de residuos de ácido glutámico a un residuo de glutamato específico, o se someten a *poliglicilación*, donde una cadena de residuos de glicina se añade a un residuo diferente de glutámico. En la actualidad se cree que estas dos modificaciones pueden ser mutuamente excluyentes, de modo tal que si una subunidad de tubulina es modificada por poliglicilación, está protegida de la poliglutamilación y viceversa. Al igual que las otras modificaciones, la poliglutamilación puede incrementar la estabilidad de los microtúbulos.

Estas modificaciones postraduccionales de la tubulina no solo afectan la estabilidad de los microtúbulos, sino que también pueden afectar la capacidad de los motores moleculares de interactuar con estos (Fig. 18-29b). La cinesina-1 se asocia preferencialmente con microtúbulos destirosilados y acetilados, lo cual puede ser importante para reclutar

este motor para el transporte axónico de las neuronas. Como mencionamos en la Figura 18-5e, las neuronas tienen diferentes organizaciones microtubulares en sus dendritas y axones. Los microtúbulos del axón son estabilizados por acetilación y destirosilación, y esto permite que la cinesina-1 se asocie preferencialmente con ellos para el transporte axónico. La poliglutaminación tiene un papel clave en la agitación de los cilios y flagelos que analizaremos en la siguiente sección.

La investigación que esclareció los efectos de las modificaciones postraduccionales de la tubulina sobre la función de los microtúbulos y los motores basados en ellos es muy reciente; es de esperar que futuros estudios revelen múltiples "códigos" que distingan diferentes clases de microtúbulos y los especialicen para funciones específicas.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 18.4

Las cinesinas y las dineínas: proteínas motoras de los microtúbulos

- La cinesina-1 es un motor dependiente de ATP dirigido al extremo (+) que transporta orgánulos unidos a la membrana (véase Fig. 18-19).
- La cinesina-1 consiste en dos cadenas pesadas, cada una de las cuales tiene un dominio motor N-terminal y dos cadenas ligeras, que se asocian con la carga (véase Fig. 18-18).
- La superfamilia de la cinesina incluye motores que funcionan en células en interfase y en mitosis, transportando orgánulos y deslizando microtúbulos antiparalelos uno sobre otro. La superfamilia incluye una clase, la de la cinesina-13, que no es móvil pero desestabiliza los extremos de los microtúbulos (véase Fig. 18-20).

- La kinesina-1 es un motor altamente procesivo porque coordina la hidrólisis de ATP entre sus dos cabezas, de modo tal que una cabeza siempre está firmemente unida a un microtúbulo (véase Fig. 18-21).
- La dineína citoplasmática es un motor dependiente de ATP dirigido al extremo (-) de los microtúbulos que se asocia con el complejo de la dinactina para transportar carga (véase Fig. 18-25).
- Las kinesinas y las dineínas se asocian en muchos orgánulos diferentes para organizar su localización en las células (véase Fig. 18-27).
- Las modificaciones postraduccionales de la tubulina pueden afectar la estabilidad de los microtúbulos y regular su habilidad de interactuar con los motores basados en microtúbulos.

18.5 Cilios y flagelos: estructuras de superficie construidas sobre microtúbulos

Los **cilios** y **flagelos** son prolongaciones unidas a la membrana, relacionadas y basadas en microtúbulos que se proyectan desde muchos protozoarios y la mayoría de las células animales. En la superficie de epitelios específicos se encuentran abundantes cilios móviles, tales como los que tapizan la tráquea, donde se baten en un movimiento ondulado orquestado para mover fluidos. Los flagelos de las células animales, que son más largos que los cilios pero tienen una estructura muy semejante, pueden impulsar una célula (tal como el espermatozoide) a través

(b)

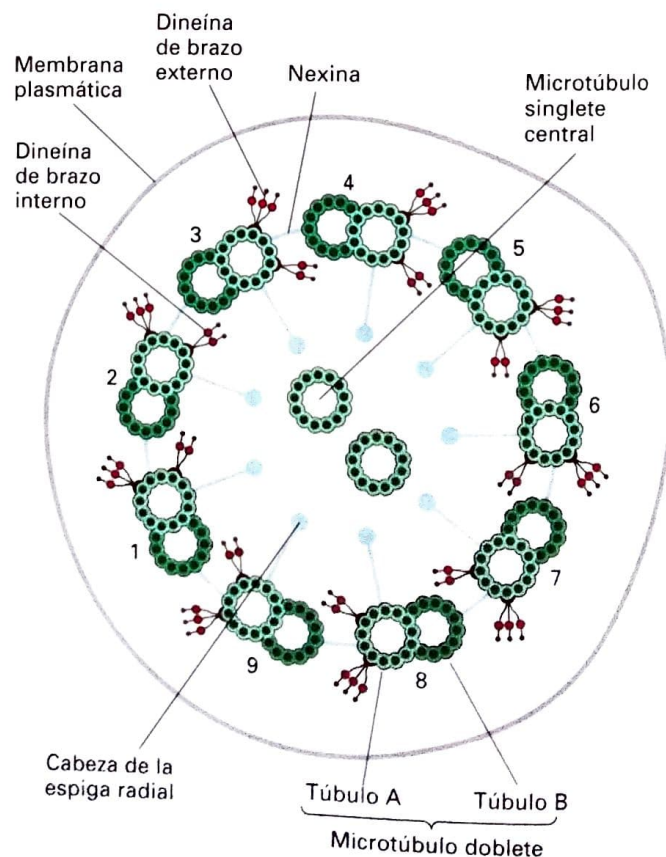
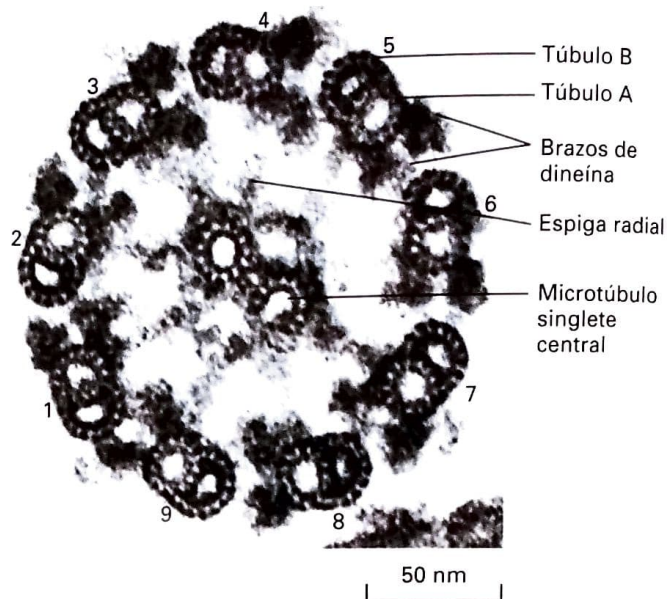
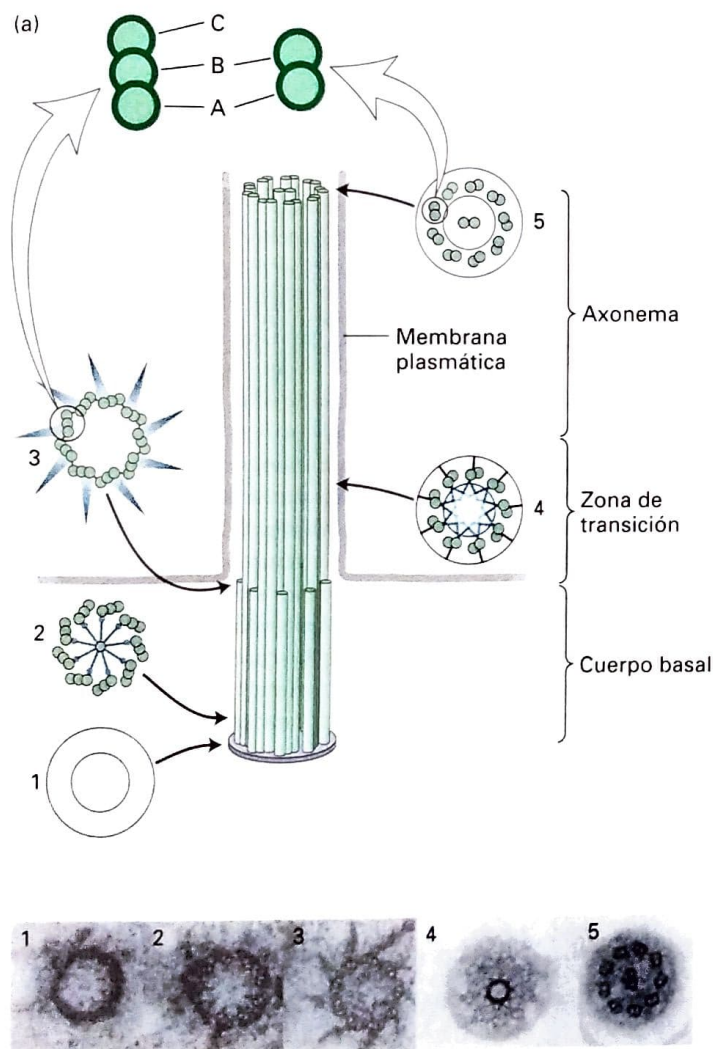


FIGURA 18-30 Organización estructural de cilios y flagelos. (a) Los cilios y flagelos se ensamblan a partir de un cuerpo basal, una estructura construida alrededor de nueve tripletes de microtúbulos vinculados. Continuos con los microtúbulos A y B del cuerpo basal, se encuentran los túbulos A y B del axonema (el núcleo rodeado de membrana de los cilios y flagelos). Entre el cuerpo basal y el axonema, está la zona de transición. El diagrama y los cortes transversales acompañantes del cuerpo basal, la zona de transición y el axonema muestran sus estructuras complejas. (b) Corte fino de un corte transversal de un cilio (sin membrana plasmática) con un diagrama que muestra la identidad de las estructuras. [Parte (a) modificada de S. K. Dutcher, 2001, *Curr Opin Cell Biol* 13:49-54; cortesía de S. Dutcher. Parte (b) cortesía de L. Tilney.]

del medio líquido. Los cilios y los flagelos contienen muchos motores basados en microtúbulos diferentes: las dineínas axonémicas son responsables del movimiento de los flagelos y los cilios, mientras que las kinesinas-2 y la dineína citoplasmática son responsables del ensamblaje y recambio de flagelos y cilios.

Los cilios y flagelos eucariontes contienen largos dobletes de microtúbulos vinculados por puentes de dineína

Los cilios y los flagelos tienen longitudes que van desde unos pocos micrómetros hasta más de 2 mm en algunos flagelos de espermatozoides de insectos. Poseen un haz de microtúbulos centrales, denominado **axonema**, que consiste en la configuración llamada 9 + 2 de nueve dobletes de microtúbulos los cuales rodean un singlete central, ultraestructu-

ralmente distinto de microtúbulos (Fig. 18-30a, b). Cada uno de los nueve dobletes externos contiene un microtúbulo A con 13 protofilamentos y un microtúbulo B con 10 protofilamentos (véase Fig. 18-4). Todos los microtúbulos de los cilios y flagelos tienen la misma polaridad: los extremos (+) están localizados en la punta distal. En su punto de unión en la célula, el axonema se conecta con el **cuerpo basal**, una estructura complicada que contiene nueve tripletes de microtúbulos (véase Fig. 18-30a).

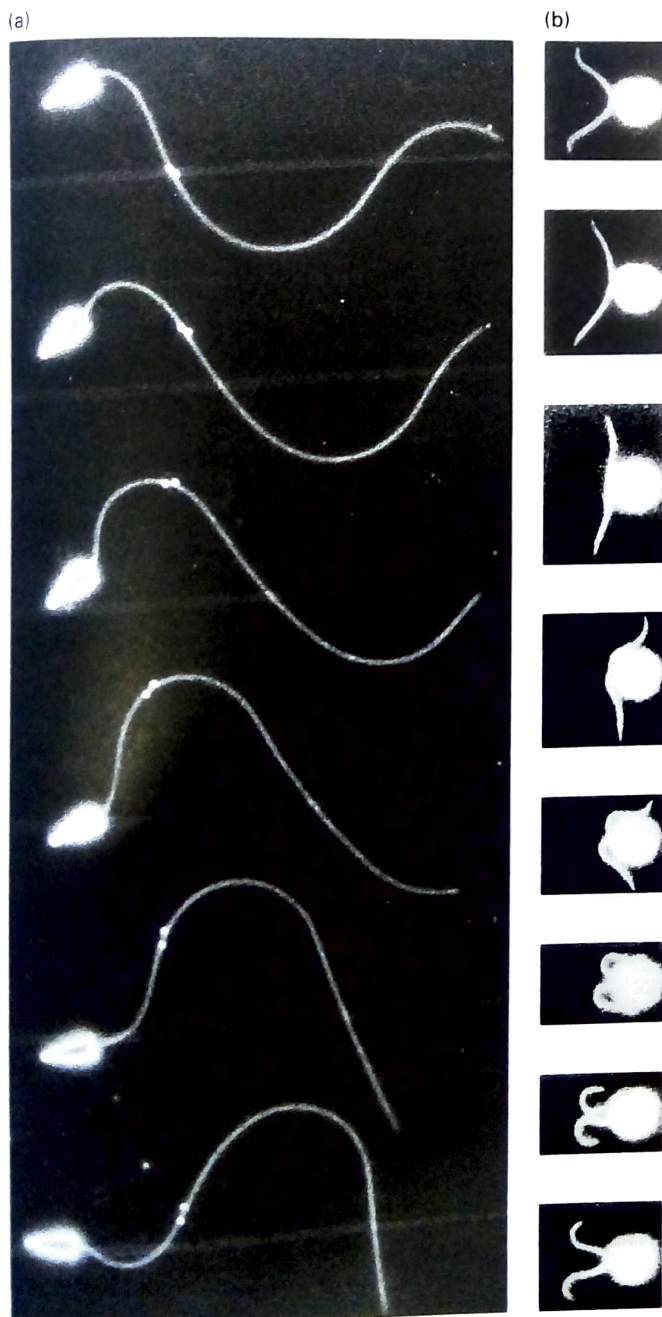
La estructura del axonema se mantiene unida por tres conjuntos de entrecruzamientos proteicos (véase Fig. 18-30b). Los dos microtúbulos del singlete central están conectados entre sí por puentes periódicos, al igual que los peldaños de una escalera. Un segundo conjunto de vinculadores, compuestos por la proteína *nexina*, une los microtúbulos de los dobletes externos adyacentes. Las *espigas radiales* se proyectan desde cada túbulo A de los dobletes externos hacia el par central.

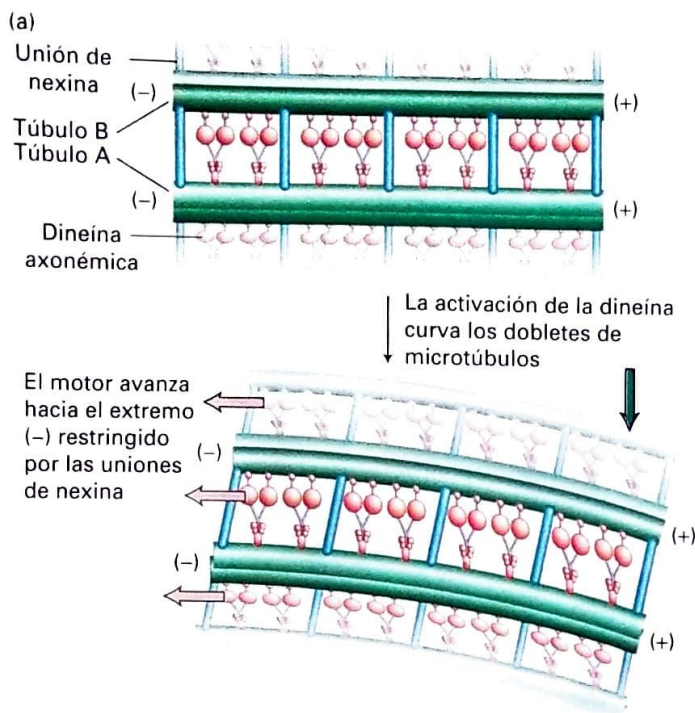
La proteína motora principal presente en cilios y flagelos es la *dineína axonémica*, una proteína grande, de múltiples subunidades, relacionada con la dineína citoplasmática. Hay dos filas de motores de dineína unidas periódicamente a lo largo de cada uno de los túbulo A de los microtúbulos de los dobletes externos; estos se denominan como dineína del *brazo interno* y del *brazo externo* (véase Fig. 18-30b). Estos motores de dineína que interactúan con el túbulo B del doblete adyacente son los que mantienen la capacidad de curvarse de los cilios y los flagelos.

El batimiento de los cilios y flagelos se produce por el deslizamiento controlado de los microtúbulos de los dobletes externos

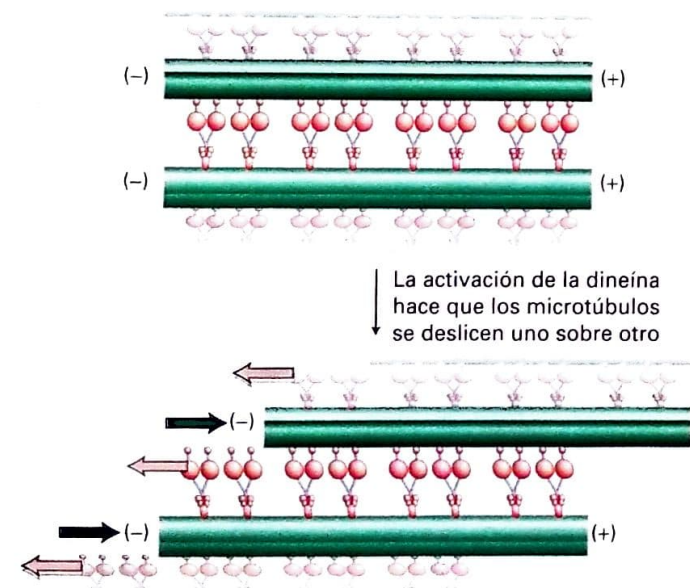
Los cilios y los flagelos son estructuras móviles porque la activación de los motores de dineína axonémicos induce su curvatura. Un examen de cerca de esta movilidad empleando video microscopía revela que la curvatura comienza en la base del cilio y del flagelo, propagándose luego a lo largo de la estructura (Fig. 18-31). Una pista acerca de cómo ocurre esto provino de estudios de axonemas aislados. En los experimentos clásicos, los axonemas se trataron suavemente con una proteasa que escinde exactamente en la zona de la unión de la nexina. Cuando se añadió ATP a los axonemas tratados, los microtúbulos del doblete se deslizaban uno sobre otro, a medida que la dineína (unida al túbulo A de un doblete) "caminaba" hacia abajo en el túbulo B del doblete adyacente (Fig. 18-32b, c). En un axonema con uniones de nexina intactas, la acción de la dineína induce la curvatura flagelar en tanto los dobletes de microtúbulos se conectan unos con otros (Fig. 18-32a).

FIGURA EXPERIMENTAL 18-31 Video microscopía que muestra los movimientos flagelares que impulsan los espermatozoides y las *Chlamydomonas* hacia adelante. En ambos casos, las células se están moviendo hacia la izquierda. (a) En el flagelo típico de espermatozoide, sucesivas olas de curvatura originadas en la base se propagan hacia el extremo; estas ondas empujan contra el agua e impulsan la célula hacia adelante. Capturada en esta secuencia de exposición múltiple, una onda en la base del espermatozoide del primer cuadro (arriba) se ha movido en posición distal, a mitad de camino a lo largo del flagelo al llegar al último cuadro. Un par de cuentas de oro del flagelo se ven deslizarse a medida que la curvatura se mueve a través de su región. (b) El batimiento de los dos flagelos de las *Chlamydomonas* ocurre en dos etapas, llamadas *impulso efectivo* (tres cuadros superiores) e *impulso de recuperación* (cuadros restantes). El impulso efectivo empuja el organismo a través del agua. Durante el impulso de recuperación, una onda de curvatura diferente se mueve hacia afuera desde la base de los flagelos, empujándolos a lo largo de la superficie de la célula hasta que alcancen la posición para iniciar otro impulso efectivo. La agitación ocurre comúnmente de 5-10 veces por segundo. (Parte [a] tomada de C. Brokaw, 1991, *J. Cell Biol.* 114(6); cover photograph, cortesía de C. Brokaw. Parte [b] cortesía de S. Goldstein.)





(b) Las uniones de nexina son removidas por proteasas



(c)

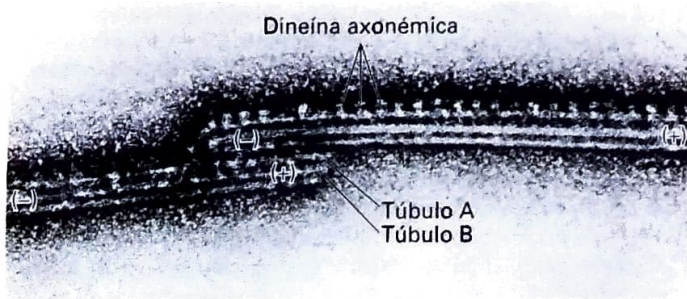


FIGURA 18-32 La curvatura de los cilios y los flagelos está mediada por la dineína axonémica. (a) La dineína axonémica unida a un túbulo A de un doblete externo tracciona sobre el túbulo B del túbulo adyacente, tratando de moverse al extremo (-). Dado que los túbulos adyacentes están inclinados por la nexina, la fuerza generada por la dineína curva al cilio o al flagelo. (b) Evidencia experimental para el modelo de (a). Cuando las uniones de nexinas son escindidas con una proteasa y se añade ATP para inducir la actividad de la dineína, los dobletes de microtúbulos se deslizan uno sobre otro. (c) Fotomicrografía electrónica de dos dobletes de microtúbulos en un axonema tratado con proteasas, incubado con ATP. En ausencia de proteínas de entrecruzamiento, los microtúbulos del doblete se deslizan excesivamente. Pueden verse brazos de dineína proyectándose desde los túbulo A e interactuando con los túbulo B del doblete de microtúbulos izquierdo [parte (a) cortesía de Wallace Marshall, parte (c) cortesía de P. Satir]

Aún no se comprende por completo el modo en que los subconjuntos específicos de dineína se activan y de qué modo se propaga una onda de activación a lo largo del axonema, pero podrían participar en esto las modificaciones postraduccionales de la tubulina. Recuerdese la Sección 18.4 que las modificaciones postraduccionales de la tubulina pueden afectar las interacciones entre los microtúbulos y las proteínas motoras. Los túbulo B de los dobletes del axonema externo con frecuencia están poliglutamilados y esta modificación afecta intensamente la interacción de la dineína del brazo interno con el túbulo B. Dado que los motores de dineína del brazo interno afectan principalmente la forma de la onda del batimiento de los cilios, este aspecto de la función de ellos se encuentra comprometido en mutantes incapaces de ser poliglutamilados.

El transporte intraflagelar mueve el material hacia arriba y hacia abajo en los cilios y flagelos

Si bien la dineína axonémica está implicada en la curvatura de los flagelos, recientemente se ha observado otro tipo de movilidad. El examen cuidadoso de los flagelos en las algas verdes biflageladas *Chlamydomonas reinhardtii*, mostró la presencia de partículas citoplasmáticas en movimiento a una velocidad constante de $\sim 2,5 \mu\text{m/s}$ hacia el extremo del flagelo (movimiento anterógrado) y el de otras partículas, que se movían aproximadamente a $\sim 4 \mu\text{m/s}$ desde el extremo hacia la base (movimiento retrógrado). Este transporte se conoce como *transporte intraflagelar (TIF)* y ocurre tanto en los cilios como en los flagelos. Las microscopías óptica y electrónica demostraron que las partículas se mueven entre los microtúbulos del doblete externo y la membrana plasmática (Fig. 18-33). El análisis de mutantes de las algas demostró que el movimiento anterógrado es impulsado por la kinesina-2 y el retrógrado por la dineína citoplasmática.

Las partículas que en el TIF son transportadas de modo anterógrado y retrógrado en los flagelos de las *Chlamydomonas* se han aislado y se ha determinado su composición. Consisten en dos complejos proteicos distintos, llamados complejos TIF A y TIF B. Al analizar los fenotipos de las células que tienen mutaciones que afectan los complejos A o B, se ha encontrado que el complejo B es necesario para el transporte TIF anterógrado, mientras que el complejo A es importante para el transporte TIF retrógrado. A pesar de esta segregación de función, ambos complejos son transportados en ambas direcciones. Todos los componentes de las partículas TIF tienen su homólogo en organismos que contengan cilios tales como los nematodos, las moscas de la fruta, los ratones y los seres humanos, pero estas partículas no existen en los genomas de las levaduras y de las plantas que carecen de cilios, sugiriendo que son específicas para TIF.

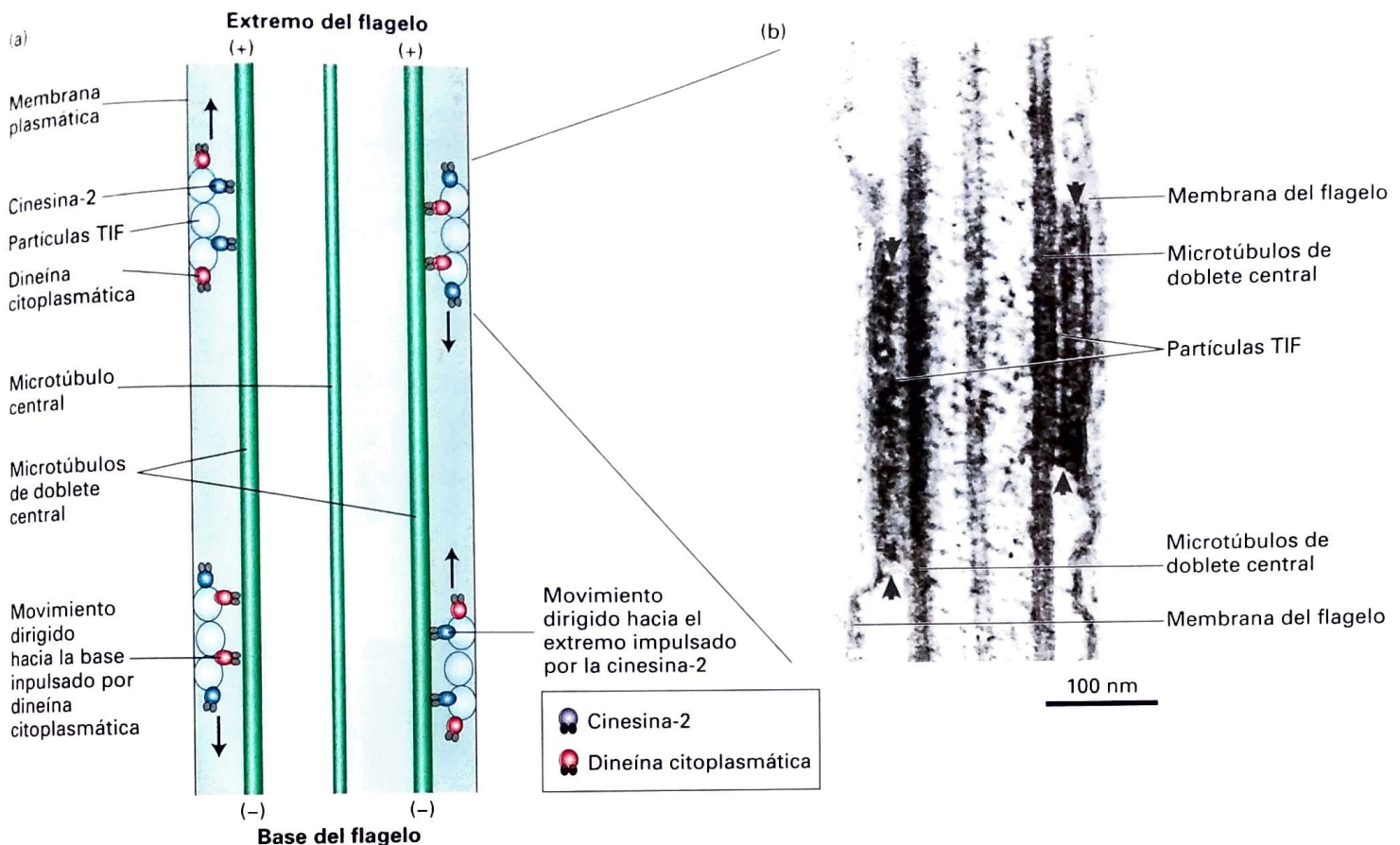


FIGURA 18-33 Transporte intraflagelar. (a) Las partículas son transportadas entre la membrana plasmática y los microtúbulos del doblete externo. El transporte de partículas al extremo depende de la cinesina-2, mientras que el transporte hacia la base está mediado por la dineína citoplasmática. (b) Una

fotomicrografía electrónica de corte fino muestra las partículas TIF en un corte de un flagelo de *Chlamydomonas*. (Parte [b] tomada de J.L. Rosenbaum y G.B. Whitman, 2003, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 3:813-825.)

¿Cuál es la función del TIF? Dado que todos los microtúbulos tienen sus extremos crecientes (+) en la punta del flagelo, este es el sitio en el cual se añaden nuevas subunidades de tubulina y proteínas estructurales de los flagelos. Más aún, incluso en las células de los flagelos de longitud uniforme, los microtúbulos se recambian y el ensamblaje y el desensamblaje ocurren en las puntas de los flagelos. En las células que carecen de cinesina-2 los flagelos se encogen, lo cual sugiere que el TIF transporta nuevo material al extremo para el crecimiento. Dado que el TIF es un proceso que ocurre en forma continua, ¿qué ocurre a las moléculas de cinesina-2 cuando llegan al extremo, y desde qué lugar provienen los motores de dineína que transportan las partículas en forma retrógrada? Notablemente, la dineína es llevada al extremo como una carga en partículas que se mueven de modo anterógrado en impulsadas por la cinesina-2 y luego la cinesina-2 se transforma en una carga cuando las partículas son transportadas nuevamente hacia la base por la dineína.

Los cilios primarios son orgánulos sensoriales de las células en interfase

Muchas células de los vertebrados contienen un cilio solitario, no móvil, conocido como *cilio primario*. El cilio primario es una estructura estable, mucho más resistente a fármacos como la colchicina que desensambla a la mayoría de los microtúbulos; después del tratamiento

con colchicina, los únicos microtúbulos remanentes son los que se encuentran en los centriolos y en el cilio primario (véase Fig. 18-12). Más aún, la tubulina del cilio primario está muy acetilada, de modo tal que emplear anticuerpos que reconozcan específicamente la tubulina α acetilada permite identificar con rapidez al cilio primario individual de cada célula en interfase (Fig. 18-34a).

Las células diferenciadas en forma terminal y las células en división en interfase contienen cilios primarios y, en el último caso, la presencia del cilio está vinculada con el ciclo de duplicación de los centriolos (que se trata en la Sección 18.6), situación en la que el centriolo “más viejo” funciona como el cuerpo basal para el ensamblaje del cilio (Fig. 18-34b).

El cilio primario es una estructura no móvil porque carece del par central de microtúbulos y de los brazos laterales de la dineína (Fig. 18-34c). Trabajos recientes han llevado al descubrimiento de que el cilio primario es, en realidad, un orgánulo sensorial que actúa como la “antena” de la célula, detectando señales extracelulares. Por ejemplo, el sentido del olfato se debe a la unión de los odorantes a receptores localizados en el cilio primario de las neuronas sensoriales olfativas de la nariz (véase el Cap. 22). En otro ejemplo, los conos y los bastones del ojo tienen un cilio primario con un extremo muy expandido para acomodar las proteínas implicadas en la fotorrecepción. La proteína retiniana opsina se mueve a lo largo del cilio a aproximadamente 2 000 moléculas por minuto, transportada por la cinesina-2 como parte del sistema TIF. Defectos en este sistema de transporte causan degeneración de la retina.

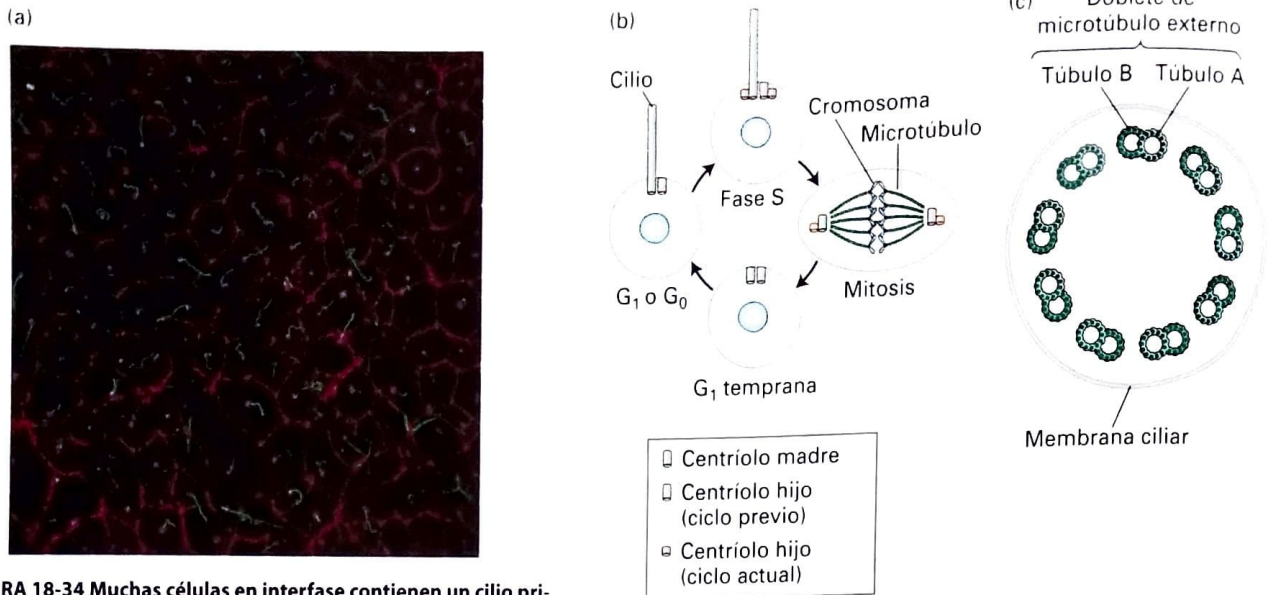


FIGURA 18-34 Muchas células en interfase contienen un cilio primario no móvil. (a) Fotomicrografía de fluorescencia de células epiteliales de ratón teñidas con anticuerpos contra la tubulina α acetilada (verde), que marca los cilios primarios; contra pericentrina (magenta), que tiñe el centrosoma; y contra ZO-1 (rojo), que marca las uniones estrechas que rodean a cada una de las células. (b) Diagrama que ilustra el modo en que la presencia del cilio primario está ligado a los centriolos, uno de los cuales sirve como cuerpo basal. (c) Diagrama que muestra un corte a través de un cilio primario no móvil, exhibiendo la carencia del par de microtúbulos centrales y los brazos de dineína típicos de los cilios y los flagelos móviles. (d) Fotomicrografías electrónicas de barrido de células epiteliales de un túbulo colector de riñón de un ratón silvestre (izquierda) y un ratón mutante defectuoso en un componente de las partículas TIF. Las flechas apuntan hacia los cilios primarios, que son cortos en el ratón mutante. (Parte [a] cortesía de Wallace Marshall. Partes [b] y [c] modificadas de H. Ishikawa y W. F. Marshall, 2011, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **12**:222-234. Parte [d] tomada de G. Pazour y cols., 2000, *J. Cell Biol.* **151**:709-719.)

Los defectos en los cilios primarios son la base de muchas enfermedades

 Durante muchos años, se ignoró la existencia y la función del cilio primario. Sin embargo, esta situación ha cambiado notablemente en la última década, período durante el cual se apreció que los defectos en el transporte intraflagelar dan como resultado la pérdida de los cilios primarios en los ratones (Fig. 18-34d) y se han seguido enfermedades de defectos en los cilios primarios y el TIF. Una de las primeras pistas provino del descubrimiento de que la pérdida en los mamíferos de una proteína homóloga del TIF de una *Chlamydomonas*, resulta en defectos en el cilio primario que provocan la enfermedad renal poliquística dominante autosómica (ADPKD). Se cree que los cilios primarios de las células epiteliales del túbulo colector renal actúan como sensores mecanoquímicos que miden la velocidad del flujo de líquido por el grado en el cual este provoca su curvatura. En otro ejemplo, los pacientes con el síndrome de Bardet-Biedl tienen degeneración retiniana, polidactilia (del griego “muchos dedos”) y obesidad; el síndrome puede ser provocado por mutaciones en cualquiera de los 14 genes y ha sido rastreado hasta defectos en el funcionamiento de los cilios primarios. Muchos de estos genes codifican subunidades del BBSoma, un complejo octomérico que forma una cubierta con elementos estructurales en común con las cubiertas COPI, COPII y de clatrina, y que transporta proteínas de la membrana a los cilios. Si bien los defectos en

muchos de los componentes del BBSoma no afectan la estructura del cilio primario en sí, dan como resultado una pérdida de receptores específicos de la membrana que son entregados al cilio primario por la interacción del BBSoma con el aparato TIF. Por ejemplo, la polidactilia que se ve en los pacientes con síndrome de Bardet-Biedl se debe a una pérdida de la señalización Hedgehog localizada (véase Cap. 16) en el cilio primario, necesaria para que se formen adecuadamente los patrones durante la embriogénesis. ■

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 18.5

Cilios y flagelos: las estructuras de superficie construidas sobre microtúbulos

- Los cilios móviles y los flagelos son estructuras de la superficie celular basadas en microtúbulos, con un par central característico de microtúbulos en singlete y nueve conjuntos de microtúbulos en doblete externos (véase Fig. 18-30).
- Todos los cilios y flagelos crecen a partir de los cuerpos basales, estructuras con nueve conjuntos de microtúbulos en tripletes externos y muy relacionados con los centriolos.

- Las dineínas axonémicas unidas al túbulo A sobre un microtúbulo en doblete, interactúan con el túbulo B de otro para curvar los cilios y los flagelos.

- Los cilios y los flagelos tienen un mecanismo, el transporte intraflagelar (TIF), para llevar materiales a sus extremos por acción de la kinesina-2 y desde el extremo nuevamente a la base por acción de la dineína citoplasmática. Este transporte regula la función y longitud de los cilios y los flagelos.

- Muchas células tienen sobre su superficie un cilio primario único no móvil, que carece del par central normal de microtúbulos y de los brazos de dineína laterales de los cilios móviles. El cilio primario funciona como un orgánulo sensorial, en el que los receptores para las señales extracelulares se localizan en su membrana plasmática. Debido a su función sensorial, muchas enfermedades resultan de defectos en la localización del receptor o en la estructura del cilio primario en sí.

18.6 Mitosis

De todos los eventos que permiten la existencia y perpetuación de la vida, quizá el más crítico es la capacidad de la célula de duplicarse con precisión y luego segregar sus cromosomas en cada división celular en forma confiable. Durante el **ciclo celular**, un proceso estrechamente regulado que se analizará en el Capítulo 19, las células duplican sus cromosomas con precisión una vez durante un período conocido como fase S (por fase de síntesis del DNA). Cuando se han duplicado los cromosomas individuales, estos se mantienen juntos por proteínas llamadas *cohesinas*. Las células luego atraviesan un período llamado G_2 (que toma su nombre de Gap, o intervalo 2) antes de entrar en **mitosis**, el proceso por el cual los cromosomas duplicados se segregan a las células hijas. Este proceso debe ser muy preciso —la pérdida o ganancia de un cromosoma puede ser letal para la célula (en cuyo caso con frecuencia no se detecta) o generar complicaciones graves para esta—. Se estima que una levadura solo detenta una segregación errónea de sus 16 cromosomas cada 100 000 divisiones celulares, lo cual hace de la mitosis uno de los procesos más precisos de la biología. Para lograr esta precisión, es esencial que el proceso esté muy regulado, de modo tal que proceda en una serie de pasos ordenados y que no se cometan errores. El momento y los mecanismos que aseguran la fidelidad del proceso están estrechamente controlados por circuitos del ciclo celular que analizamos en detalle en el Capítulo 19. Aquí, limitaremos el análisis de este circuito en tanto se aplique a los microtúbulos y a la mecánica de la mitosis.

Los centrosomas se duplican tempranamente en el ciclo celular en preparación para la mitosis

Para separar los cromosomas durante la mitosis, las células duplican sus MTOC (sus centrosomas) de modo coordinado con la duplicación de sus cromosomas en la fase S (Fig. 18-35). Los centrosomas duplicados se separan y se transforman en los dos polos del huso mitótico. El número de centrosomas en las células animales tumorales tienen más de dos centrosomas, lo que contribuye a la inestabilidad genética, dan-

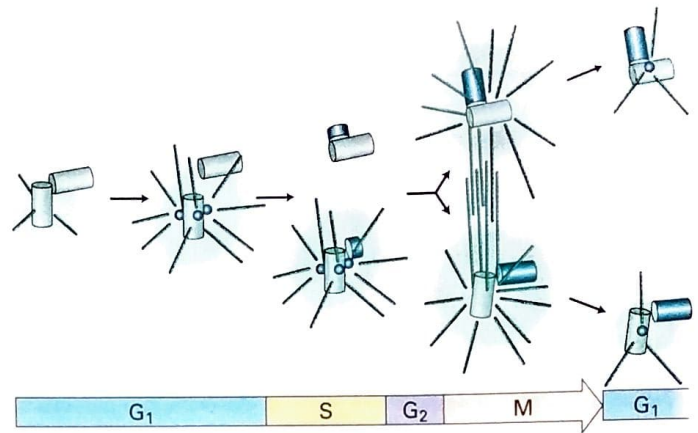


FIGURA 18-35 Relación de la duplicación de los centrosomas con el ciclo celular. Después de que el par de centriolos parentales (verde) se separa ligeramente, un centriolo de la célula hija (azul) brota de cada uno y se alarga. Hacia G_2 , el crecimiento de los centriolos hijos está completo, pero los dos pares permanecen dentro del mismo complejo centrosómico. Tempranamente en la mitosis, el centrosoma se divide y cada par de centriolos migra a lados opuestos del núcleo. La cantidad de material pericentriolar y la actividad para nuclear el ensamblaje de los microtúbulos aumentan en gran medida en la mitosis. En ella, estos MTOC son llamados polos del huso.

do como resultado la segregación inadecuada de cromosomas y así, la **aneuploidía** (números desiguales de cromosomas). Las razones por las cuales la aneuploidía da como resultado el cáncer se analizarán con detalle en el Capítulo 24.

A medida que las células entran en mitosis, la actividad de los dos MTOC (su capacidad para nuclear microtúbulos) se incrementa mucho, a medida que acumulan más material pericentriolar. Dado que los microtúbulos que radian desde estos dos MTOC ahora parecen estrellas, con frecuencia se los llama ásteres mitóticos.

La mitosis puede dividirse en seis fases

La mitosis se ha dividido en varias etapas para facilitar su descripción (Fig. 18-36a), pero en realidad es un proceso continuo. Aquí revisamos los principales eventos de cada etapa.

La primera etapa de la mitosis, llamada **profase**, está caracterizada por un número de eventos coordinados y notables. En primer lugar, la disposición de los microtúbulos en la interfase es reemplazada a medida que los centrosomas duplicados se vuelven más activos en la nucleación de microtúbulos. Esto proporciona dos sitios de ensamblaje para los microtúbulos dinámicos que forman los **ásteres** mitóticos. Adicionalmente, la dinámica de los microtúbulos en crecimiento se incrementa debido a cambios en las actividades de los +TIP en sus extremos (+). Los dos ásteres se mueven luego hacia lados opuestos del núcleo por acción de los motores bipolares de kinesina-5 (véase Fig. 18-20), los cuales empujan a los microtúbulos que unen a los ásteres, separándolos. Los centrosomas separados se transformarán en los dos polos del **huso mitótico**, la estructura microtubular que separa los cromosomas. En segundo término, la síntesis proteica pasa de ser dependiente de CAP a ser independiente de CAP (véase Cap. 4, Fig. 4-24) y el orden interno de los sistemas de membrana, que normalmente depende de la disposición de los microtúbulos en la interfase, se desensambla. Adicionalmente se detienen la endocitosis y la exocitosis y los microfilamentos

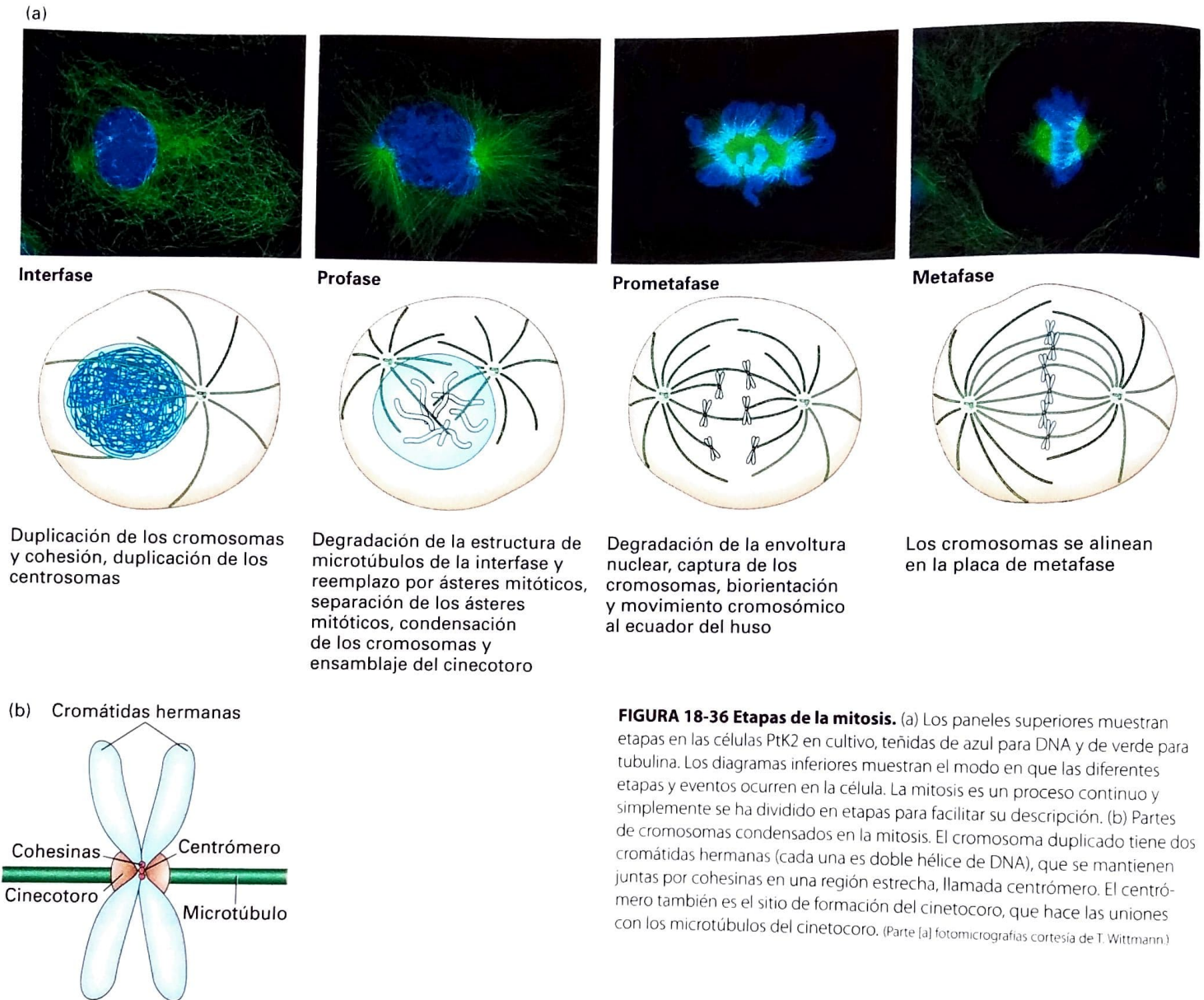


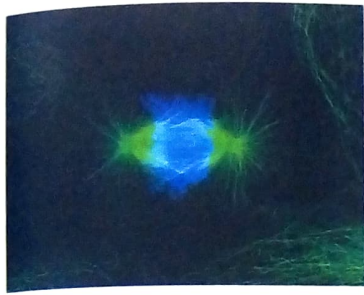
FIGURA 18-36 Etapas de la mitosis. (a) Los paneles superiores muestran etapas en las células PtK2 en cultivo, teñidas de azul para DNA y de verde para tubulina. Los diagramas inferiores muestran el modo en que las diferentes etapas y eventos ocurren en la célula. La mitosis es un proceso continuo y simplemente se ha dividido en etapas para facilitar su descripción. (b) Partes de cromosomas condensados en la mitosis. El cromosoma duplicado tiene dos cromátidas hermanas (cada una es doble hélice de DNA), que se mantienen juntas por cohesinas en una región estrecha, llamada centrómero. El centrómero también es el sitio de formación del cinetocoro, que hace las uniones con los microtúbulos del cinetocoro. (Parte [a] fotomicrografías cortesía de T. Wittmann.)

generalmente se redistribuyen para dar lugar a una célula redondeada. En el núcleo, el nucléolo se degrada y los cromosomas comienzan a condensarse. Las cohesinas que mantienen juntos a cada par de cromosomas duplicados (o **cromátidas hermanas** tal como se las llama en esta etapa) se degradan, excepto en la región centromérica, donde ambas cromátidas hermanas permanecen unidas por cohesinas intactas (Fig. 18-36b). También durante la profase se ensamblan estructuras especializadas llamadas **cinetocoros**, que se transformarán en sitios de unión de microtúbulos y se unirán en la región centromérica de cada cromátida hermana. Como analizaremos en más detalle en el Capítulo 19, todos estos eventos están coordinados por un rápido incremento en la actividad del complejo ciclina mitótica-CDK, que es una cinasa que fosforila múltiples proteínas.

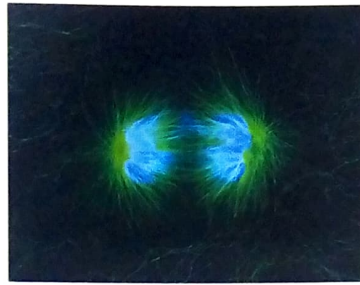
La siguiente etapa de la mitosis, la **prometáfase**, es iniciada por la ruptura de la envoltura nuclear y de los poros nucleares, así como por

el desensamble de la lámina nuclear formada por lámina. Los microtúbulos ensamblados desde los polos del huso buscan y “capturan” pares de cromosomas, asociándose con sus cinetocoros. Cada cromátida tiene un cinetocoro, de modo tal que un par de cromátidas hermanas tienen dos cinetocoros, cada uno de los cuales se une a polos opuestos del huso durante la prometáfase en un proceso crítico que analizaremos con detalle más adelante. Cuando las cromátidas hermanas están unidas a ambos polos del huso, se dice que están **biorientadas**. Luego se alinean equidistantes entre los dos polos del huso en un proceso que se conoce como **congregación**. La prometáfase continúa hasta que todos los cromosomas se han congregado, momento en el cual las células entran a la siguiente etapa, la **metafase**, definida como el estadio en el cual todos los cromosomas se alinean en la **placa de metafase**.

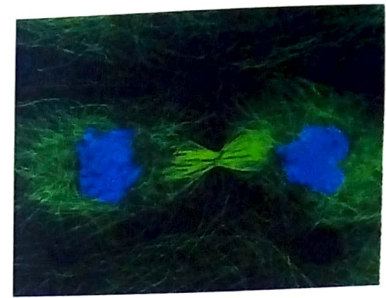
La siguiente etapa, la **anafase**, es inducida por la activación del complejo promotor de la anafase/ciclosoma (CPA/C) (analizado en el



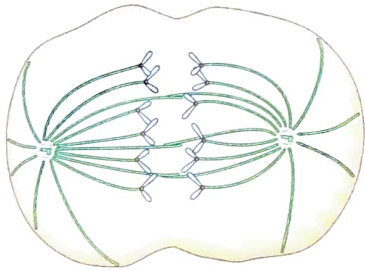
Anafase



Telofase

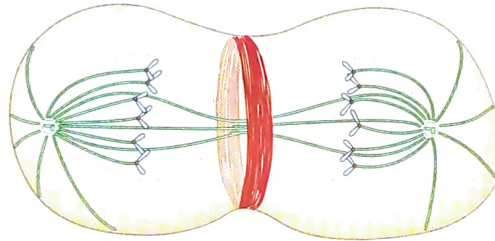


Citocinesis

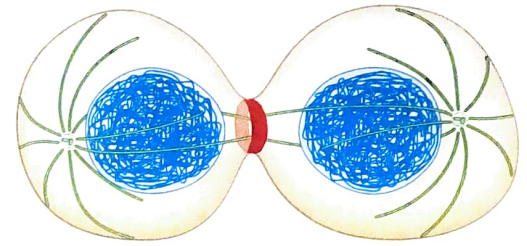


El CPA/C activado y las cohesinas se degradan.

Anafase A: movimiento de los cromosomas hacia los polos.
Anafase B: separación de los polos del huso.



Reensamblaje de la envoltura nuclear y ensamblaje del anillo contráctil



Nueva formación de la disposición de microtúbulos en interfase. El anillo contráctil forma un pliegue de separación

Cap. 19). La actividad del CPA/C (a través de varios pasos intermedios) finalmente conduce a la destrucción de las cohesinas que mantenían juntas a las cromátidas hermanas, de modo tal que ahora cada cromosoma separado puede ser traccionado a su polo respectivo por los microtúbulos unidos a su cinetocoro. Este movimiento se conoce como *anafase A*. También ocurre un movimiento separado y diferente: el movimiento de los polos del huso para alejarse uno del otro, en un proceso conocido como *anafase B*. Ahora que los cromosomas se han separado la célula entra en **telofase**, momento en que se vuelve a formar la envoltura nuclear, los cromosomas se descondensan y la célula es separada en dos células hijas por el anillo contráctil durante la **citocinesis**.

El huso mitótico contiene tres clases de microtúbulos

Antes de analizar los mecanismos implicados en el notable proceso de la mitosis, es importante comprender las tres clases distintas de microtúbulos que emanan de los polos del huso, que es donde todos sus extremos (–) están insertos. La primera clase son los *microtúbulos astrales*, que se extienden desde los polos del huso hasta la corteza de la célula (Fig. 18-37). Al interactuar con la corteza, los microtúbulos astrales llevan a cabo su función crítica de orientar el huso con el eje de la división celular. La segunda clase, los *microtúbulos de cinetocoro*, funcionan por un mecanismo de búsqueda y captura para vincular los polos del huso a los cinetocoros de los pares de cromátidas hermanas. Durante la anafase A, los microtúbulos de cinetocoro transportan los cromosomas recién separados a sus respectivos polos. El tercer conjunto de microtúbulos, denominados *microtúbulos polares*, se extienden

desde cada cuerpo de polo del huso hacia el opuesto e interactúan juntos en modo antiparalelo. Dichos microtúbulos son responsables inicialmente de empujar los centrosomas duplicados, separándolos durante la profase; seguidamente mantienen la estructura del huso y finalmente separan los polos del huso en la anafase B.

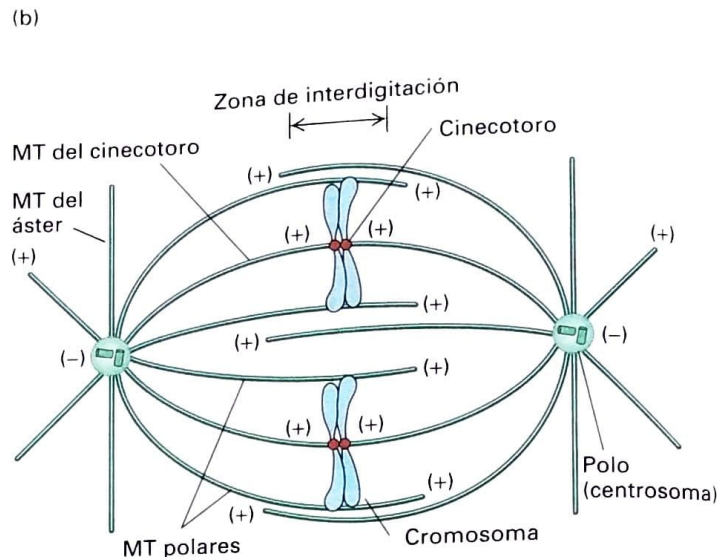
Nótese que todos los microtúbulos en cada mitad del huso simétricamente tienen la misma orientación, excepto algunos microtúbulos polares, que se extienden más allá del punto medio y se interdigitan con microtúbulos polares del polo opuesto.

La dinámica de los microtúbulos aumenta notablemente en la mitosis

Aunque hemos dibujado imágenes estáticas de las etapas de la mitosis, los microtúbulos en todas las etapas de este proceso son muy dinámicos. Como analizamos previamente, a medida que las células entran en mitosis la capacidad de sus centrosomas para nuclear el ensamblaje de microtúbulos se incrementa significativamente (véase Fig. 18-35). Además, los microtúbulos se vuelven mucho más dinámicos. ¿Cómo fue determinado esto? En principio, se podría observar los microtúbulos y seguir sus conductas individuales. Sin embargo, en general, hay demasiados microtúbulos en un huso mitótico para hacer esto. Para obtener un valor promedio de cómo es la dinámica de los microtúbulos, los investigadores introdujeron tubulina marcada fluorescentemente en las células, que se incorpora al azar a todos los microtúbulos. Luego blanquearon la marca fluorescente en una pequeña región del huso mitótico y midieron la velocidad a la cual la fluorescencia retorna mediante una técnica llamada *recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueado* (FRAP)



FIGURA 18-37 Los husos mitóticos tienen tres clases distintas de microtúbulos. (a) En esta fotomicrografía electrónica de alto voltaje los microtúbulos se tiñeron con anticuerpos antitubulina, marcados con biotina para aumentar su tamaño. Los grandes objetos cilíndricos son cromosomas. (b) Diagrama esquemático que corresponde a la célula en metafase en (a). El aparato mitótico está formado por tres conjuntos de microtúbulos (MT). Todos



los microtúbulos tienen sus extremos (-) en los polos. Los microtúbulos de los ásteres se proyectan hacia la corteza y están ligados a ella. Los microtúbulos del cinetocoro están conectados con los cromosomas. Los microtúbulos polares se proyectan hacia el centro de la célula y sus extremos distales (+) se superponen. El polo del huso y los microtúbulos asociados se conocen también como áster mitótico. (Parte [a] cortesía de J. R. McIntosh.)

(véase Fig. 9-21). Dado que la recuperación de la fluorescencia se debe al ensamblaje de nuevos microtúbulos a partir de dímeros de tubulina fluorescentes, esto representa la velocidad primaria a la cual los microtúbulos se recambian. En un huso mitótico, su vida media es aproximadamente 15 segundos, mientras que en una célula en interfase, es aproximadamente 5 minutos. Debería notarse que estas son mediciones globales y que los microtúbulos individuales pueden ser más estables o más dinámicos, como veremos.

¿Qué hace a los microtúbulos más dinámicos durante la mitosis? Como hemos analizado previamente, la inestabilidad dinámica es una medida de las contribuciones relativas de las tasas de crecimiento, las tasas de encogimiento, las catástrofes y los rescates (véase Fig. 18-9). El análisis de la dinámica de los microtúbulos *in vivo* muestra que la dinámica incrementada de los microtúbulos individuales en la mitosis se genera mayormente por el aumento de las catástrofes y la disminución de los rescates, con escaso cambio en las velocidades de crecimiento (p. ej., alargamiento) o encogimiento (es decir, acortamiento). Los estudios hechos con extractos de ovocitos de rana sugirieron que el principal factor que incrementa las catástrofes tanto en la interfase como en los extractos mitóticos es la despolimerización por las proteínas cinesina-13. Esto puede verse en un ensayo *in vitro*, en el cual el ensamblaje de los microtúbulos a partir de tubulina pura está nucleado desde centrosomas purificados (Fig. 18-38a). Si se añade cinesina-13 al ensayo, se forman muchos menos microtúbulos. Sin embargo, si una proteína estabilizadora asociada a los microtúbulos (denominada XMAP215) se añade con la cinesina-13, se forman muchos microtúbulos debido a una notable reducción en las frecuencias de las catástrofes. Resulta así que la actividad de la cinesina-13 no se modifica de modo significativo durante el ciclo celular, mientras que la actividad de la XMAP215 se inhibe por su fosforilación durante la

mitosis (Fig. 18-38b). Esto resulta en microtúbulos mucho más inestables (más dinámicos), a medida que la célula entra en la mitosis (Fig. 18-38c).

Los ásteres mitóticos son separados por la cinesina-5 y orientados por la dineína

A medida que se forman los dos ásteres mitóticos, se generan microtúbulos interdigitados de polaridad opuesta entre ellos. Durante la profase, la cinesina-5 bipolar interactúa con los microtúbulos antiparalelos y, al moverse hacia el extremo (+) de cada microtúbulos, se desliza separándolos y consiguientemente alejando a los dos ásteres. El motor dirigido al extremo (-), la dineína citoplasmática también puede contribuir a la separación de los ásteres, así como a orientar al huso adecuadamente en la célula. La dineína lleva a cabo estas acciones asociándose con la membrana plasmática y traccionando de los microtúbulos nucleados a partir de los ásteres mitóticos. Como veremos en breve, este mismo mecanismo es empleado para alargar el huso durante la anafase B (véase Fig. 18-42).

Los cromosomas son capturados y orientados durante la prometafase

Los cinetocoros, las estructuras que median la unión entre los cromosomas y los microtúbulos, se ensamblan sobre cada cromátida hermana en una región llamada **centrómero**. El centrómero es una región estrechada del cromosoma condensado, definida por una secuencia de DNA centromérica. El DNA centromérico puede variar enormemente de tamaño; en una levadura en gemación, tiene aproximadamente 125 pares de bases, mientras que en los seres humanos es del orden de 1 Mbp (véase Cap. 6). Los cinetocoros contienen muchos

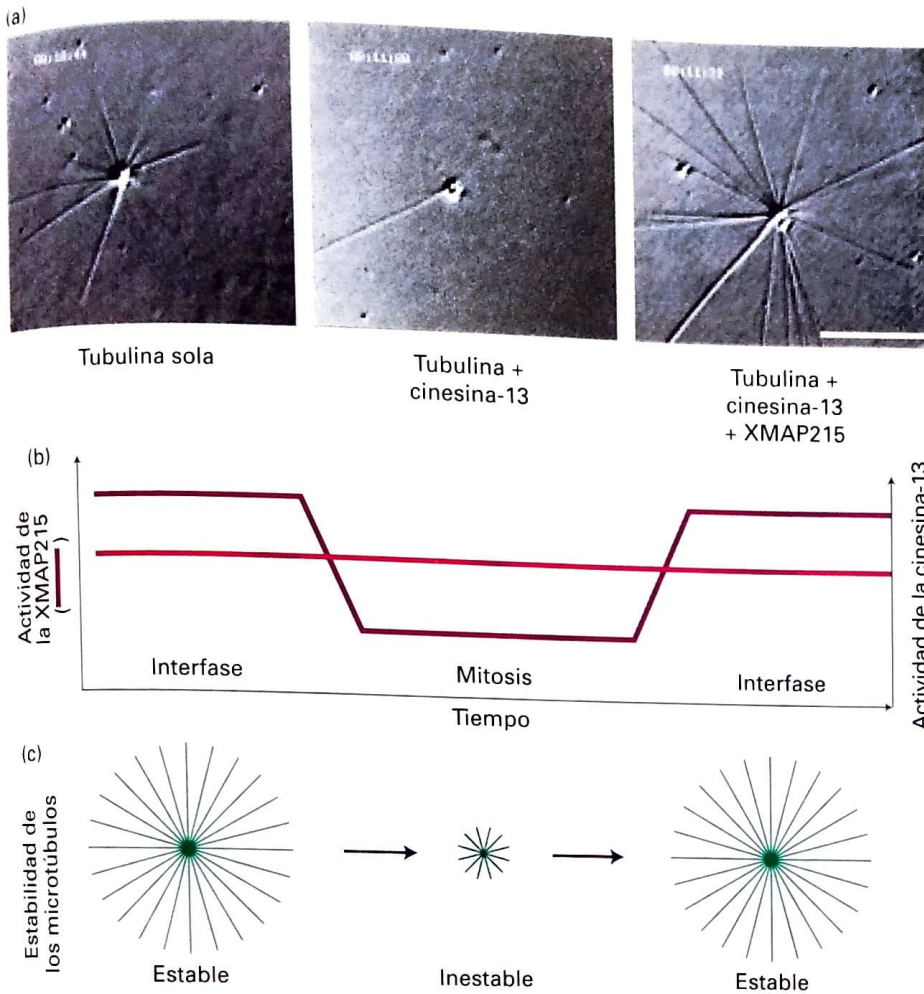


FIGURA EXPERIMENTAL 18-38 La dinámica de los microtúbulos se incrementa en la mitosis debido a la pérdida de una MAP estabilizante.

(a) Estos tres paneles muestran la capacidad del centrosoma de ensamblar microtúbulos a partir de tubulina pura (izquierda); tubulina y la proteína desestabilizadora cinesina-13 (centro); o tubulina, cinesina-13 y la proteína estabilizante XMAP215 (la MAP de *Xenopus* de 215 kD) (derecha). Un análisis adicional muestra que el principal efecto de la XMAP215 es suprimir las catástrofes inducidas por la cinesina-13. (b) La dinámica aumentada de microtúbulos en mitosis se debe a la inactivación de la XMAP215 por fosforilación. (c) Diagrama relacionado con las diferentes estabilidades de los microtúbulos en la interfase y la mitosis. Nótese que la adición de *estabilidad* diferencial entre la interfase y la mitosis, la capacidad de los MTOC de *nuclear* microtúbulos, también se incrementa notablemente durante la mitosis. (Parte [a] tomada de Kinoshita y cols., 2001, *Science* **294**:1340-1343. Parte [b] tomada de Kinoshita y cols., 2002, *Trends Cell Biol.* **12**:267-273.)

complejos proteicos para facilitar la vinculación entre el DNA centromérico y los microtúbulos. En las células animales, el cinetocoro consiste en una capa de DNA centromérica y capas internas y externas del cinetocoro, en la que los extremos (+) de los microtúbulos del

cinetocoro terminan en la capa externa (Fig. 18-39). Los cinetocoros de las levaduras están unidos por un único microtúbulo a su polo del huso, los cinetocoros humanos están unidos por aproximadamente 30 y los cromosomas vegetales, por cientos.

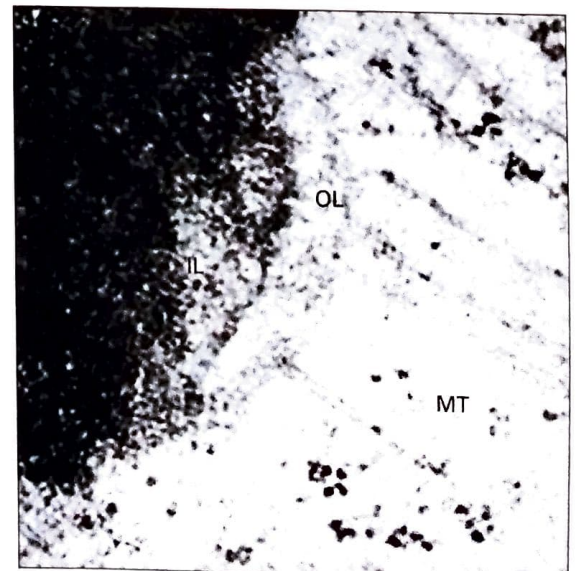
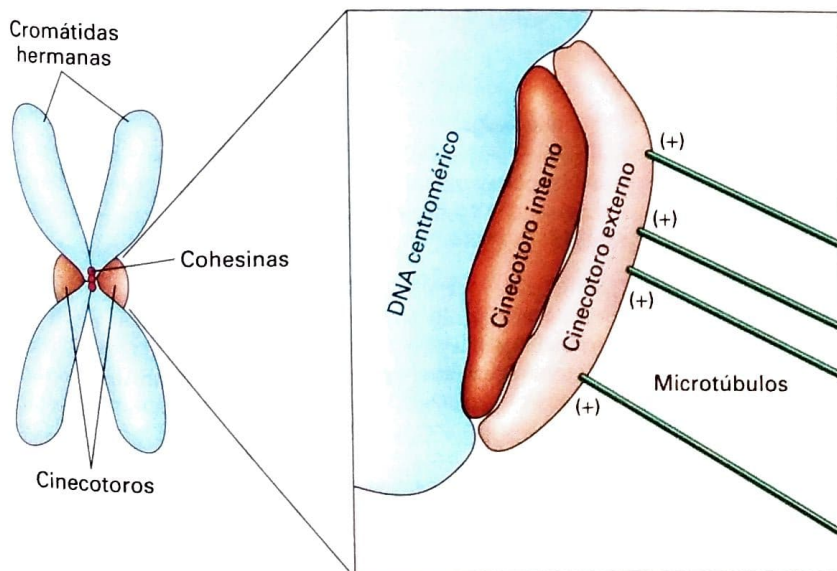


FIGURA 18-39 Estructura de un cinetocoro de mamífero. Diagrama y fotomicrografía electrónica de un cinetocoro de mamífero. (Modificada de B. McEwen y cols., 1998, *Chromosoma* **107**:366, cortesía de B. McEwen.)

¿De qué manera un cinetocoro se une a los microtúbulos en la prometafase? Los microtúbulos nucleados a partir de los polos del huso son muy dinámicos y cuando contactan con el cinetocoro lateralmente o en su extremo, puede provocarse la unión al cromosoma (Fig. 18-40a, pasos 1a y 1b). Los microtúbulos “capturados” por los cinetocoros son estabilizados selectivamente reduciendo el nivel de catástrofes, promoviendo así la posibilidad de persistencia de la unión.

Estudios recientes han revelado un mecanismo que implica a la Ran, una pequeña GTPasa que incrementa la posibilidad de que los microtúbulos encuentren cinetocoros. Recuerde que durante la interfase, el ciclo de la Ran GTPasa está involucrado en el transporte de proteínas hacia el interior y el exterior del núcleo a través de los poros nucleares (Cap. 13; véase la Fig. 13-37). Durante la mitosis, cuando la membrana y los poros nucleares se han desensamblado, un factor de

VIDEO: Dinámica de los microtúbulos en la mitosis
ANIMACIÓN FOCALIZADA: Dinámica de los microtúbulos

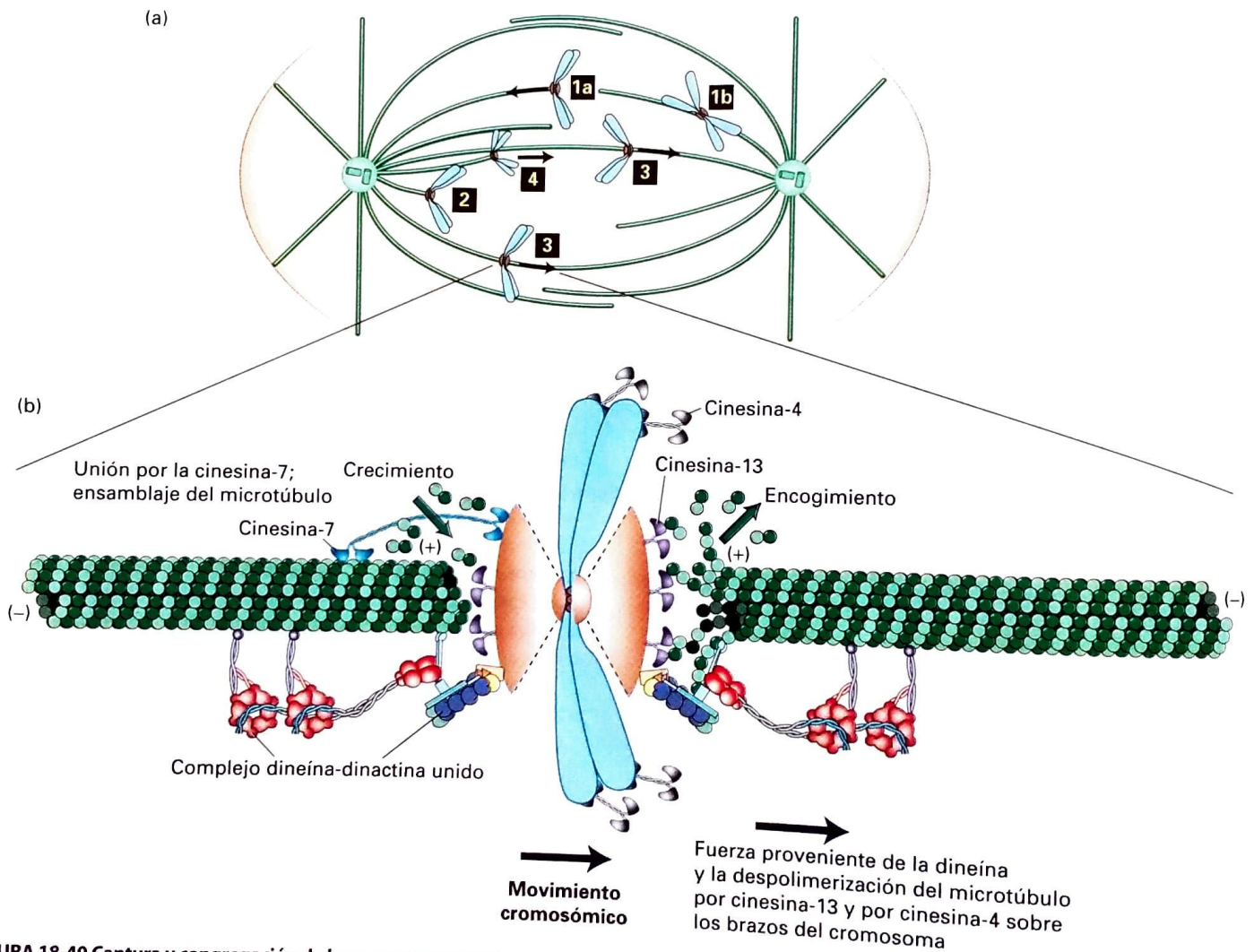


FIGURA 18-40 Captura y congregación de los cromosomas en la prometafase. (a) En la primera etapa de la prometafase los cromosomas se unen, o bien al extremo de un microtúbulo (1a) o bien al lado de este (1b). Luego, el cromosoma es traccionado hacia el polo del huso por la dineína-dinactina asociada con uno de los cinetocoros del cromosoma, a medida que este motor se mueve hacia el extremo (-) del microtúbulo (2). Finalmente, un microtúbulo del polo opuesto encuentra el cinetocoro libre y se une a él, diciéndose ahora que el cromosoma está biorientado (3). Una vez que algunos cromosomas están biorientados, otros que tienen una interacción cinetocoro-polo ya establecida usan el CENP-E/cinesina-7 en su cinetocoro libre para ayudar a orientar (4). Luego, los cromosomas biorientados se mueven a un punto central entre los polos del huso, en un proceso conocido como congregación cromosómica. Nótese que durante estos pasos, los brazos de los cromosomas señalan hacia afuera

desde el polo del huso más cercano: esto se debe a que los motores cromocinesina/cinesina-4 de los brazos del cromosoma se mueven hacia los extremos (+) de los microtúbulos polares. En las células animales, muchos microtúbulos se asocian con cada cinetocoro. Para facilitar la presentación, sólo se muestra un cinetocoro en los microtúbulos. (b) La congregación involucra oscilaciones bidireccionales de los cromosomas, en las que un conjunto de microtúbulos del cinetocoro se acortan a un lado del cromosoma y el otro conjunto se alarga por el lado contrario. En el lado del acortamiento, una proteína cinesina-13 estimula el desensamblaje de los microtúbulos y un complejo dineína-dinactina mueve la proteína cinesina-7 se mantiene en el microtúbulo en alargamiento, la contiene también muchos complejos proteicos adicionales que no se muestran aquí. (Modificado de Cleveland y cols., 2003, *Cell* 112:407-421.)

intercambio para Ran GTPasa se une a los cromosomas, generando de este modo una elevada concentración local de Ran-GTP en la cercanía de los cromosomas. Dado que la enzima que estimula la hidrólisis de GTP sobre Ran (la Ran GAP) está distribuida uniformemente en el citosol, esto genera un gradiente de Ran-GTP centrado en los cromosomas. La Ran-GTP induce la asociación de factores de estabilización de los microtúbulos presentes en el citosol con el microtúbulo, dando como resultado un incremento en el crecimiento de los microtúbulos y, de este modo, sesga el crecimiento de los microtúbulos nucleados a partir de los polos del huso hacia los cromosomas.

Una vez que un cinetocoro se ha unido en posición lateral o terminal a un microtúbulo, la proteína motora dineína-dinactina se asocia con el cinetocoro para mover al cromosoma duplicado a lo largo del microtúbulo hacia el polo del huso. Finalmente, esto resulta en una unión final del microtúbulo a un cinetocoro (Fig. 18-40a, paso 2). Este movimiento ayuda a orientar a la cromátida hermana, de modo tal que el cinetocoro no ocupado del lado opuesto señala hacia el polo distal del huso. Finalmente, un microtúbulo del polo distal capturará al cinetocoro libre; en este momento, se dice que el par de cromátidas hermanas está *biorientado* (Fig. 18-40a, paso 3). Con los dos cinetocoros unidos a polos opuestos, el cromosoma duplicado ahora está bajo tensión, siendo traccionado en ambas direcciones por los dos conjuntos de microtúbulos de los cinetocoros. Cuando uno o unos pocos cromosomas se encuentran biorientados, los otros cromosomas emplean estos microtúbulos de cinetocoros existentes para contribuir a su orientación y movimiento hacia el centro del huso. Esto es mediado por la cinesina-7 (conocida también como CENP-E) asociada con el cinetocoro libre, que mueve al cromosoma hacia el extremo (+) del microtúbulo del cinetocoro (Fig. 18-40, paso 4).

Los cromosomas duplicados son alineados por motores y por la dinámica de los microtúbulos

Durante la prometáfase, los cromosomas se ubican en el punto medio entre los dos polos del huso, en un proceso conocido como *congregación* de los cromosomas. Durante este proceso, los pares de cromosomas biorientados con frecuencia avanzan y retroceden oscilando hasta llegar al punto medio. La congregación de los cromosomas involucra la actividad coordinada de varios motores basados en los microtúbulos, junto con reguladores del ensamblaje y desensamblaje de ellos (Fig. 18-40b). Estos reguladores se localizan en los cinetocoros, pero se comprende escasamente el modo en el que se mantienen en este lugar dado (no son parte de los complejos estables del cinetocoro, que se describen en la sección siguiente). La conducta oscilatoria de los cromosomas implica el alargamiento de los microtúbulos unidos a un cinetocoro y el acortamiento de los unidos al otro, todo esto sin perder sus adhesiones. En los metazoarios existen varios motores basados en los microtúbulos y asociados a los cinetocoros que contribuyen a este proceso. En primer lugar la dineína-dinactina provee la fuerza más intensa que tracciona al par de cromosomas hacia el polo más *distante*. Este movimiento requiere el acortamiento simultáneo del microtúbulo que se incrementa por la cinesina-13 localizada en el cinetocoro. Los microtúbulos asociados con el otro cinetocoro tienen que crecer a medida que el cromosoma se mueve. En este cinetocoro se encuentra anclada la cinesina 7 que es un motor relacionado con la cinesina, que se mantiene en el extremo en crecimiento (+) del microtúbulo que está alargándose. También contribuye a la congregación otra cinesina, la ci-

nesina-4, que se asocia con los brazos del cromosoma. La cinesina-4 es un motor dirigido al extremo (+) que interactúa con los microtúbulos polares para traccionar los cromosomas hacia el centro del huso. Cuando los cromosomas se han congregado en la placa de metafase, se libera la dineína-dinactina desde los cinetocoros y se desplaza por los microtúbulos del cinetocoro hasta los polos. Estas diferentes actividades y fuerzas opuestas operan en conjunto para llevar a todos los cromosomas hasta la placa de metafase, momento en el cual la célula está lista para la anafase.

El complejo pasajero de los cromosomas regula la unión de los microtúbulos al cinetocoro

Hemos mencionado que la segregación de los cromosomas en la mitosis debe ser muy precisa, de modo que resulta crucial que todos los cromosomas estén biorientados antes de que se inicie la anafase. Durante el proceso de unión al azar cinetocoro-microtúbulo, es posible que se cometan errores; por ejemplo, ambos cinetocoros de un par de cromátidas hermanas podrían unirse a los microtúbulos desde el mismo polo del huso. Si estas uniones persistieran durante la metafase, el resultado sería una célula con un cromosoma de menos y otra con uno de más, ambas alteraciones letales. Las células cuentan con dos mecanismos importantes para asegurarse que todos los cromosomas estén adecuadamente biorientados antes de que se inicie la anafase.

El primero de los mecanismos asegura que las interacciones entre los cinetocoros y los microtúbulos sean débiles mientras se produce la biorientación. Cuando un cromosoma está correctamente biorientado, se produce tensión a lo largo del cromosoma y esta hace que se establezca la unión entre el cinetocoro y el microtúbulo. Para comprender el modo en que esto opera, necesitamos mirar con mayor detalle los componentes moleculares que vinculan el cinetocoro con el microtúbulo. Como hemos analizado en el Capítulo 6, los cinetocoros se ensamblan en regiones del DNA cromosómico marcadas por una variante de la histona H3 específica del centrómero, llamada CENP-A. Esta marca el sitio de ensamblaje del cinetocoro, que es un proceso muy complicado. Se ha demostrado que aproximadamente media docena de diferentes complejos estables proteicos, constituidos por más de 40 proteínas distintas se asocian con esta región centromérica en las levaduras. Esencialmente todos estos complejos proteicos están conservados en los seres humanos, lo cual no resulta sorprendente dada la importancia fundamental de los cinetocoros. Uno de ellos (el complejo Ndc80) es largo y flexible, y muchas copias de él unen el cinetocoro interno con el extremo (+) del microtúbulo, en una disposición del tipo de una manga (Fig. 18-41a). La función del Ndc80 y muchos de los factores asociados en el cinetocoro están regulados por el *complejo pasajero de los cromosomas* (CPC). Este complejo se asocia con la región centromérica interna de los cromosomas tempranamente durante la mitosis y entre sus componentes se encuentra una proteína cinasa llamada *Aurora B*. Trabajos recientes han mostrado que parte del mecanismo inicial de reclutamiento del CPC es a través de su unión a la CENP-A fosforilada. Una vez que se ha asociado con las regiones centroméricas, la *Aurora B* dentro del CPC puede fosforilar varios componentes próximos a ella, incluyendo al complejo Ndc80 que afloja la unión de esta al microtúbulo. La fosforilación de estos componentes no es estable: otra proteína, la fosfatasa PP1 asociada con el cinetocoro externo puede desfosforilarlos. Así, cuando los cinetocoros de un par de cromátidas hermanas no se encuentran en tensión, el Ndc80 es continuamente fosforilado

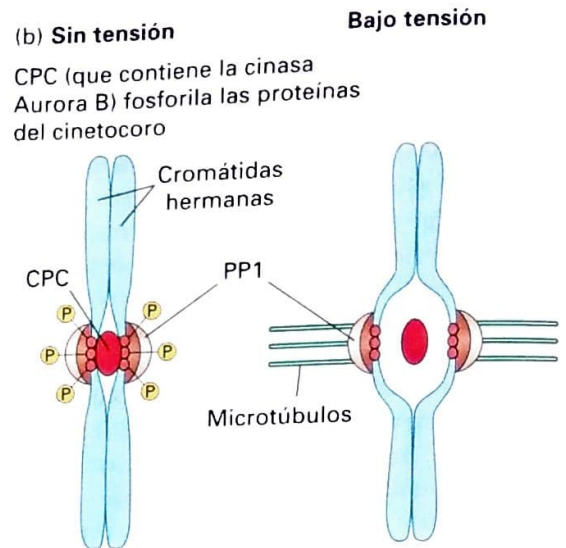
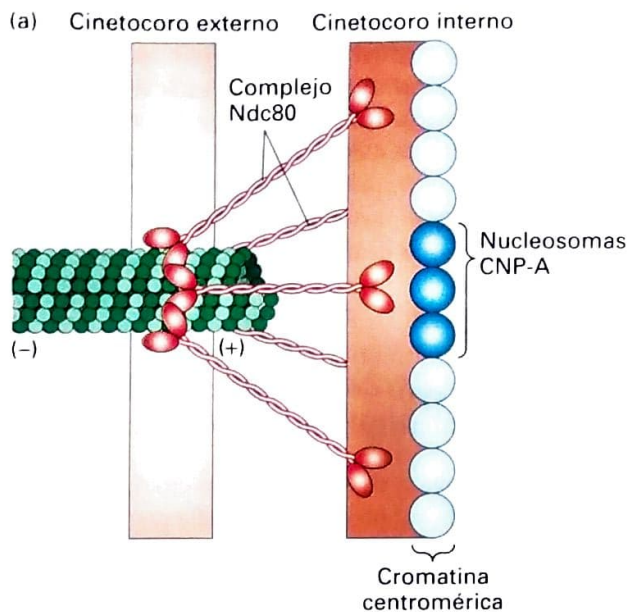
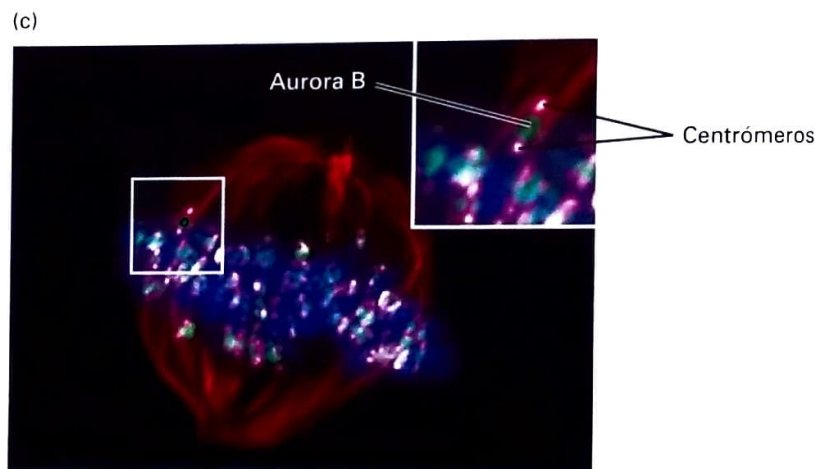


FIGURA 18-41 La regulación por CPC de la unión microtúbulo-cinetocoro. El complejo Ndc80 forma una unión crítica y regulada entre el cinetocoro y el extremo (+) del microtúbulo. (a) Diagrama que muestra la disposición en manga del complejo Ndc80, que vincula la placa interna del cinetocoro con el extremo (+) de un microtúbulo embebido en la placa externa. (b) Diagrama de la relación entre el complejo pasajero del cromosoma (CPC), que contiene la cinasa Aurora B y el cinetocoro externo donde se une la fosfatasa PP1. Nótese que cuando ambos cinetocoros se encuentran en tensión, los cinetocoros externos se alejan del CPC; como resultado de ello, la Aurora B no puede fosforilar los componentes de la placa externa, lo cual incluye al sitio de unión a los microtúbulos del complejo Ndc80. (c) Célula en la etapa de metafase de la mitosis, teñida para tubulina (rojo), DNA (azul), cinasa Aurora B (verde) y centrómeros (magenta). Nótese el modo en que los centrómeros son traccionados desde Aurora B (inserto). (Parte [a] modificada de S. Santaguida y A. Musacchio, 2009, *EMBO J* 28:2511-2531. [c] tomado de Ruchaud, M. Carmena y W. C. Earnshaw, 2007, *Nature Rev. Mol. Cell Biol* 8:798-812.)



por el CPC y desfosforilado por la PP1. El resultado es una interacción débil entre el cinetocoro y el microtúbulo. Sin embargo, cuando ocurre la biorientación, la tensión generada arrastra ambos cinetocoros para separarlos del CPC (Fig. 18-41b, c). Adicionalmente se cree que la tensión se extiende al complejo Ndc80 flexible para aumentar el espacio entre las placas interna y externa del cinetocoro. Como resultado de estos movimientos, el complejo Ndc80 no puede ser fosforilado por la Aurora B y el estado desfosforilado del Ndc80 lo vuelve más fuertemente unido al microtúbulo. De esta manera las uniones de los microtúbulos a los cromosomas biorientados se estabilizan de modo selectivo. Si bien el CPC es importante para la biorientación de cada cromosoma individual, esto no asegura que *todos* los cromosomas estén biorientados antes del inicio de la anafase.

El segundo mecanismo para asegurar la correcta segregación de los cromosomas es el punto de control del ensamblaje en el huso, un circuito de señalización que interrumpe el avance del ciclo celular en la anafase hasta que haya tensión presente en *todos* los cinetocoros. Este mecanismo, que se analiza en detalle en el Capítulo 19, garantiza que todos los cromosomas estén correctamente biorientados antes de que la célula avance a la anafase.

La anafase A mueve los cromosomas a los polos por acortamiento de los microtúbulos

El inicio de la anafase A es uno de los movimientos más radicales que pueden observarse en el microscopio óptico. Cuando se ha cumplido con el punto de control del ensamblaje en el huso, la activación del CPA/C induce la proteólisis de las cohesinas remanentes que aún mantienen a las cromáticas hermanas unidas. Repentinamente, las dos cromátidas hermanas apareadas se separan una de la otra y se dirigen a sus respectivos polos. El movimiento es repentino porque los microtúbulos del cinetocoro están en tensión y tan pronto como se liberan las uniones de las cohesinas entre las cromátidas, los cromosomas separados están en libertad de moverse.

Los experimentos hechos con cromosomas aislados en metafase mostraron que el movimiento en la anafase A puede estar impulsado por el acortamiento de los microtúbulos, empleando la tensión estructural almacenada para eliminar las subunidades de tubulina unidas al GTP, en los extremos de los microtúbulos. Esto puede ser bellamente demostrado in vitro. Cuando los cromosomas en metafase se añaden a los microtúbulos purificados, estos se unen preferentemente a los ex-

tremos (+) de los microtúbulos. La dilución de la mezcla para reducir la concentración de los dímeros de tubulina libres da como resultado el movimiento de los cromosomas hacia los extremos (-), debido a la despolimerización de los microtúbulos en el extremo (+) unido al cromosoma. Además, experimentos recientes han mostrado que en la *Drosophila* dos proteínas cinesina-13, miembros de una clase de proteínas que despolimerizan los microtúbulos (véase la Fig. 18-15), también contribuyen al movimiento de los cromosomas en la anafase A. Una de las proteínas cinesina-13 se localiza en el cinetocoro e incrementa el desensamblaje allí (Fig. 18-42 **A1**) y la otra se localiza en el polo del huso, aumentando la despolimerización en ella (Fig. 18-42, **A2**). Así, al menos en la mosca, la anafase A es impulsada en parte por las proteínas cinesina-13 localizadas específicamente en el cinetocoro y el polo del huso, para acortar los microtúbulos del cinetocoro tanto en sus extremos (+) como (-), traccionando los cromosomas hacia los polos.

La anafase B separa los polos por la acción combinada de las cinesinas y la dineína

La segunda parte de la anafase implica la separación de los polos del huso, en un proceso conocido como anafase B. El compromiso de las proteínas bipolares cinesina-5 es un contribuyente principal para este movimiento (Fig. 18-42, **B1**). Estos motores se asocian con los microtúbulos polares que se superponen y dado que son motores dirigidos al extremo (+), empujan a los polos, separándolos. Al tiempo que esto ocurre, los microtúbulos polares deben crecer para acomodarse a la distancia creciente entre los polos del huso. Otro motor (el motor citoplasmático, la dineína dirigida al extremo (-), localizada y anclada en la corteza celular) ejerce su acción sobre los microtúbulos del áster y de este modo contribuye a la separación de los polos del huso (Fig. 18-42, **B2**).

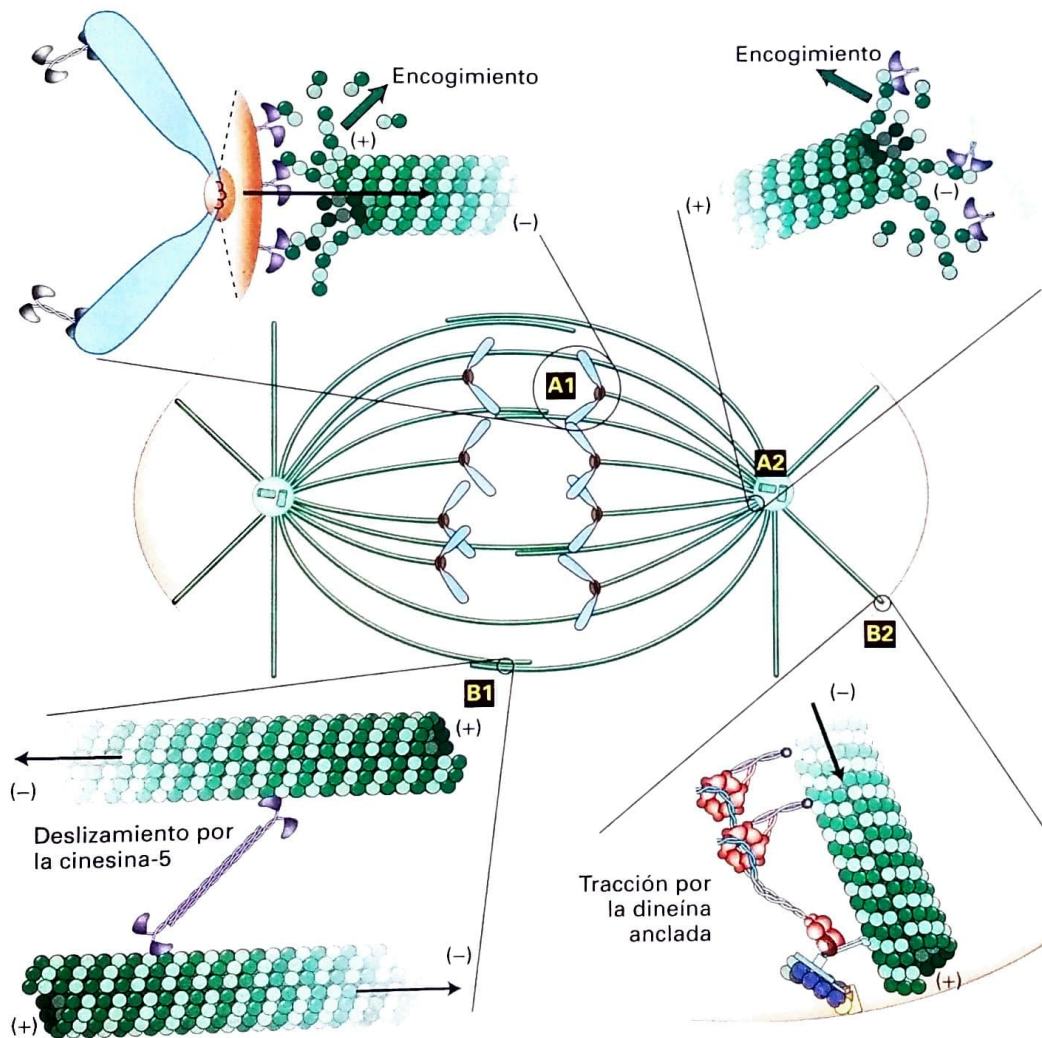


FIGURA 18-42 Movimiento de los cromosomas y separación de los polos del huso en la anafase. El movimiento en la anafase A es impulsado por una cinesina-13 que acorta los microtúbulos en el cinetocoro (**A1**) y en el polo del huso (**A2**). Nótese que los brazos del cromosoma siguen señalando desde los polos del huso, debido a los miembros asociados de la cromocinesina/cinesina-4, de modo tal que la fuerza de despolimerización debe ser capaz de superar la fuerza que tracciona los brazos hacia el centro del huso. La anafase B

también tiene dos componentes: el deslizamiento de los microtúbulos polares antiparalelos impulsado por un motor de cinesina-5 dirigido al extremo (+) (**B1**) y la tracción sobre los microtúbulos del áster ejercida por la dineína-dinactina localizada en la corteza celular (**B2**). Las flechas indican la dirección de movimiento generado por las respectivas fuerzas. (Modificado de Cleveland y cols., 2003, *Cell* 112:407-421.)

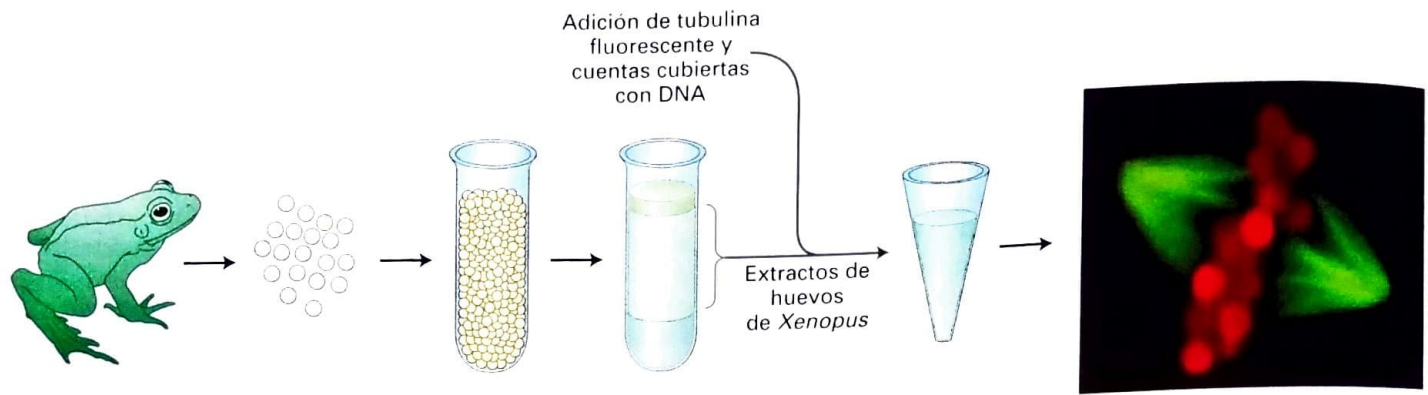


FIGURA EXPERIMENTAL 18-43 Los husos mitóticos pueden formarse en ausencia de centrosomas. Los extractos sin centrosomas pueden aislarse de ovocitos de rana detenidos en mitosis al centrifugar los huevos para separar el material soluble de los orgánulos y la yema. Cuando la tubulina marcada con

fluorescencia (verde) se añade a los extractos del material soluble junto con las cuentas cubiertas con DNA (rojo), los husos mitóticos se forman espontáneamente alrededor de las cuentas a partir de microtúbulos nucleados al azar. (Modificado de Kinoshita y cols., 2002, *Trends Cell Biol.* **12**:267-273, y Antonio y cols., 2000, *Cell* **102**:425.)

Existen mecanismos adicionales que contribuyen a la formación del huso

Hay una diversidad de casos in vivo, en los que los husos se forman en ausencia de centrosomas. Esto implica que la nucleación de los microtúbulos a partir de los centrosomas no es el único modo en que puede formarse un huso. Los estudios que se valieron de los extractos mitóticos de los huevos de rana (en los que no había centrosomas), mostraron que la adición de cuentas cubiertas con DNA era suficiente para ensamblar un huso mitótico relativamente normal (Fig. 18-43). En este sistema, las cuentas reclutaban microtúbulos preformados y los factores del extracto cooperaban para formar el huso. Uno de los factores necesarios para esta reacción es la dineína presente en el citoplasma, que se propone que se une a dos microtúbulos y migra hacia sus extremos (–), atrayéndolos al mismo tiempo.

Como se mencionó en la Sección 18.1, trabajos recientes han identificado un complejo asociado a TuRC- γ , el *complejo de la augmina*, que contribuye también con microtúbulos al huso mitótico. En la prometafase tardía y la metafase, el complejo de la augmina se une a los costados de los microtúbulos presentes en el huso para nuclear microtúbulos adicionales a los microtúbulos polares y por lo tanto, al movimiento en la anafase B. Los microtúbulos polares también están implicados en la ubicación del anillo contráctil, como analizaremos a continuación.

La citocinesis divide la célula duplicada en dos

Durante la anafase tardía y la telofase en las células animales, la célula ensambla un *anillo contráctil* formado por microfilamentos, unido a la membrana plasmática, que finalmente se contrae y separa la célula en dos, en un proceso llamado citocinesis (véase Fig. 18-36). El anillo contráctil es una banda delgada de filamentos de actina de polaridad mixta, intercalados con filamentos bipolares de miosina II (véase Fig. 17-36). Al recibir la señal el anillo se contrae, en primer lugar para generar un *frunce de escisión* y luego para separar esta célula en dos. Hay dos aspectos del anillo contráctil que resultan esenciales para su función. El primero es que debe estar adecuadamente ubicado en la célula. Se sabe

que la ubicación está determinada por señales que provienen del huso, de modo tal que el anillo se forma equidistante a ambos polos del huso. La señal proviene al menos en parte del complejo pasajero de los cromosomas (CPC), el cual regula la unión de los microtúbulos a los cinetocoros durante la prometafase (Fig. 18-41). Hasta la anafase, el CPC se encuentra asociado con la región centromérica de los cromosomas no separados. Cuando se inicia la anafase, deja los centrómeros y se asocia con los microtúbulos polares que se superponen en el centro del huso (Fig. 18-44). Allí el CPC recluta otro complejo proteico (la *central spindle*) que incluye un motor proteico, una cinesina dirigida al extremo (+), que se concentra en la zona media del huso debido a su actividad motora. A medida que continúa la anafase B, la central spindle reclu-

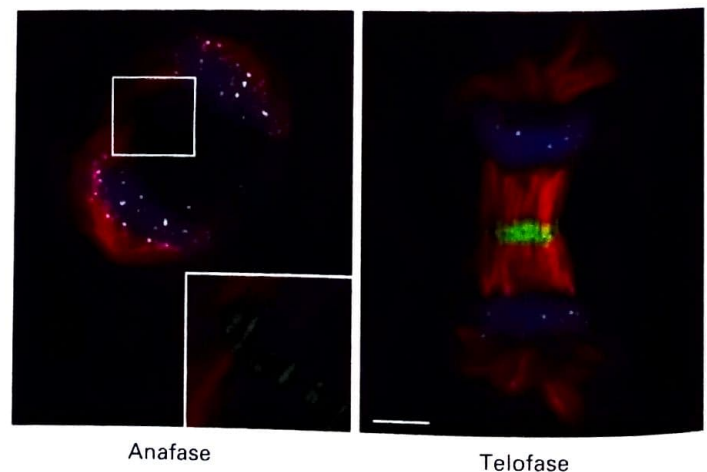


FIGURA EXPERIMENTAL 18-44 El complejo pasajero de los cromosomas (CPC) permanece en la zona media del huso durante la anafase y la telofase. Fotomicrografías de una célula en la anafase tardía (izquierda) y la telofase (derecha), que muestran microtúbulos (en rojo), DNA (en azul), cinasa Aurora B (en verde) y centrómeros de los cromosomas (en magenta). Nótese el modo en que la Aurora B del complejo CPC se concentra en la región donde los microtúbulos polares se superponen y donde se formará el anillo contráctil. Escala = 5 μ m. (Tomado de S. Richard, M. Carmena y W. C. Earnshaw, 2007, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **8**:798-812.)

ta un factor de intercambio por RhoA. Recuérdese del Capítulo 17 que las Rho son pequeñas proteínas que unen GTP y se activan por factores de intercambio que catalizan el intercambio de GTP por GDP (véase Fig. 17-42). Una vez activado el Rho-GTP, se activa una formina para que impulse la nucleación y el ensamblaje de los filamentos de actina que componen el anillo contráctil (véase Fig. 17-44). De este modo, la posición del huso define directamente el sitio de formación del anillo contráctil y así, la citocinesis.

El segundo aspecto importante del anillo contráctil es el momento de su contracción (si esta se produjera antes de que todos los cromosomas hubiesen llegado a sus respectivos polos habría consecuencias genéticas desastrosas). Como veremos en el Capítulo 19, se descubrió una vía de señalización en las levaduras en gemación, llamada *punto de control de la posición del huso*, que pausa el ciclo celular para asegurar que la citocinesis no ocurra antes de que el huso esté orientado adecuadamente. Aún no se conoce el mecanismo de esta coordinación en las células animales.

Las células vegetales reorganizan sus microtúbulos y construyen una nueva pared celular en la mitosis

Las células vegetales en interfase carecen de un MTOC que organice los microtúbulos en la configuración radiante de la interfase, típico de las células animales. En lugar de ello, la corteza de las células vegetales está tapizada por numerosos MTOC que contienen tubulina γ y nuclean el ensamblaje de bandas transversales de microtúbulos que se encuentran por debajo de la pared celular (Fig. 18-45, izquierda). Los microtúbulos, que tienen polaridad mixta, son liberados desde los MTOC corticales por la acción de la katanina, una proteína que corta los microtúbulos; la pérdida de la katanina da lugar a microtúbulos muy largos y células de formas inadecuadas. La razón para esto es que dichos microtúbulos corticales, que se entrecruzan por acción de las MAP específicas de los vegetales, ayudan al depósito de las microfibrillas extracelulares de celulosa, el principal componente de la pared celular rígida (véase Fig. 20-40).

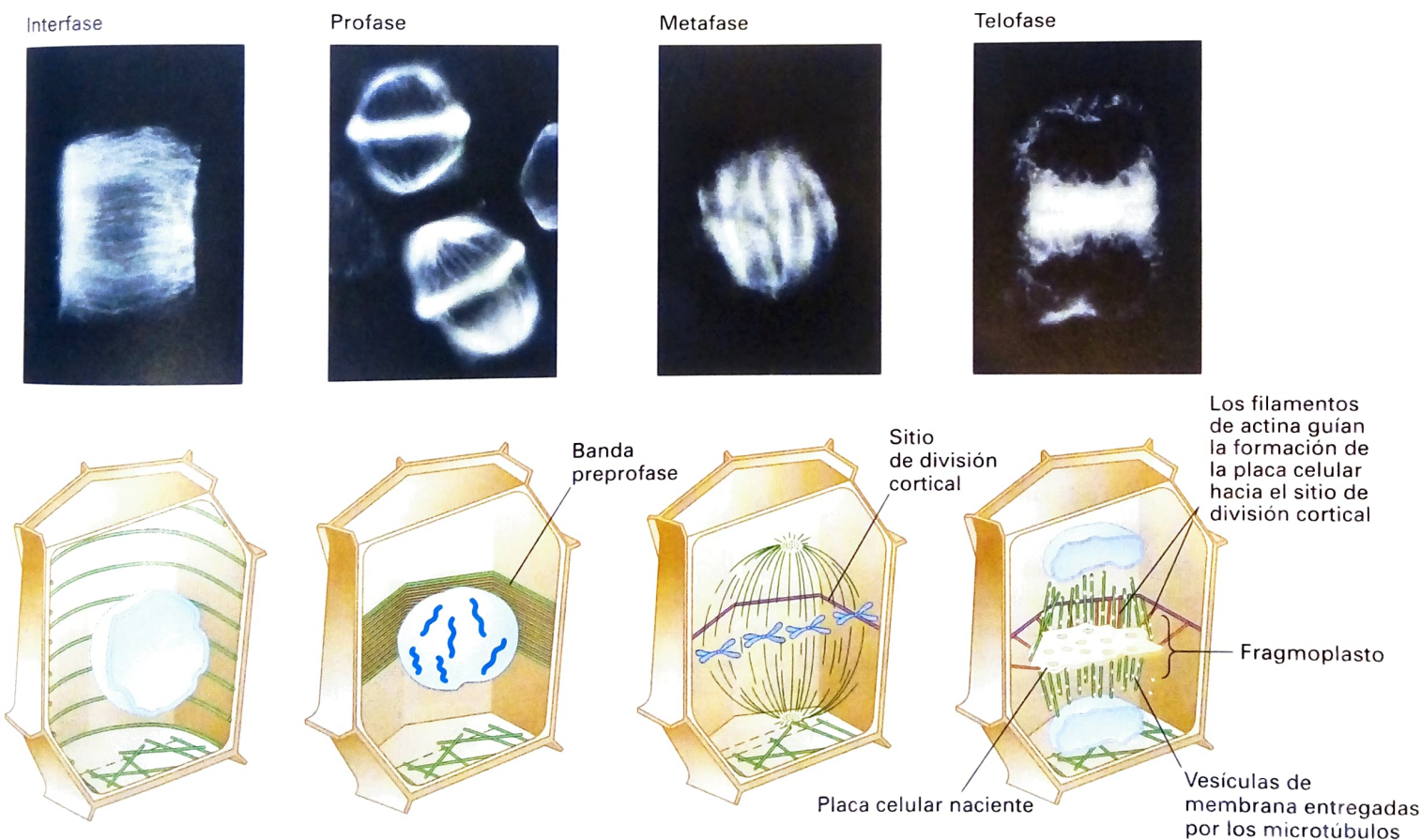


FIGURA 18-45 Mitosis en una célula de un vegetal superior. Las fotomicrografías de fluorescencia (arriba) y los diagramas correspondientes (abajo) muestran la disposición de los microtúbulos en las células vegetales en la interfase y la mitosis. Durante la interfase, un arreglo cortical de microtúbulos atraviesa la célula. Cuando la célula entra en profase, los microtúbulos (verde) junto con los filamentos de actina (rojo) se ensamblan bajo la corteza celular en una banda preprofase, que marca el futuro sitio de la división. A medida que la célula entra en prometáfase y metafase se forma un huso similar al que se ve en las células animales. Sin embargo, debido a la pared celular, la citocinesis

es muy distinta en las células vegetales y en las animales. Los microtúbulos entregan membranas para ensamblar una placa celular naciente, llamada fragmoplasto, cuya organización está definida por filamentos de actina ligados al sitio de división en la corteza. Finalmente, las membranas recién entregadas se fusionan en el sitio de la división cortical y se transforman en parte de las membranas plasmáticas de ambas células. Las enzimas secretadas con las vesículas luego construyen una pared celular entre ambas células hijas. (Adaptado de G. Jurgens, 2005, *Ann. Rev. Plant Biol.* 56:281-289; fotomicrografías cortesía de Susan M. Wick.)

Si bien los eventos mitóticos en los vegetales generalmente son similares a los que ocurren en las células animales, la formación del huso y la citocinesis tienen características únicas en los vegetales (Fig. 18-45). Las células vegetales agrupan los microtúbulos corticales y los filamentos de actina en una *banda preprofase* y los reorganizan en un huso en la profase, sin la necesidad de centrosomas. El sitio de la banda preprofase define la ubicación del sitio en el que posteriormente será la división. En la metafase, el aparato mitótico es muy similar en las células vegetales y las animales. Sin embargo, la división de las células en dos es bastante diferente entre uno y otro tipo celular. Las vesículas del Golgi, que aparecen en la telofase, son transportadas a lo largo de los microtúbulos para formar la *placa celular naciente*. La placa celular se expande y es guiada hacia el sitio de división por los filamentos de actina para formar el **fragmoplasto**, una estructura de la membrana que reemplaza al anillo contráctil de las células animales. Las membranas de las vesículas que forman el fragmoplasto se transforman en las membranas plasmáticas de las células hijas. El contenido de estas vesículas, al igual que los polisacáridos precursores de celulosa y pectina, forman la placa celular temprana que se desarrolla en la nueva pared celular entre ambas células hijas.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 18.6

Mitosis

- La mitosis (la separación precisa de los cromosomas duplicados) implica una maquinaria molecular que comprende microtúbulos dinámicos y motores asociados a ellos.
- El huso mitótico tiene tres clases de microtúbulos y todos surgen de los polos del huso —los microtúbulos del cinetocoro, que se unen a los cromosomas; los microtúbulos polares desde cada polo del huso, que se superponen en el medio de este; y los microtúbulos astrales, que se extienden hasta la corteza celular (Fig. 18-37)—.
- En la primera etapa de la mitosis (la profase), los cromosomas nucleares se condensan y los polos del huso se mueven hacia cada lado del núcleo (véase Fig. 18-36).
- En la prometafase, la envoltura nuclear se rompe y los microtúbulos que surgen desde los polos del huso capturan los pares de cromátidas hermanas en sus cinetocoros. Los dos cinetocoros, uno de cada cromátida, se unen a polos opuestos del huso (biorientación), lo que permite que los cromosomas se congreguen en el medio del huso.
- El complejo pasajero de los cromosomas (CPC), asociado con la placa interna del cinetocoro, mantiene débiles las uniones de los microtúbulos por la actividad de su cinasa componente (Aurora B) que fosforila proteínas críticas del cinetocoro. Cuando un cromosoma está biorientado, se genera tensión y los sustratos de la Aurora B son traccionados, alejándose de la cinasa (véase Fig. 18-41). Sin fosforilación de las proteínas del cinetocoro por la Aurora B, la unión cromosoma-cinetocoro se estabiliza.
- En la metafase, los cromosomas se alinean en la placa metafásica. El sistema de punto de control del ensamblaje del huso registra y controla los cinetocoros no unidos y retarda la anafase hasta que todos los cromosomas estén unidos.

- En la anafase, los cromosomas duplicados se separan y se mueven hacia los polos del huso, acortándose los microtúbulos del cinetocoro tanto en este como en el polo del huso (anafase A). Los polos del huso también se separan, empujados por la kinesina-5 bipolar que se mueve hacia los extremos (+) de los microtúbulos polares (anafase B). La separación del huso también está facilitada por la dineína de localización cortical, que tracciona sobre los microtúbulos astrales (véase Fig. 18-42).

- Dado que el huso mitótico tiene la capacidad de autoensamblarse en ausencia de MTOC, los mecanismos redundantes parecen contribuir a la fidelidad de la mitosis.

- El anillo contráctil basado en actina-miosina, cuya posición está determinada por la posición del huso, se contrae para estrangular a la célula en dos durante la citocinesis.

- En los vegetales, la división celular involucra la entrega de membranas por los microtúbulos para ensamblar en el fragmoplasto, que se transforma en la membrana plasmática de las dos células hijas.

18.7 Filamentos intermedios

El tercer sistema importante de filamentos en los eucariontes se denomina colectivamente sistema de los **filamentos intermedios**. Este nombre refleja su diámetro de aproximadamente 10 nm, que es intermedio entre el de 6-8 nm de los microfilamentos y los filamentos

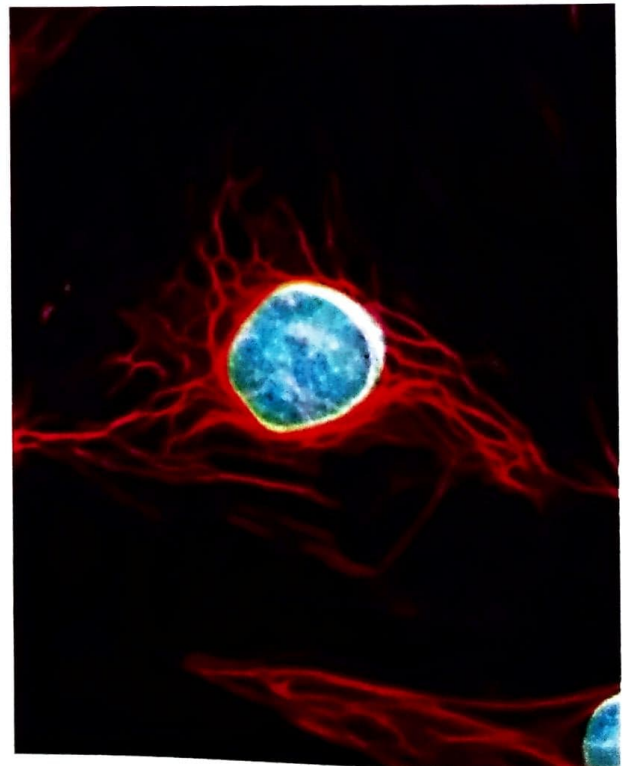


FIGURA EXPERIMENTAL 18-46 Localización de dos tipos de filamentos intermedios en una célula epitelial. Fotomicrografía de inmunofluorescencia de la célula PtK2 con doble tinción, con anticuerpos para queratina (rojo) y lamina (azul). Una red de filamentos intermedios de lamina puede verse subyacente a la membrana nuclear, mientras que los filamentos de queratina se extienden desde el núcleo a la membrana plasmática. (Cortesía de R. D. Goldman.)

gruesos de actina del músculo esquelético. Los filamentos intermedios se extienden a través del citoplasma, a la vez que tapizan el interior de la envoltura nuclear de las células animales en interfase (Fig. 18-46). Los filamentos intermedios tienen varias propiedades únicas que los distinguen de los microfilamentos y los microtúbulos. En primer término son mucho más heterogéneos desde el punto de vista de la bioquímica (es decir, existen muchas subunidades diferentes de filamentos intermedios, aunque evolutivamente relacionadas) y con frecuencia se expresan de modo dependiente de los tejidos. En segundo lugar tienen una gran fuerza ténsil, como lo demuestran claramente el pelo y las uñas, que consisten primariamente de filamentos intermedios de células muertas. En tercer lugar, carecen de polaridad intrínseca tal como los microfilamentos y los microtúbulos y sus subunidades constituyentes no unen un nucleótido. En cuarto lugar, dado que carecen de polaridad intrínseca no resulta extraño que no haya motores moleculares que los empleen como vías. En quinto lugar, aunque son dinámicos en términos de intercambio de subunidades, son mucho más estables que los microfilamentos y los microtúbulos porque la velocidad de intercambio es mucho más lenta. De hecho, existe una forma estándar de purificar los filamentos intermedios que se basa en someter a las células a una extracción rigurosa en detergente, de modo tal que todas las membranas de los microfilamentos y microtúbulos se solubilizan, dejando un residuo que es casi exclusivamente filamentos intermedios. Finalmente, los filamentos intermedios no están presentes en todos los eucariontes. Los hongos y los vegetales carecen de filamentos intermedios; los insectos solo tienen una clase de ellos, representados por los dos genes que expresan lámina A/C y B.

Estas propiedades hacen de los filamentos intermedios estructuras únicas e importantes para los metazoarios. La importancia de los filamentos intermedios está subrayada por la identificación de más de 40

afecciones clínicas, parte de las cuales se analizan aquí, asociadas con defectos en los genes que codifican las proteínas de los filamentos intermedios. La comprensión de sus contribuciones a la estructura de las células y los tejidos requiere en primer lugar el examen de la estructura de las proteínas de los filamentos intermedios y el modo en el que se ensamblan en los filamentos. Luego describiremos las diferentes clases de filamentos intermedios y las funciones que llevan a cabo.

Los filamentos intermedios se ensamblan a partir de dímeros de las subunidades

Los filamentos intermedios (FI) están codificados en el genoma humano por 70 genes diferentes en al menos cinco subfamilias. La característica definitoria de la proteína de los FI es la presencia de un dominio conservado en forma de bastón helicoidal α de aproximadamente 310 residuos, que tiene las características de secuencia de un motivo de espiral enrollada (véase Fig. 3-9a). Flanqueando este dominio de bastón se encuentran dominios no helicoidales C-terminal y N-terminal de diferentes tamaños, característicos de cada clase de FI.

El bloque estructural primario de los filamentos intermedios es un dímero que mantiene unidos los dominios con forma de bastón que se asocian como una espiral enrollada (Fig. 18-47a). Estos dímeros luego se asocian en forma inclinada para formar tetrámeros en los que los dos dímeros se encuentran orientados en oposición (Fig. 18-47b). Los tetrámeros se ensamblan de extremo a extremo y quedan asegurados uno con el otro en largos *protofilamentos*. Cuatro protofilamentos asociados forman una *protofibrilla* y cuatro protofibrillas se asocian lado a lado para generar el filamento de 10 nm. Así, un filamento intermedio tiene 16 protofilamentos (Fig. 18-47c). Dado que el tetrámero es simétrico, los filamentos intermedios carecen de polaridad. Esta descripción de

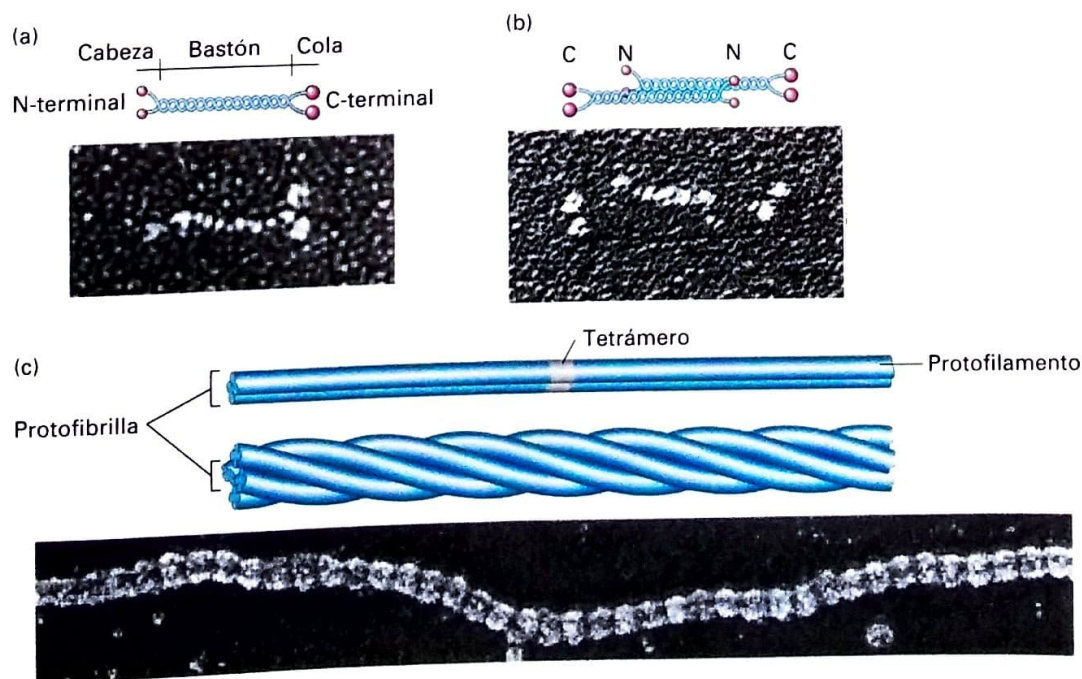


FIGURA 18-47 Estructura y ensamblaje de los filamentos intermedios. Fotomicrografías electrónicas y dibujos de los dímeros y tetrámeros de proteínas FI y de filamentos intermedios maduros de *Ascaris*, un parásito intestinal. (a) Las proteínas FI forman dímeros paralelos a través de un dominio central muy conservado de espiral enrollada. Las cabezas globulares y las colas son muy variables en longitud y secuencia entre las clases de filamentos intermedios.

(b) Se forma un tetrámero por la agregación antiparalela, escalonada, lado a lado de dos dímeros idénticos. (c) Los tetrámeros se agregan extremo a extremo y lateralmente en una protofibrilla. En un filamento maduro, formado por cuatro protofibrillas, los dominios globulares forman cúmulos de cuentas sobre la superficie. (Adaptado de N. Geisler y cols., 1998, *J. Mol. Biol.* **282**:601; cortesía de Ueli Aepli.)

los filamentos se basa en su estructura más que en el mecanismo de ensamblaje: actualmente no está claro cómo se ensamblan los filamentos intermedios in vivo. A diferencia de lo que ocurre con los microfilamentos y los microtúbulos, no hay proteínas que secuestren, formen casquetes o corten los filamentos intermedios.

Las proteínas de los filamentos intermedios se expresan de modo específico de los tejidos

El análisis de secuencia de las proteínas de los FI revela que pertenecen al menos a cinco clases de homología diferentes, cuatro de las cuales muestran una fuerte correspondencia entre la clase de secuencia y el origen de desarrollo del tipo celular en el cual se expresa la proteína del FI (Cuadro 18-1).

Las **queratinas** que constituyen las clases I y II se encuentran en los epitelios; las proteínas de clase III de los FI se encuentran por lo general en las células de origen mesodérmico; y las de la clase IV componen los **neurofilamentos** presentes en las neuronas. Las **laminas**, que constituyen la clase V, se encuentran recubriendo el núcleo de todas las células animales. Resumiremos brevemente las cinco clases de homología y analizaremos sus funciones en los tejidos específicos.

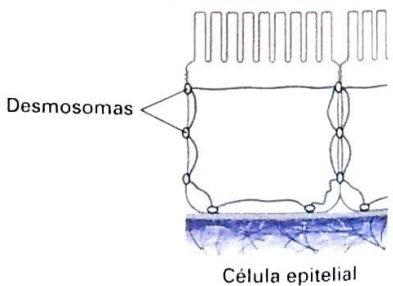
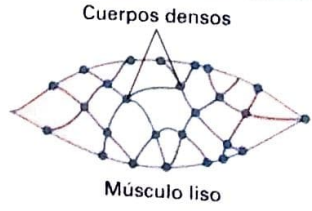
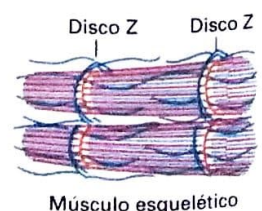
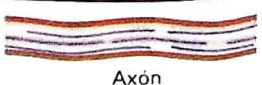
Queratinas Las queratinas proveen fuerza a las células epiteliales. Las primeras dos clases de homología son las llamadas queratinas *básicas* y *ácidas*. En el genoma humano hay alrededor de 50 genes que codifican queratinas, casi distribuidos por igual entre las clases ácida y básica. Estas subunidades de queratina se ensamblan en un dímero obligado,

de modo tal que cada dímero consiste en una cadena básica y una ácida; luego, estas se ensamblan en un filamento según se describió en la sección anterior.

Las queratinas son indudablemente la familia más diversa dentro de las proteínas de los FI y los pares de queratina muestran diferentes patrones de expresión entre diferentes epitelios, así como también exhiben una regulación que es específica de la diferenciación. Entre estas se encuentran las llamadas queratinas duras que forman el pelo y las uñas. Estas queratinas son ricas en residuos de cisteína que se oxidan para formar puentes disulfuro, lo que las fortalece. Esta es una propiedad que explotan los estilistas: si a usted no le gusta el tipo de cabello que tiene, los puentes disulfuro de su queratina capilar pueden ser reducidos, darle una nueva forma a las fibras capilares y volver a formar estos puentes mediante oxidación: el resultado es un rizado o un alisado "permanente".

Las llamadas *citoqueratinas* o queratinas suaves se encuentran en las células epiteliales. Las capas celulares de la epidermis que forman la piel son un buen ejemplo de la función de las queratinas. La capa más baja de las células (la *capa basal*) que está en contacto con la lámina basal prolifera constantemente, dando lugar a las células llamadas *queratinocitos*. Después de que abandonan la capa basal estos queratinocitos se diferencian y expresan abundantes citoqueratinas. Las citoqueratinas se asocian con sitios de unión especializados entre las células, formando láminas celulares que pueden soportar la abrasión. Las células finalmente mueren dejando células muertas sin orgánulos. Esta capa de células muertas constituye una barrera esencial para la evaporación del agua, sin lo cual no sobreviviríamos. El tiempo de vida de una célula de la piel desde su nacimiento hasta su pérdida como una escama de piel es de alrededor de un mes.

Cuadro 18-1 Principales clases de filamentos intermedios de los mamíferos

Clase	Proteína	Distribución	Función propuesta	
I	Queratinas ácidas	Células epiteliales	} Fuerza e integridad tisular	 Desmosomas Célula epitelial
II	Queratinas básicas	Células epiteliales		
III	Desmina, GFAP, vimentina	Células musculares, de la glía y mesenquimatosas	Organización e integridad de los sarcómeros	 Cuerpos densos Músculo liso  Disco Z Disco Z Músculo esquelético
IV	Neurofilamentos (NFL, NFM y NFH)	Neuronas	Organización de los axones	 Axón
V	Laminas	Núcleo	Estructura y organización nuclear	 Núcleo

En todos los epitelios, los filamentos de queratina se asocian con los desmosomas que mantienen juntas a las células adyacentes y con los hemidesmosomas, que unen a las células con la matriz extracelular, dando de este modo fuerza tanto a las células como a los tejidos. Estas estructuras se describen con más detalle en el Capítulo 20.

Además de proveer un soporte estructural simple, existe cada vez un mayor número de evidencias de que los filamentos de queratina proveen cierta organización a los orgánulos y participan en vías de transducción de las señales. Por ejemplo, en respuesta a un daño de un tejido, se induce el rápido crecimiento celular. En las células epiteliales se ha mostrado que la señal de crecimiento requiere una interacción entre una molécula de señalización para el crecimiento celular y una queratina específica.

Desmina La clase III de proteínas de los filamentos intermedios incluye la vimentina, presente en las células del mesénquima; la GFAP (proteína ácida fibrilar de las células de la glía) que se encuentra en estas células; y la *desmina*, presente en las células musculares; la desmina proporciona fuerza y organización a estas células musculares (véanse las ilustraciones del Cuadro 18-1).

En el músculo liso, los filamentos de desmina unen *cuerpos densos* citoplasmáticos (a los cuales también están unidas las miofibrillas contráctiles) a la membrana plasmática, para asegurar que las células resistan el sobreestiramiento. En el músculo esquelético el sarcómero está rodeado por una red formada por una banda de filamentos de desmina. Los filamentos de desmina rodean al disco Z y están entrecruzados con la membrana plasmática. Los filamentos longitudinales de desmina atraviesan los discos Z vecinos dentro de la miofibrilla y las conexiones entre los filamentos de desmina que se encuentran rodeando a los discos Z en miofibrillas adyacentes sirven para entrecruzarlas en haces dentro de la célula muscular. La red también está unida al sarcómero a través de interacciones con los filamentos gruesos de miosina. Dado que los filamentos de desmina se encuentran por fuera del sarcómero, no participan activamente en la generación de las fuerzas contráctiles. En lugar de ello, la desmina desempeña un papel estructural fundamental en el mantenimiento de la integridad del músculo. En los ratones transgénicos que carecen de desmina, por ejemplo, esta arquitectura de sostén no existe y los discos Z están mal alineados. La localización y morfología de las mitocondrias en estos ratones es también anormal, lo que sugiere que estos filamentos intermedios también podrían contribuir a la organización de los orgánulos.

Neurofilamentos El tipo IV de filamentos intermedios consiste en las tres subunidades relacionadas –NF-L, NF-M y NF-H (correspondientes a NF ligero, medio y pesado)–, que constituyen los neurofilamentos presentes en los axones de las células nerviosas (véase Fig. 18-2). Las tres subunidades difieren principalmente en el tamaño de sus dominios C-terminales y todas forman heterodímeros obligados. Los experimentos hechos con ratones transgénicos revelan que estos neurofilamentos son necesarios para establecer el diámetro correcto de los axones, lo cual determina la velocidad a la cual los impulsos nerviosos se propagan a lo largo de ellos.

Laminas El tipo más extendido de filamentos intermedios es el de las laminas de la clase V, que proporcionan fuerza y sostén a la superficie interna de la membrana nuclear (véase Fig. 18-46). Las laminas son las progenitoras de todas las proteínas de los FI, y los FI citoplasmáticos que surgen por duplicación génica y mutación. Las laminas proporcionan

una red bidimensional que se encuentra entre la envoltura nuclear y la cromatina del núcleo. En los seres humanos existen tres genes que codifican laminas: uno de ellos codifica las laminas tipo A y C y dos codifican la lamina tipo B. Este parece ser el gen primordial y se expresa en todas las células, mientras que las laminas de tipo A y C están reguladas durante el desarrollo. Las laminas B se isoprenilan postraduccionalmente, lo cual las ayuda a asociarse con la membrana interna de la envoltura nuclear. Además, unen proteínas de la membrana interna como la emerina y los polipéptidos asociados a la lamina (LAP2). Las laminas unen múltiples proteínas y se ha propuesto que cumplen funciones en la organización a gran escala de la cromatina y el espaciamiento de los poros nucleares. Cuando las células entran en mitosis, las laminas se hiperfosforilan y desensamblan; en la telofase se reensamblan con el rearmado de la membrana nuclear (analizado en el Cap. 19).

Los filamentos intermedios son dinámicos

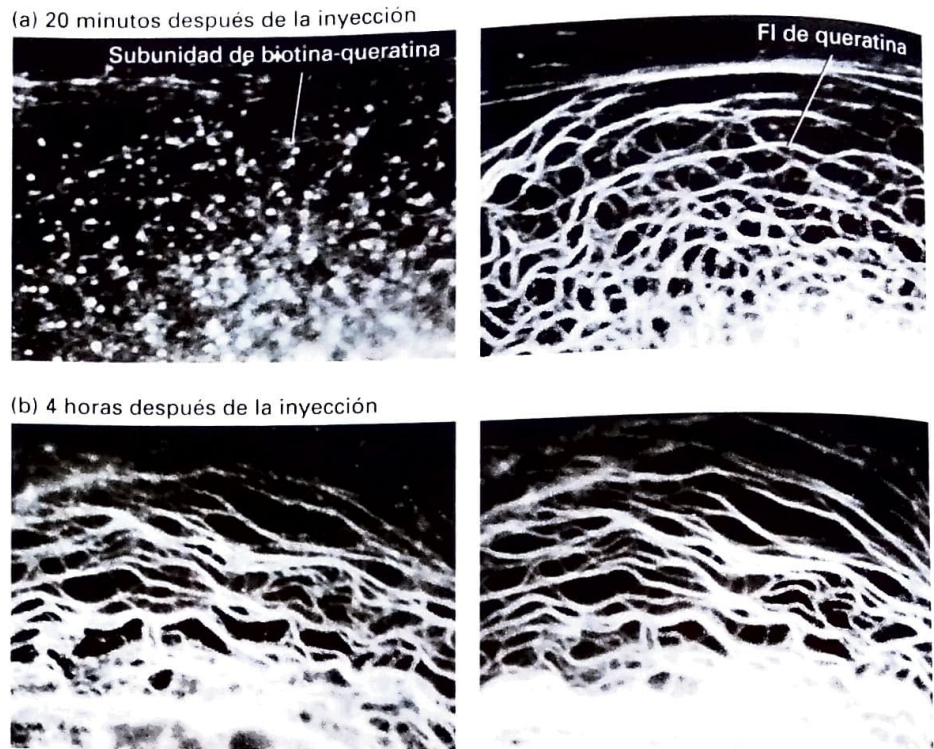
Si bien los filamentos intermedios son mucho más estables que los microtúbulos y los microfilamentos, las subunidades proteicas de los FI han mostrado encontrarse en equilibrio dinámico con el citoesqueleto de FI existente. En un experimento, una queratina tipo I marcada con biotina fue inyectada a los fibroblastos; a las dos horas, la proteína marcada había sido incorporada al citoesqueleto de queratina preexistente (Fig. 18-48). Los resultados de este y de otros experimentos demuestran que las subunidades de los FI de un reservorio soluble son capaces de autoadicionarse a los filamentos existentes y que las subunidades también pueden disociarse desde los filamentos intactos.

La estabilidad relativa de los filamentos intermedios presenta desafíos especiales en las células mitóticas, que deben reorganizar las tres redes del citoesqueleto durante el ciclo celular. En particular, la degradación de la envoltura nuclear inicialmente en la mitosis depende del desensamblaje de los filamentos de lamina que forman una red que sostiene la membrana. Como se analizó en el Capítulo 19, la fosforilación de las laminas nucleares por una cinasa mitótica dependiente de ciclina mitótica que se activa tempranamente en la mitosis (profase) induce el desensamblaje de los filamentos intactos y evita su reensamblaje. Posteriormente en la mitosis (telofase), la eliminación de estos fosfatos por fosfatasas específicas, promueve el reensamblaje de la lamina, lo cual resulta crítico para la nueva formación de la envoltura nuclear alrededor de los cromosomas hijos. Las acciones opuestas de las cinasas y fosfatasas, proporcionan así un rápido mecanismo para el control del estado de ensamblaje de los filamentos intermedios de lamina. Otros filamentos intermedios sufren un ensamblaje y reensamblaje semejante durante el ciclo celular.

Los defectos en las laminas y queratinas provocan muchas enfermedades

 Hay aproximadamente 50 mutaciones conocidas en el gen humano para la lamina tipo A que se sabe que provocan enfermedades, colectivamente llamadas laminopatías, muchas de las cuales inducen formas de la distrofia muscular de Emery-Dreifuss (DMED). Otras mutaciones en el gen de la lamina provocan miocardiopatía dilatada. No está claro por qué estas mutaciones en la lamina tipo A provocan DMED, pero quizás en los tejidos musculares los núcleos frágiles no pueden soportar el estrés y las tensiones del tejido, de modo que son los primeros en exhibir síntomas. Resulta interesante que otras formas de DMED han sido analizadas hasta detectar mutaciones en la emerina, la proteína de membrana que une lamina en la envoltura nuclear interna. Incluso, otras

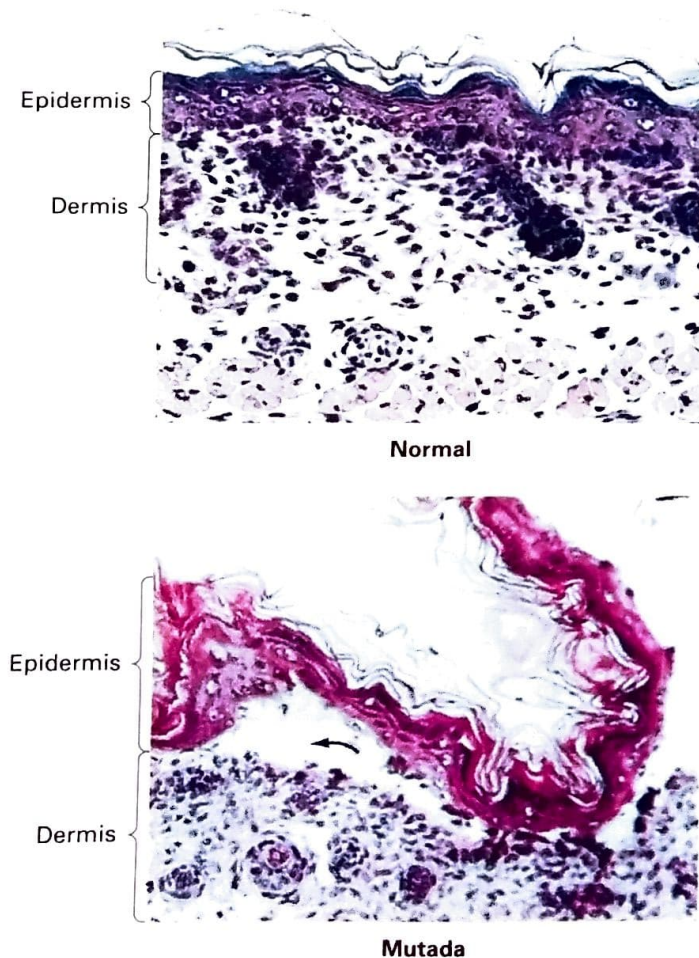
FIGURA EXPERIMENTAL 18-48 Los filamentos intermedios de queratina son dinámicos, en tanto se incorpore la queratina soluble a los filamentos. Se purificó queratina tipo I monomérica, marcada químicamente con biotina y microinyectada a células epiteliales vivas. Luego, las células se fijaron en diferentes momentos después de la inyección y se tiñeron con un anticuerpo contra biotina y anticuerpos contra queratina. (a) A los 20 minutos después de la inyección, la queratina inyectada marcada con biotina se concentra en pequeños focos dispersos en el citoplasma (*izquierda*) y no se ha integrado con el citoesqueleto de queratina endógena (*derecha*). (b) Después de 4 horas, la queratina marcada con biotina (*izquierda*) y los filamentos de queratina (*derecha*) muestran patrones idénticos, indicando que la proteína microinyectada se ha incorporado al citoesqueleto existente. (Tomado de R. K. Miller, K. Vistrom y R. D. Goldman, 1991, *J. Cell Biol.* 113:843, cortesía de R. D. Goldman.)



mutaciones en la lamina tipo A provocan progeria (el envejecimiento acelerado). El síndrome de progeria Hutchison-Gilford ("envejecimiento prematuro") es producido por un error de corte y empalme que resulta en una lamina A con un dominio C-terminal defectuoso.

La integridad estructural de la piel resulta esencial para soportar la abrasión. En los seres humanos y los ratones, las isoformas K4 y K14 de la queratina forman heterodímeros que se ensamblan en protofilamentos. Una K14 mutante con deleciones en el dominio N-terminal o C-terminal puede formar heterodímeros in vitro, pero no se ensambla en protofilamentos. La expresión de estas queratinas mutantes en las células genera redes de FI que se degradan en agregados. Los ratones transgénicos que expresan una proteína K14 mutante en las células troncales basales de la epidermis muestran anomalías generales de la piel, principalmente ampollas de la epidermis similares a las de la enfermedad de la piel *epidermólisis bullosa simple* (EBS). El examen histológico del área ampollada revela una alta incidencia de células basales muertas. La muerte de estas células parece estar provocada por el traumatismo mecánico resultante de la fricción de la piel durante el movimiento de los miembros. Sin sus haces de filamentos de queratina normales, las células basales mutantes se vuelven frágiles y se dañan fácilmente, provocando que las células epidérmicas que se encuentran por encima se

FIGURA EXPERIMENTAL 18-49 Los ratones transgénicos que llevan un gen de queratina mutante muestran formación de ampollas similares a lo que ocurre en la enfermedad epidermólisis bullosa simple de los seres humanos. Cortes histológicas a través de la piel de un ratón normal y de un ratón transgénico con un gen mutante de queratina K14. En el ratón normal, la piel consiste en una capa epidérmica externa dura, que la cubre y está en contacto con la capa blanda interna de la dermis. En la piel del ratón transgénico, ambas capas están separadas (flecha) debido al debilitamiento de las células de la base de la epidermis. (Tomado de P. Coulombe y cols., 1991, *Cell* 66:1031, cortesía de E. Fuchs.)



deslaminen y formen ampollas (Fig. 18-49). Al igual que el papel de los filamentos de desmina en el sostén de los tejidos musculares, el papel general de los filamentos de queratina parece consistir en mantener la integridad estructural de los tejidos epiteliales por el reforzamiento mecánico de las conexiones entre las células. ■

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 18.7

Filamentos intermedios

- Los filamentos intermedios son los únicos componentes fibrosos no polarizados del citoesqueleto y no tienen proteínas motoras asociadas. Los filamentos intermedios se construyen a partir de dímeros de espirales enrolladas que se asocian de modo antiparalelo en tetrámeros y luego en protofilamentos, 16 de los cuales constituyen el filamento (véase Fig. 18-47).
- Hay cinco clases principales de proteínas de los filamentos intermedios, de las cuales las laminas nucleares (clase V) son las más antiguas y ubicuas en las células animales. Las otras cuatro clases muestran expresión específica del tejido (véase Cuadro 18-1).
- Las queratinas (clases I y II) están presentes en el pelo y en las uñas de los animales, así como también en los filamentos de citoqueratina que se asocian con los desmosomas de las células epiteliales, para proporcionar fuerza a estas y a los tejidos.
- Los filamentos clase III incluyen vimentina, GFAP y desmina, que proporcionan estructura y orden a los discos Z musculares y restringen la sobreextensión del músculo liso.
- Los neurofilamentos constituyen la clase IV y son importantes para la estructura de los axones.
- Muchas enfermedades están asociadas con defectos de los filamentos intermedios, en especial las laminopatías, que incluyen una diversidad de afecciones y las mutaciones en los genes de la queratina, que pueden provocar defectos graves de la piel (véase Fig. 18-49).

18.8 Coordinación y cooperación entre elementos del citoesqueleto

Hasta el momento hemos analizado en general tres tipos de filamentos (los microfilamentos, los microtúbulos y los filamentos intermedios) en tanto su función es independiente entre sí. Sin embargo, el hecho de que el huso mitótico constituido por microtúbulos determine el sitio de formación del anillo contráctil integrado por microfilamentos es solo un ejemplo del modo en que estos dos sistemas del citoesqueleto se encuentran coordinados. Aquí mencionamos algunos otros ejemplos de vinculaciones, físicas y regulatorias entre los elementos del citoesqueleto y su integración en otros aspectos de la organización celular.

Las proteínas asociadas a los filamentos intermedios contribuyen a la organización celular

Se ha identificado a un grupo de proteínas denominadas colectivamente *proteínas asociadas a los filamentos intermedios (PAFI)* que se copurifican con los filamentos intermedios. Entre ellas se encuentran

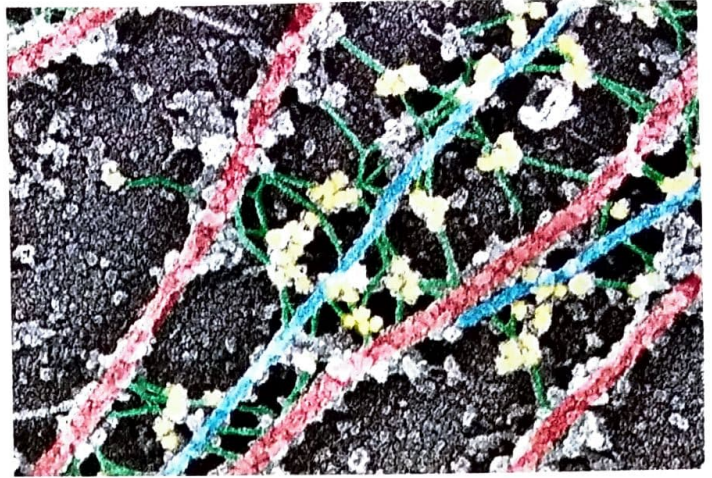


FIGURA EXPERIMENTAL 18-50 Los anticuerpos marcados con oro identifican los entrecruzamientos de la plectina entre los filamentos intermedios y los microtúbulos. En esta fotomicrografía inmuno-electrónica de un fibroblasto, los microtúbulos están destacados en rojo, los filamentos intermedios en azul y las fibras cortas que los conectan en verde. La tinción con los anticuerpos marcados en oro contra plectina (amarillo) revelan que estas fibras de conexión contienen plectina. (Tomado de T. M. Svitkina, A. B. Verkhovsky y G. G. Borisy, 1995, *J. Cell Biol.* **135**:991, cortesía de T. M. Svitkina.)

las pertenecientes a la familia de las **plaquinas**, que están implicadas en la unión de los filamentos intermedios a otras estructuras. Parte de ellas se asocian con filamentos de queratina para vincularlos a los desmosomas, que son las uniones existentes entre las células epiteliales que le proporcionan estabilidad a los tejidos y los hemidesmosomas, que se localizan en regiones de la membrana plasmática en las que los filamentos intermedios se encuentran vinculados a la matriz extracelular (estos temas son cubiertos en detalle en el Cap. 20). Otras plaquinas se encuentran a lo largo de los filamentos intermedios y tienen sitios de unión sobre los microfilamentos y los microtúbulos. Una de estas proteínas (llamada plectina) puede verse por microscopía inmuno-electrónica, que proporciona conexiones entre los microtúbulos y los filamentos intermedios (Fig. 18-50).

Los microtúbulos y microfilamentos cooperan para transportar melanosomas

Los estudios hechos en ratones mutantes con cubiertas de color claro, han revelado el modo en que los microtúbulos y microfilamentos cooperan para transportar gránulos de pigmento. El pigmento de color del pelo es producido por células llamadas melanocitos, muy similares a los melanóforos de los peces y las ranas, sobre los que se comentó previamente (véase Fig. 18-28). Los melanocitos se encuentran en el folículo piloso de la base del tallo capilar y contienen gránulos cargados de pigmento llamados melanosomas. Los melanosomas son transportados por las extensiones dendríticas de los melanocitos para la exocitosis ulterior a las células epiteliales que los rodean. El transporte a la periferia celular está mediado, tal como ocurre en las células de la rana, por un miembro de la familia de las cinesinas. En la periferia, luego son entregadas a la miosina V y son liberadas para la exocitosis. Si el sistema de miosina V es defectuoso, los melanosomas no son capturados y permanecen en el cuerpo celular. Así, los microtúbulos son responsables por el transporte de los melanosomas a grandes distancias, mientras que el

movimiento por la miosina V dependiente de los microfilamentos es dependiente de la captura y entrega en la corteza celular. Este tipo de división de tareas (el transporte a grandes distancias por medio de los microtúbulos y en distancias cortas por medio de los microfilamentos) ha sido encontrado en muchos sistemas diferentes, desde el transporte en hongos filamentosos hasta el transporte a lo largo de axones.

El Cdc42 coordina a los microtúbulos y los microfilamentos durante la migración celular

En el Capítulo 17, analizamos el modo en que la polaridad de una célula en migración está regulada por el Cdc42, lo que resulta en la formación de un borde conductor basado en actina en el frente de la célula y la contracción de la parte posterior (véanse Fig. 17-46 y Fig. 18-51, paso 1). La activación del Cdc42 en el frente de la célula conduce también a la polarización del citoesqueleto microtubular. Esto originariamente se estudió en los ensayos de curación de heridas (véase Fig. 17-45), en los que se notó que cuando las células del borde de una herida se inducían a polarizarse y moverse para llenar el espacio vacío, el complejo de Golgi se desplazaba delante del núcleo hacia el frente de la célula. La localización de Golgi en el frente de la célula indica que el centrosoma se mueve para quedar delante del núcleo (recuerde que la localización del Golgi depende de la localización del MTOC; véanse Figs. 18-1c y 18-27). Estudios recientes sugirieron el modo en que ocurre esto. La activación de Cdc42 al frente de la célula une el factor de polaridad Par6, que resulta en el reclutamiento del complejo dineína-dinactina (Fig. 18-51, paso 2). La dineína-dinactina de localización cortical interactúa luego con los microtúbulos, traccionándolos para orientar el centrosoma y así, la disposición radial completa de microtúbulos (Fig. 18-51, paso 3). Esta reorientación del sistema de microtúbulos lleva a la reorganización de la vía secretora para entregar los productos de secreción, en especial las integrinas, a fin de que se unan a la matriz extracelular al frente de la célula para su unión al sustrato, de manera que la célula pueda migrar (Fig. 18-51, paso 4).

El avance de los conos de crecimiento neural es coordinado por microfilamentos y microtúbulos

El sistema nervioso depende de la integración y transmisión de señales por las neuronas. Las neuronas tienen estructuras especializadas llamadas dendritas que reciben señales y un único axón que termina en una o más sinapsis de una célula diana o varias células diana (por ejemplo, otra neurona o una célula muscular) (véase Fig. 18-2). Es crítico que las neuronas hagan conexiones adecuadas, de modo que ¿cómo son guiados los axones a su destino correcto? Cuando el axón se extiende, tiene un cono de crecimiento terminal que detecta las señales de la matriz extracelular y ordena a las células guiarlo a lo largo del sendero correcto. Por lo tanto, el modo en que el cono de crecimiento recibe e interpreta las pistas para dirigir el crecimiento axónico es crítico para la función del sistema nervioso. Los conos de crecimiento son muy ricos en actina, y típicamente tienen un lamelipodio amplio y múltiples filopodios (Fig. 18-52a). También resultan esenciales, para la guía de los conos de crecimiento, los microtúbulos. Recuerde que los axones tienen microtúbulos de polaridad uniforme, sobre la cual son transportados los materiales para el desarrollo del cono de crecimiento mediante el transporte axónico (véase Fig. 18-5e). Estos microtúbulos se extienden al cono de crecimiento y, junto con la actina, están involucrados en guiar la dirección de avance del cono de crecimiento. Mientras que la actina es necesaria para el avance del cono de crecimiento, los microtúbulos y la actina (en conjunto) son necesarios para guiar el crecimiento en la dirección correcta. Aunque el mecanismo aún no se ha comprendido por completo, se ha encontrado que una señal de crecimiento local altera la dinámica de la actina, con el resultado de que los microtúbulos se extienden en esa región. Se ha encontrado también que los microtúbulos del tallo del axón tienen modificaciones postraduccionales (tales como la acetilación) que los estabiliza, mientras que los microtúbulos más dinámicos del cono de crecimiento con frecuencia carecen de estas modificaciones (Fig. 18-52b).

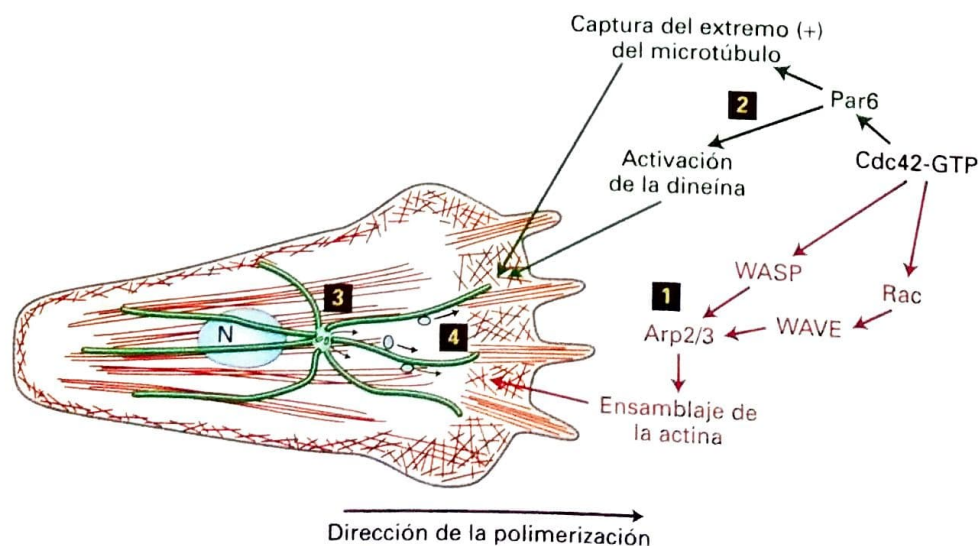


FIGURA 18-51 Regulación de los microfilamentos y de los microtúbulos independiente de Cdc42 para polarizar una célula en migración. El Cdc42-GTP activo del frente de las células conduce a la activación Rac y WASP, que resultan en el ensamblaje de un borde conductor basado en microfilamentos (paso 1). De modo independiente, el Cdc42-GTP también lidera la captura de los extremos (+) de los microtúbulos y la activación de la dineína

(paso 2). Juntos, estos traccionan los microtúbulos para orientar el centrosoma (paso 3) hacia el frente de la célula. Esta reorientación polariza la vía de secreción para la entrega, a lo largo de los microtúbulos, de moléculas de adhesión transportadas en vesículas de secreción (paso 4). (Sobre la base de estudios de S. Etienne-Manneville y cols., 2005, *J. Cell Biol.* 170:895-901.)

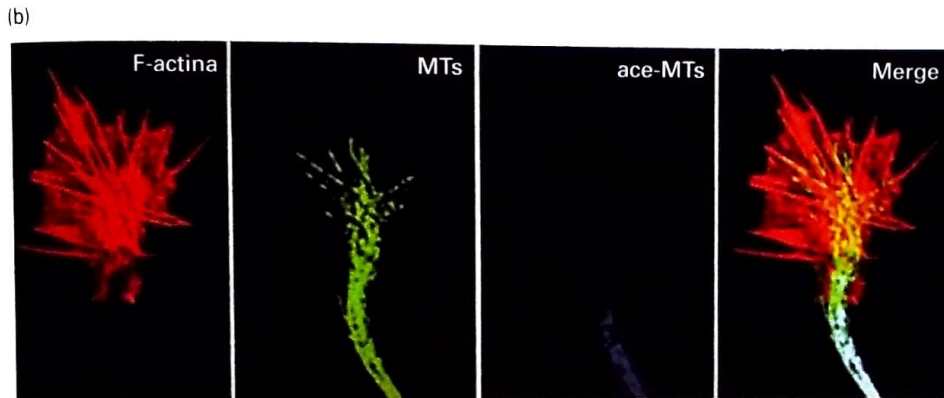
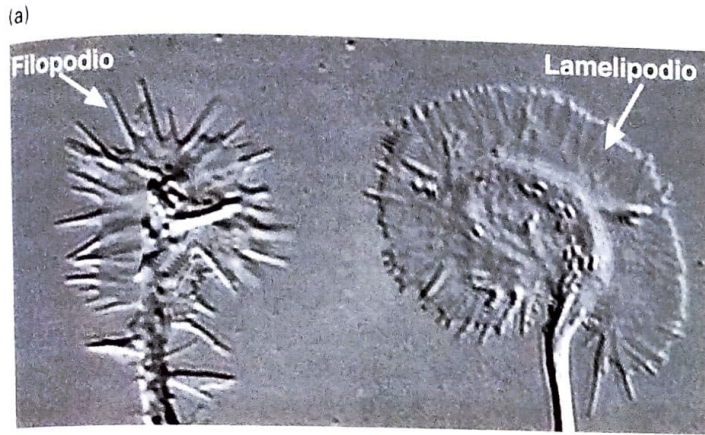


FIGURA EXPERIMENTAL 18-52 El crecimiento del cono neuronal contiene filamentos de actina dinámicos y microtúbulos. (a) Dos conos de crecimiento vistos con microscopía DIC que muestra sus regiones de filopodios y lamelipodios. (b) Localización de los filamentos de actina (rojo), microtúbulos (verde) y microtúbulos acetilados (azul), en un pequeño cono de crecimiento. Nótese de qué manera los microtúbulos acetilados estables se localizan hacia el tallo del axón y no penetran al cono de crecimiento dinámico. (Tomado de E. W. Bent y F. B. Gertler, 2003, *Neuron* **40**:209-227.)

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 18.8

Coordinación y cooperación entre los elementos del citoesqueleto

- Los filamentos intermedios están vinculados tanto a sitios de unión específicos de la membrana plasmática (llamados desmosomas y hemidesmosomas), como a microfilamentos y microtúbulos (véase Fig. 18-50).
- En las células animales, los microtúbulos generalmente son utilizados para la entrega de orgánulos a gran distancia, mientras que los microfilamentos manejan su entrega local.
- La molécula de señalización Cdc42 regula de modo coordinado a los microfilamentos y los microtúbulos durante la migración celular.
- El avance de los conos de crecimiento en las neuronas requiere la interacción de los microfilamentos y los microtúbulos.

Perspectivas para el futuro

En los Capítulos 17 y 18, hemos visto el modo en que los microfilamentos, los microtúbulos y los filamentos intermedios, proporcionan estructura y organización a las células. Sin este sistema elaborado, las células carecerían de todo orden y así, de toda posibilidad de función o división. El nombre “citoesqueleto” sugiere una estructura relativa-

mente estática sobre la cual está colgada la organización celular. Sin embargo, el citoesqueleto es de hecho un marco dinámico que responde a vías de transducción de las señales y que opera tanto en el modo local como global, a fin de proporcionar a las células orden para llevar a cabo sus funciones.

En resumen, hemos desentrañado muchas de las funciones diferentes y comunes de los tres sistemas de filamentos. Sabemos de la mayoría de los componentes y probablemente de todos los motores. Sin embargo, de muchos modos esto es simplemente un comienzo excitante. Con los genomas disponibles secuenciados y, al menos en principio, un inventario completo de los componentes del citoesqueleto, tenemos la lista de partes. Sin embargo, la lista de partes es simplemente eso; lo que necesitamos es comprender de qué manera las partes se ensamblan en procesos específicos.

Un área muy activa de investigación hoy en día, es usar esa lista de partes para identificar sistemáticamente la localización (a través de fusiones con PFV), las funciones (a través de *knockdown* con RNAi) y los socios (a través del aislamiento de complejos proteicos) de todos los componentes del citoesqueleto. Considere que hay aproximadamente 45 genes animales que codifican para los miembros de la familia de las cinesinas y solo conocemos un pequeño subconjunto de ellos, o qué carga llevan o para qué propósito. En cada caso, es razonable suponer que los motores están regulados, pero actualmente se sabe muy poco acerca del modo en que esto ocurre. Será importante comprender de qué manera los motores levantan la carga adecuada y luego la disocian cuando llegan a su destino. Cuando comencemos a poner todas las piezas en su lugar, tendremos cada vez más posibilidades de reconstituir los procesos específicos in vitro. Algunos aspectos del huso mitótico ya

se han reconstituido, lo cual es un comienzo estimulante, pero pasará cierto tiempo antes de que sea posible reconstituir el proceso completo.

La biología estructural jugará un papel central, porque nos permitirá ver en detalle el modo en que operan los diferentes componentes. Considere el gran número de proteínas que se asocian con el extremo (+) del microtúbulo, las llamadas +TIP. Conocemos algo acerca de cómo mantienen su asociación en el extremo y trabajos recientes han sugerido que las asociaciones pueden cambiar en diferentes partes de la célula (nuevamente, solo estamos comenzando a ver el modo en que están regulados estos procesos).

Quizás el desafío más grande –y el más excitante– es descubrir de qué manera las vías de transducción de las señales coordinan funciones entre todos los elementos distintos del citoesqueleto, dentro de una célula individual y en diferentes contextos celulares. En este momento está comenzando a comprenderse de qué manera las células organizan y regulan diferentes procesos en varias regiones dentro de una única célula. Estamos comenzando a echar vistazos acerca de qué es lo que hay sobre vías de transducción de las señales que regulan la polaridad celular y permiten la migración de las células.

Aunque probablemente todos estos estudios están fundamentados en la biología celular básica, como podremos ver a partir de los estudios del transporte intraflagelar y de los filamentos intermedios, dichos estudios con frecuencia abren una ventana para comprender las bases de las enfermedades, desde las cuales pueden desarrollarse estrategias terapéuticas. La interrelación entre la biología celular básica y la medicina contribuye enormemente al interés y al valor social del trabajo en esta área.

Palabras clave

anafase 850	transporte intraflagelar (TIF) 846
anterógrado 833	queratinas 862
ásteres 849	cinesinas 833
transporte axónico 833	cinetocoros 850
axonema 845	láminas 862
cuerpo basal 845	metafase 850
centrómero 852	microtúbulo 821
centrosoma 824	proteínas asociadas a los
cilios 844	microtúbulos (MAP) 822
citocinesis 851	centro organizador de
desmina 863	microtúbulos (MTOC) 824
inestabilidad dinámica 828	mitosis 849
dineínas 833	huso mitótico 849
flagelos 844	neurofilamentos 862
complejo anular de tubulina γ	cilio primario 847
(TuRC-γ) 825	profase 849
filamento intermedio 821	protofilamento 822
proteínas asociadas	retrógrado 833
a los filamentos	telofase 851
intermedios (PAFI) 865	tubulina 822

Revisión de los conceptos

1. Los microtúbulos son filamentos polares; esto es, un extremo es diferente del otro. ¿Cuál es la base de esta polaridad, cómo se relaciona con la organización microtubular dentro de las células y cómo está relacionada con los movimientos intracelulares impulsados por motores dependientes de microtúbulos?

2. Los microtúbulos, tanto in vitro como in vivo, sufren inestabilidad dinámica y se piensa que este tipo de ensamblaje es intrínseco del microtúbulo. ¿Cuál es el modelo actual que da cuenta de esta inestabilidad dinámica?

3. En las células, el ensamblaje de los microtúbulos depende de otras proteínas, así como de la concentración de tubulina y de la temperatura. ¿Qué tipos de proteínas influyen en el ensamblaje de los microtúbulos in vivo y de qué manera afecta este proceso cada tipo de ellas?

4. Los microtúbulos dentro de la célula parecen estar dispuestos en configuraciones específicas. ¿Qué estructura celular es responsable de determinar la estructura de los microtúbulos dentro de una célula? ¿Cuántas estructuras de este tipo están presentes en una célula típica? Describa de qué manera estas estructuras sirven para nuclear el ensamblaje de los microtúbulos.

5. Muchos fármacos que inhiben la mitosis se unen de modo específico a la tubulina, a los microtúbulos o a ambos. ¿Qué enfermedades son tratadas con estos fármacos? Hablando desde el punto de vista funcional, estos pueden ser divididos en dos grupos sobre la base de su efecto en el ensamblaje de los microtúbulos. ¿Cuáles son los dos mecanismos mediante los cuales estos fármacos alteran la estructura de los microtúbulos?

6. La cinesina-1 fue el primer miembro de la familia de los motores de cinesina identificada y por lo tanto, es quizás el miembro de la familia mejor caracterizado. ¿Qué propiedad fundamental de la cinesina fue empleada para purificarla?

7. Ciertos componentes celulares parecen moverse bidireccionalmente sobre los microtúbulos. Describa el modo en que esto es posible, dado que la orientación de los microtúbulos está fijada por el MTOC.

8. Las propiedades móviles de las proteínas motoras cinesinas implican tanto al dominio motor como al dominio vinculante. Describa el papel de cada uno de estos dominios en el movimiento de las cinesinas, la dirección de su movimiento o ambos. La cinesina-1, con una cabeza inactiva, ¿podría mover de manera eficiente una vesícula a lo largo de un microtúbulo?

9. ¿Qué características del complejo de dinactina permiten que la dineína citoplasmática transporte carga hacia el extremo (–) del microtúbulo? ¿Qué efecto podría tener la inhibición de las interacciones de la dinactina con la EB1 + TIP sobre la orientación del huso en las células?

10. La natación de las células depende de los apéndices que contienen microtúbulos. ¿Cuál es la estructura subyacente de estos apéndices y de qué manera estas estructuras generan la fuerza necesaria para producir la natación?

11. ¿Qué efecto tendría la inactivación de la dineína sobre el transporte de TIF dependiente de la cinesina-2?

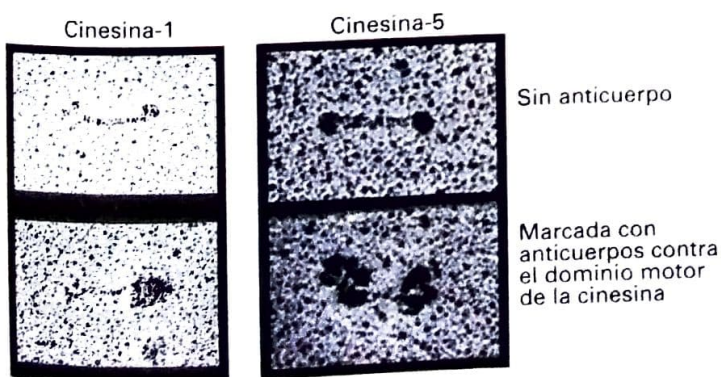
12. El huso mitótico con frecuencia se describe como una maquinaria celular basada en microtúbulos. Los microtúbulos que constituyen el huso mitótico pueden ser clasificados en tres tipos distintos. ¿Cuáles son los tres tipos de microtúbulos del huso y cuál es la función de cada uno de ellos?

13. La función del huso mitótico descansa en gran medida en los motores de los microtúbulos. Para cada una de las proteínas motoras siguientes, prediga el efecto sobre la formación, la función (o ambas) del huso añadiendo un fármaco que inhiba específicamente solo el siguiente motor: cinesina-5, cinesina-13 y cinesina-4.

14. El movimiento de los cinetocoros hacia los polos (y así, hacia las cromátidas) durante la anafase A, requiere que los cinetocoros se mantengan unidos sobre los microtúbulos que se acortan. ¿De qué manera un cinetocoro se sostiene sobre los microtúbulos que se acortan?
15. La anafase B implica la separación de los polos del huso. ¿Qué fuerzas se ha propuesto que impulsan esta separación? ¿Qué mecanismos moleculares subyacentes se cree que proporcionan estas fuerzas?
16. La citocinesis, el proceso de división del citoplasma, ocurre poco después de que las cromátidas hermanas separadas se han acercado a los polos opuestos del huso. ¿De qué manera está determinado el plano de la citocinesis? ¿Cuáles son los papeles respectivos de los microtúbulos y los filamentos de actina en la citocinesis?
17. La mejor estrategia para tratar un tipo específico de tumor humano puede depender de la identificación del tipo de célula que se transformó en cancerosa para dar origen al tumor. Para ciertos tumores que han formado metástasis (se han movido) para colonizar una ubicación distante, la identificación del tipo celular parental puede ser difícil. Dado que el tipo de proteína FI expresada es específica del tipo celular, el empleo de anticuerpos monoclonales que reaccionan con solo un tipo de proteína del FI puede ayudar a esta identificación. ¿Contra qué proteínas del FI usaría anticuerpos monoclonales para identificar: (a) un sarcoma de origen muscular; (b) un carcinoma originado en células epiteliales; y (c) un astrocitoma?
18. Explique por qué no hay motores conocidos que usen los filamentos intermedios como vías.
19. Los conos de crecimiento son regiones muy móviles de las neuronas en desarrollo. ¿Qué evita que el cono de crecimiento se mueva o se colapse hacia atrás, dirigiéndose hacia el cuerpo celular, como ocurre frecuentemente con los lamelipodios?

Análisis de los datos

1a. La kinesina-1 contiene dos cadenas pesadas idénticas y por lo tanto, tiene dos dominios motores idénticos. Por el contrario, la kinesina-5 contiene cuatro cadenas pesadas idénticas. El análisis, hecho por microscopía electrónica, de kinesinas sombreadas con metales resulta en las imágenes que se muestran en el panel superior. El pretratamiento de estas kinesinas con un anticuerpo que se une específicamente al dominio motor de la proteína, resulta en las imágenes que se muestran en el panel inferior. Las cuatro imágenes tienen aproximadamente el mismo aumento. ¿Qué puede deducir acerca de la estructura de la kinesina-5 a partir de estos datos?



b. Para determinar si la kinesina-5 es un motor del extremo (+) o (-) del microtúbulo, se generan microtúbulos con polaridad marcada por el ensamblaje de microtúbulos cortos desde la tubulina muy brillante y luego la elongación de estos microtúbulos cortos, brillantes, usando una tubulina menos fluorescente. Como resultado de ello, los microtúbulos son muy fluorescentes en un extremo y poco fluorescentes a lo largo de la mayoría de su longitud. Luego, se cubre una cámara de perfusión con kinesina-5 purificada, que se inmoviliza sobre la superficie de vidrio. Después, la cámara se perfunde con los microtúbulos con la polaridad marcada y ATP y se observan los microtúbulos que se deslizan con respecto a la kinesina-5. Se obtiene la siguiente secuencia de imágenes. ¿Qué extremo de estos microtúbulos, el más brillante o el menos brillante, es el (+)? ¿Estos microtúbulos se deslizan sobre la kinesina-5 liderando con su extremo (+) o (-)? Sobre la base de estos datos, ¿la kinesina-5 es un motor de extremo (+) o (-) del microtúbulo?

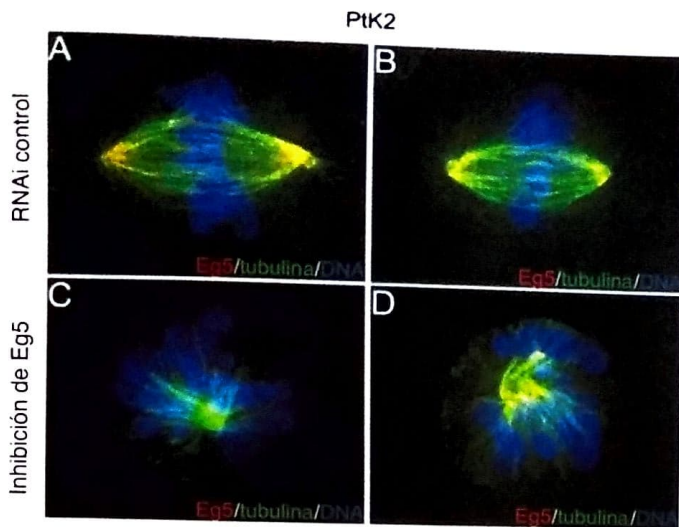


c. La kinesina-5 puede formar puentes cruzados con microtúbulos adyacentes. Se ensamblan microtúbulos de polaridad marcada en los cuales la tubulina unida a un colorante fluorescente rojo se ensambla para formar microtúbulos rojos cortos, que luego se alargan, con tubulina unida a un colorante fluorescente verde. Los microtúbulos se mezclan con kinesina-5 y se observan por microscopía de fluorescencia a medida que se añade ATP. Las siguientes imágenes muestran una secuencia temporal de dos microtúbulos que se superponen y forman puentes cruzados cuando se añade ATP. La cabeza de flecha se encuentra en una posición fija. ¿Puede explicar lo que ocurre cuando se añade ATP a los microtúbulos que han formado puentes cruzados por acción de la kinesina-5?



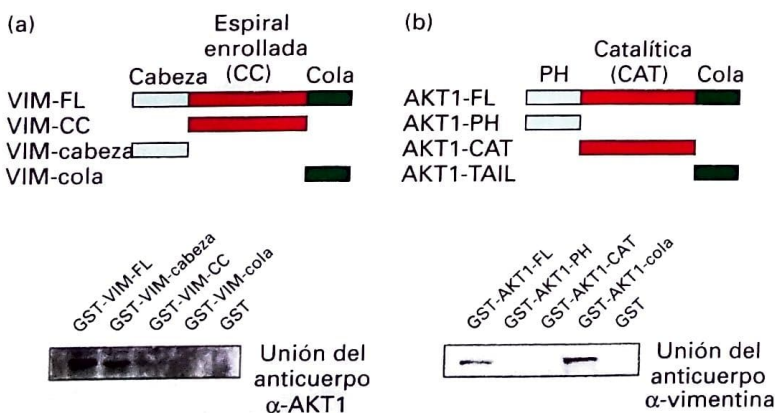
d. La Eg5 es un miembro de la familia de la kinesina-5 de *Xenopus*. Para comprender la función de Eg5 in vivo, las células son transfecta-

das con RNAi dirigido contra este motor. Las siguientes imágenes son obtenidas de células en mitosis. ¿Qué función desempeñaría Eg5 en las células?



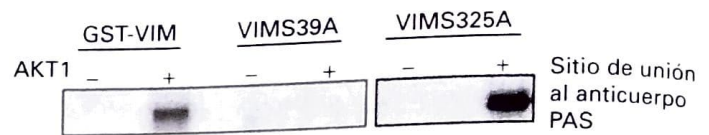
2. La vía de señalización PI3K/AKT es aberrante en una gran variedad de cánceres. En las células de sarcoma de tejidos blandos (STS), la activación de AKT1 induce la movilidad e invasividad celulares, que conducen a la metástasis agresiva de las células. La AKT1 mostró su capacidad de unirse a la vimentina (véase Q-S Zhu y cols., 2010, *Vimentin is a novel AKT1 target mediating motility and invasion*, *Oncogene* 30:457-470; doi:10.1038/onc.2010.421; publicado en línea el 20 de septiembre del 2010).

a. Para mapear los dominios de interacción entre la vimentina y la AKT, la vimentina y la AKT1 en toda su longitud y los constructos de fragmentos indicados más abajo, se expresaron como proteínas de fusión con GST. Cada uno de los constructos de fusión-GST unidos a cuentas de glutatión, fue usado para traccionar proteínas asociadas a partir de lisados crudos de células STS. ¿Qué revelaron los análisis de Western blot de las pastillas que emplearon anticuerpo AKT1 acerca del dominio de unión a AKT de la vimentina? ¿Qué reveló el análisis de las pastillas cuando se emplearon anticuerpos contra vimentina acerca del dominio de unión a vimentina en AKT1?

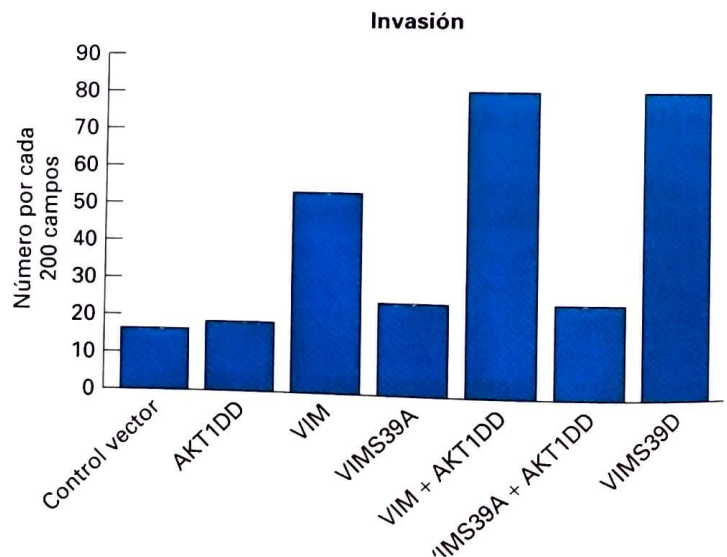


b. La AKT1 es una cinasa y por lo tanto es probable que fosforile la vimentina. Los análisis de secuencia revelaron que las serinas (S) de las posiciones 39 y 325 de la vimentina eran sitios probables para la fosfo-

rilación de la AKT1. Para comprobar si uno o ambos sitios se fosforilaban por AKT1, cada uno de ellos se mutó a alanina (A), que no puede ser fosforilada. Cada vimentina mutada con alanina fue mezclada con AKT1 y probada en su capacidad de fosforilarse por análisis de Western blot, empleando un anticuerpo que reacciona con serinas fosforiladas-AKT1 (anticuerpo PAS). ¿Qué sitio o sitios fosforila la AKT1?



c. La propensión de las células cancerosas para hacer metástasis puede medirse con un ensayo de invasividad, en el cual las células migran a través de un filtro cubierto con proteínas de una matriz extracelular (ECM). Cuantas más células migren a través de la ECM, mayor es la propensión a hacer metástasis. El ensayo de invasividad fue empleado para hacer un seguimiento de los efectos de la expresión de la mutación activa permanente de AKT1 (AKT1DD) y de la sobreexpresión de la vimentina silvestre, una mutación de vimentina que no puede ser fosforilada por la AKT1 (VIMS39A) y una mutación de vimentina fosfomimética (VIMS39D) en la cual la mutación de la S39 a un residuo de aspartato (D) mimetiza la fosforilación de la serina. ¿Qué efecto tiene la sobreexpresión de la vimentina y la fosforilación de esta sobre la migración celular?



Referencias

Estructura y organización de los microtúbulos

- Badano, J. L., T. M. Teslovich, and N. Katsanis. 2005. The centrosome in human genetic disease. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6:194-205.
- Doxsey, S. 2001. Re-evaluating centrosome function. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2:688-698.
- Dutcher, S. K. 2001. The tubulin fraternity: alpha to eta. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13:49-54.

Nogales, E., and H-W Wang. 2006. Structural intermediates in microtubule assembly and disassembly: how and why? *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**:179-184.

Dinámica de los microtúbulos

Cassimeris, L. 2002. The oncoprotein 18/stathmin family of microtubule destabilizers. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**:18-24.

Desai, A., and T. J. Mitchison. 1997. Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13**:83-117.

Howard, J., and A. A. Hyman. 2003. Dynamics and mechanics of the microtubule plus end. *Nature* **422**:753-758.

Regulación de la estructura y dinámica de los microtúbulos

Akhmanova, A., and M. O. Steinmetz. 2010. Microtubule +TIPs at a glance. *J. Cell Science* **123**:3414-3418.

Galjart, N. 2005. CLIPs and CLASPs and cellular dynamics. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **6**:487-498.

Hammond, J. W., D. Cai, and K. J. Verhey. 2008. Tubulin modifications and their cellular functions. *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**:71-76.

Wloga, D., and J. Gaertig. 2010. Post-translational modifications of microtubules. *J. Cell Science* **123**:3447-3455.

Cinesinas y dineínas: proteínas motoras de los microtúbulos

Web site: Kinesin Home Page, <http://www.cellbio.duke.edu/kinesin/>

Burgess, S. A., et al. 2003. Dynein structure and power stroke. *Nature* **421**:715-718.

Carter, A. P., C. Carol, L. Jin, and R. D. Vale. 2011. The crystal structure of dynein. *Science* **331**:1159-1165.

Dell, K. R. 2003. Dynactin polices two-way organelle traffic. *J. Cell Biol.* **160**:291-293.

Dujardin, D. L., and R. B. Vallee. 2002. Dynein at the cortex. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**:44-49.

Endow, S. A., F. J. Kull, and H. Liu. 2010. Kinesins at a glance. *J. Cell Science* **123**:3420-3424.

Goldstein, L. S. 2001. Kinesin molecular motors: transport pathways, receptors, and human disease. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* **98**:6999-7003.

Hirokawa, N., N. Noda, Y. Tanaka, and S. Niwa. 2009. Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **10**:682-696.

Hirokawa, N., and R. Takemure. 2003. Biochemical and molecular characterization of diseases linked to motor proteins. *Trends Cell Biol.* **28**:558-565.

Kardon, J. R., and R. D. Vale. 2009. Regulators of the cytoplasmic dynein motor. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **10**:854-865.

Lawrence, C. J., et al. 2004. A standardized kinesin nomenclature. *J. Cell Biol.* **167**:19-22.

McKenney, R. J., et al. 2010. LIS1 and NudE induce a persistent dynein force-producing state. *Cell* **141**:304-314.

Schroer, T. A. 2004. Dynactin. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**:759-779.

Vale, R. D. 2003. The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* **112**:467-480.

Vale, R. D., and R. A. Milligan. 2000. The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. *Science* **288**:88-95.

Verhey, K. J., and J. W. Hammond. 2009. Traffic control: regulation of kinesin motors. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **10**:765-777.

Wordeman, L. 2005. Microtubule-depolymerizing kinesins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**:82-88.

Yildiz, A., M. Tomishige, R. D. Vale, and P. R. Selvin. 2004. Kinesin walks hand-over-hand. *Science* **303**:676-678.

Cilios y flagelos: estructuras de superficie construidas sobre los microtúbulos

Gerdes, J. M., E. E. Davis, and N. Katsanis. 2009. The vertebrate primary cilium in development, homeostasis, and disease. *Cell* **137**:32-45.

Ishikawa, H., and W. F. Marshall. 2011. Ciliogenesis: building the cell's antenna. *Nature Mol. Cell Biol.* **12**:222-234.

Jin, H., et al. 2010. The conserved Bardet-Biedl syndrome proteins assemble a coat that traffics membrane proteins to cilia. *Cell* **141**:1208-1218.

Rosenbaum, J. L., and G. B. Witman. 2002. Intraflagellar transport. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **3**:813-825.

Singla, V., and J. F. Reiter. 2006. The primary cilium as the cells' antenna: signaling at a sensory organelle. *Science* **313**: 629-633.

Mitosis

Web site: <http://www.cellbio.duke.edu/kinesin/FxnSpindleMotility.html>

Alushin, G. M., et al. 2010. The Ndc80 kinetochore complex forms oligomeric arrays along microtubules. *Nature* **467**:805-810.

Cheeseman, I. M., and A. Desai. 2008. Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **9**:33-46.

Cleveland, D. W., Y. Mao, and K. F. Sullivan. 2003. Centromeres and kinetochores: from epigenetics to mitotic checkpoint signaling. *Cell* **112**:407-421.

Gadde, S., and R. Heald. 2004. Mechanisms and molecules of the mitotic spindle. *Curr. Biol.* **14**:R797-R805.

Goshima, G., et al. 2009. Augmin: a protein complex required for centrosome-independent microtubule generation within the spindle. *J. Cell Biol.* **181**:421-429.

Heald, R., et al. 1997. Spindle assembly in *Xenopus* egg extracts: respective roles of centrosomes and microtubule self-organization. *J. Cell Biol.* **138**:615-628.

Kim, Y., A. J. Holland, W. Lan, and D. W. Cleveland. 2010. Aurora kinases and protein phosphatase 1 mediate chromosome congression through regulation of CENP-E. *Cell* **142**: 444-455.

Kinoshita, K., B. Habermann, and A. A. Hyman. 2002. XMAP215: a key component of the dynamic microtubule cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* **12**:267-273.

Liu, D., et al. 2009. Sensing chromosome bi-orientation by spatial separation of Aurora B kinase from kinetochore substrates. *Science* **323**:1350-1353.

Mitchison, T. J., and E. D. Salmon. 2001. Mitosis: a history of division. *Nature Cell Biol.* **3**:E17-E21.

Rogers, G. C., et al. 2004. Two mitotic kinesins cooperate to drive sister chromatid separation during anaphase. *Nature* **427**:364-370.

Ruchaud, S., M. Carmena, and W. C. Earnshaw. 2007. Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **8**:798-812.

Santaguida, S., and A. Musacchio. 2009. The life and miracle of kinetochores. *EMBO Journal* **28**:2511-2531.

Urges, G. 2005. Cytokinesis in higher plants. *Ann. Rev. Plant Biol.* **56**:281-299.

Wittmann, T., A. Hyman, and A. Desai. 2001. The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. *Nature Cell Biol.* **3**:E28-E34.

Filamentos intermedios

Intermediate Filaments Database: <http://www.interfil.org/index.php>

Colakoglu, G., and A. Brown. 2009. Intermediate filaments exchange subunits along their length and elongate by end-to-end annealing. *J. Cell Biol.* **185**: 769-777.

Goldman, R. D., et al. 2002. Nuclear lamins: building blocks of nuclear architecture. *Genes Dev.* **16**: 533-547.

Herrmann, H., and U. Aebi. 2000. Intermediate filaments and their associates: multi-talented structural elements specifying cytoarchitecture and cytodynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**: 79-90.

Mattout, A., et al. 2006. Nuclear lamins, disease and aging. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**: 335-341.

Coordinación y cooperación entre los elementos del citoelementos

Web site: Melanophones, <http://www.cellbio.duke.edu/kinesin/Melanophone.html>

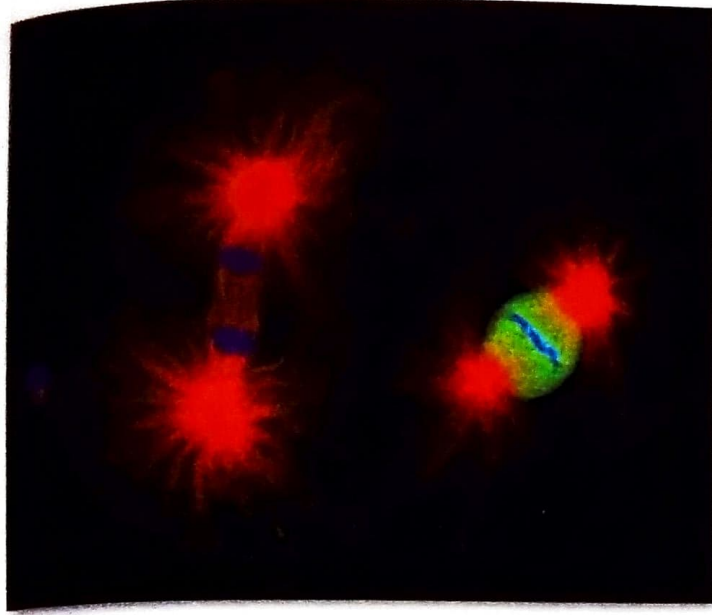
Chang, L., and R. D. Goldman. 2004. Intermediate filaments mediate cytoskeletal crosstalk. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **5**: 601-613.

Etienne – Manneville, S., et al. 2005. Cdc42 and Par6-PKC ζ regulate the spatially localized association of Dlg1 and APC to control cell polarization. *J. Cell Biol.* **170**: 895-901.

Kodama A. , T. Lechler , and E. Fuchs. 2004. Coordinating cytoskeletal tracks to polarize cellular movements. *J. Cell Biol.* **167**: 203-207.

Schaefer, A. W., et al. 2008. Coordination of actin filament and microtubule dynamics during neurite outgrowth. *Dev. Cell* **15**: 146-162.

Wu, X., X. Xiang, and J. A. Hammer III. 2006. Motor proteins at the microtubule plus-end. *Trends Cell Biol.* **16**: 135-143.



Embrión *C. elegans* de dos células teñido con anticuerpos contra la tubulina (rojo) y CeBUB-1, una proteína que controla el huso (verde). El DNA se tiñe con DAPI (azul). La CeBUB-1 se encuentra en los cromosomas y en los cinetocoros unidos a los microtúbulos del huso durante la metafase en la célula más pequeña y posterior (*derecha*). Se presume que controla la unión y la tensión entre cromosomas. La célula más grande y anterior (*izquierda*) ya entró en la anafase, y la CeBUB-1 ya no puede detectarse en los cromosomas ni en los microtúbulos del huso. Así, la asincronía del segundo ciclo celular en el embrión *C. elegans* permite observar tanto la presencia de una proteína funcional que controla el huso durante la metafase como su ausencia después del inicio de la anafase. (Encanada y cols, 2005, *Mol. Biol. Cell.* **16**:1056)

El ciclo celular de las células eucariontes

El control adecuado de la **división celular** es vital para todos los organismos. En los organismos unicelulares, la división y el crecimiento celular deben estar equilibrados entre sí, de modo tal que se mantenga adecuadamente el tamaño de la célula. Si ocurren muchas divisiones antes de que las células parentales hayan alcanzado el tamaño adecuado, las células hijas finalmente serán demasiado pequeñas como para ser viables. Si las células crecen demasiado antes de la división celular, funcionan de manera inapropiada y la cantidad de células aumenta lentamente. En los organismos multicelulares en desarrollo, la replicación de cada célula debe estar controlada y cronometrada de forma precisa para completar de manera fiel y reproducible el programa de desarrollo en cada individuo. Cada tipo de célula en todos los tejidos debe controlar su replicación precisamente para el desarrollo normal de órganos complejos, como el cerebro o los riñones. En un adulto normal, las células se dividen solo cuando y donde son necesarias. Sin embargo, la pérdida de los controles normales en la replicación

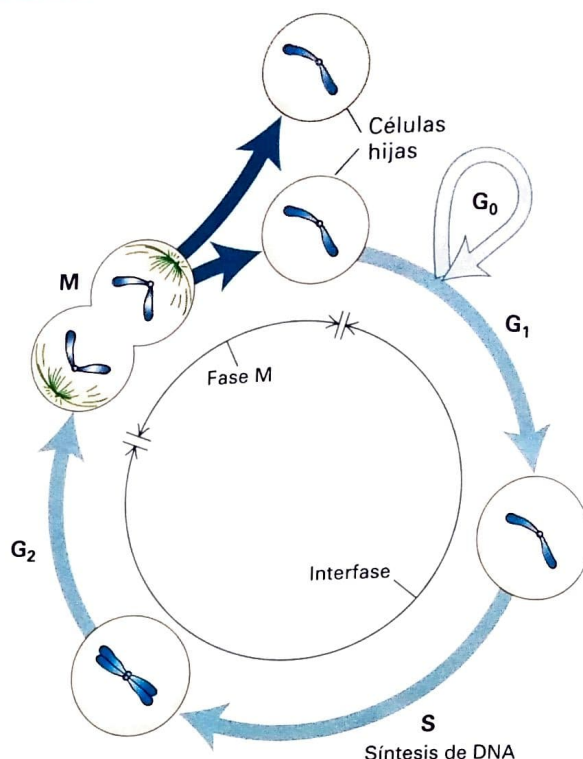
celular es el defecto fundamental del cáncer, una enfermedad muy conocida que mata a una cada seis personas en los países desarrollados (véase el Cap. 24). Los mecanismos moleculares que regulan la división celular de los eucariontes que se analizan en este capítulo explican con gran detalle de qué manera falla el control de la replicación en las células cancerígenas. Apropiadamente, Leland Hartwell, Tim Hunt y Paul Nurse recibieron el premio Nobel de Medicina en 2001 por los experimentos iniciales que esclarecían los grandes reguladores de la división celular en todos los eucariontes.

El término **ciclo celular** hace referencia a la serie de eventos ordenados que llevan a la división celular y a la producción de dos células hijas, cada una de las cuales contiene cromosomas idénticos a los de la célula parental. Durante el ciclo celular, ocurren dos procesos moleculares principales, con intervalos de reposo entre uno y otro: durante la fase S del ciclo, cada cromosoma parental se duplica para formar dos cromátidas hermanas idénticas; en la mitosis (fase M), las cromátidas

CONTENIDO

19.1	Generalidades del ciclo celular y su control	875	19.5	Entrada en mitosis	897
19.2	Organismos modelo y métodos para estudiar el ciclo celular	877	19.6	Fin de la mitosis: segregación de cromosomas y salida de la mitosis	903
19.3	Regulación de la actividad de la cinasa dependiente de ciclina (CDK)	883	19.7	Mecanismos de vigilancia en la regulación del ciclo celular	906
19.4	Compromiso con el ciclo celular y replicación del DNA	890	19.8	Meiosis: un tipo especial de división celular	913

FIGURA 19-1 Destino de un cromosoma parental individual durante todo el ciclo celular eucariótico. Después de la mitosis (M), las células hijas contienen $2n$ cromosomas en los organismos diploides y $1n$ cromosomas en los organismos haploides. En las células en proliferación, G_1 es el período entre el “nacimiento” de una célula después de la mitosis y la iniciación de la síntesis de DNA, lo cual marca el inicio de la fase S. Al final de la fase S, las células entran en G_2 con un contenido del doble de cromosomas que las células en G_1 ($4n$ en los organismos diploides y $2n$ en los organismos haploides). El final de G_2 está marcado por el inicio de la mitosis, durante la cual ocurren numerosos eventos que conducen a la división de la célula. Las fases G_1 , S y G_2 se conocen colectivamente como *interfase*, período entre una mitosis y la siguiente. La mayoría de las células que no están proliferando en los vertebrados dejan el ciclo celular en G_1 e ingresan al estado G_0 . Aunque los cromosomas se condensan solo durante la mitosis, aquí se muestran en forma condensada durante todo el ciclo celular para poner énfasis en el número de cromosomas en cada etapa del ciclo. Por simplicidad, no se muestra la envoltura nuclear.



hermanas resultantes se distribuyen en cada célula hija (Fig. 19-1). La replicación y segregación de los cromosomas en las células hijas debe ocurrir en el orden adecuado en cada división celular. Si una célula entra en la etapa de segregación de los cromosomas antes de que se haya completado la replicación de todos ellos, al menos una de las células hijas perderá información genética. De la misma forma, si ocurre una segunda ronda de replicación en una región de un cromosoma antes de que ocurra la división celular, los genes codificados en esa región se incrementan en cantidad desproporcionada con relación a los otros genes, un fenómeno que a menudo lleva a un desequilibrio de la expresión genética que es incompatible con la viabilidad.

Se requiere mucha precisión y fidelidad para asegurarse de que la replicación de DNA se lleva a cabo correctamente y de que cada célula hija hereda la cantidad correcta de cada cromosoma. Para lograr esto, la división celular está controlada por mecanismos de vigilancia, conocidos como **vías del punto de control**, que previenen el inicio de cada paso de la división celular hasta que se hayan completado los pasos previos de los que depende y se hayan corregido los errores que ocurrieron durante el proceso. Las mutaciones que inactivan o alteran la operación normal de estas vías del punto de control contribuyen a la generación de células cancerosas dado que resultan en reordenamientos cromosómicos y en cantidades de cromosomas anormales, que llevan a más mutaciones y cambios en el nivel de expresión genética que causan el crecimiento celular descontrolado (véase Cap. 24).

A fines de la década de 1980, resultó evidente que los procesos moleculares que regulan los dos eventos clave en el ciclo celular –la replicación y la segregación de los cromosomas– son fundamentalmente similares en todas las células eucariotes. Al principio, a muchos científicos les llamaba la atención que células tan diversas como las levaduras en gemación y las neuronas humanas en desarrollo usaran proteínas casi

idénticas para regular su división. Sin embargo, al igual que la transcripción y la síntesis de proteínas, el control de la división celular parece ser un proceso celular fundamental que evolucionó y se optimizó mucho al inicio de la evolución eucariote. Debido a esta similitud, la investigación con diversos organismos, cada uno con sus ventajas experimentales particulares, contribuyó a una mayor comprensión del modo en que los eventos del ciclo celular están coordinados y controlados. Se han empleado tanto las técnicas bioquímicas como las genéticas, las de imágenes y la micromanipulación para estudiar varios aspectos del ciclo celular de las células eucariotes. Estos estudios revelaron que la división celular se controla primariamente regulando el momento oportuno de entrada al ciclo de división celular, la replicación nuclear de DNA y la mitosis.

Los grandes controladores del ciclo celular son un pequeño número de *proteínas cinasas heterodiméricas* que contienen una subunidad reguladora (ciclina) y una subunidad catalítica (**cinasa dependiente de ciclina**, o **CDK**). Estas cinasas heterodiméricas regulan las actividades de múltiples proteínas involucradas en la entrada al ciclo celular, la replicación del DNA y la mitosis al fosforilarlas en sitios de regulación específicos, activando algunas e inhibiendo otras para coordinar sus actividades. La degradación regulada de proteínas también juega un papel esencial en las transiciones importantes del ciclo celular. Dado que la degradación de las proteínas es irreversible, esto asegura que los procesos solo se mueven en una dirección a través del ciclo celular.

En este capítulo, primero presentamos una vista general del ciclo celular y luego describimos los varios sistemas experimentales que contribuyeron a nuestra comprensión actual de este. Luego analizaremos pueden regularse estas controladoras clave del ciclo celular. A continuación, examinaremos cada fase del ciclo celular en mayor detalle, con

énfasis en la forma en que el control de la actividad CDK gobierna los eventos que ocurren en cada fase. Luego analizaremos los sistemas de las vías de puntos de control que establecen el orden del ciclo celular y se aseguran de que cada fase del ciclo ocurra con precisión. En nuestro análisis haremos énfasis en los principios generales que gobiernan la progresión del ciclo celular y usaremos una nomenclatura que abarque todas las especies a la hora de discutir los factores que controlan cada fase del ciclo celular. El capítulo concluye con un análisis de la meiosis, un tipo de división celular especial que genera células germinales haploides (óvulo y espermatozoide) y los mecanismos moleculares que la diferencian de la mitosis.

19.1 Generalidades del ciclo celular y su control

Comenzamos nuestro análisis con un repaso de las etapas del ciclo celular de las células eucariontes, presentando un resumen del modelo actual de la forma en que el ciclo está regulado. Veremos la forma en que la replicación de DNA lleva a la creación de dos moléculas de DNA idénticas durante la fase de síntesis de DNA y de qué manera estas moléculas de DNA se compactan y se estructuran para ser segregadas a las células hijas. Luego introduciremos a las grandes reguladoras del ciclo celular, las cinasas dependientes de ciclina, antes de terminar con un análisis general de los principios que gobiernan el ciclo celular para asegurarse de que el proceso ocurre respetando los tiempos y sin errores.

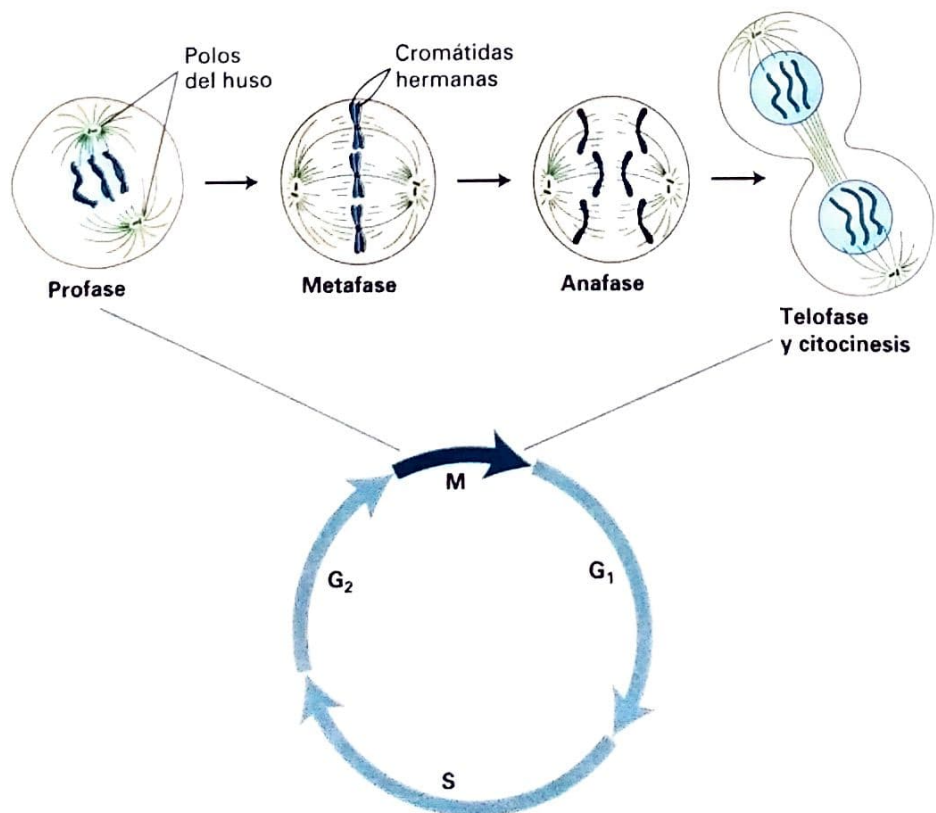
El ciclo celular es una serie de eventos ordenados que llevan a la replicación celular

Como se ilustra en la Figura 19-1, el ciclo celular se divide en cuatro etapas principales. Las células somáticas de mamífero en el ciclo celular (replicación) crecen en tamaño y sintetizan RNA y proteínas requeridas para la síntesis de DNA durante la **fase G₁** (que toma su nombre de **Gap 1**, o **intervalo 1**). Cuando las células han alcanzado el tamaño apropiado y han sintetizado las proteínas requeridas, entran en el ciclo celular atravesando un punto en G₁ que se conoce como **START**. Una vez que se ha cruzado este punto, las células se dedican a la división celular. El primer paso hacia la división celular exitosa es la entrada en la **fase S (síntesis)**, el período en el cual las células replican activamente sus cromosomas. Después de progresar a una segunda fase de intervalo, la **fase G₂**, las células comienzan el complicado proceso de la mitosis, también llamada **fase M (mitótica)**, que está dividida en varias etapas (Fig. 19-2).

Al analizar la mitosis, usamos comúnmente el término **cromosoma** para las estructuras *replicadas* que se condensan y se vuelven visibles al microscopio óptico durante las etapas iniciales de la mitosis. Así, cada cromosoma está compuesto por dos moléculas de DNA idénticas que resultan de la replicación del DNA, más las histonas y otras proteínas asociadas a los cromosomas (véase la Fig. 6-39). Las dos moléculas de DNA idénticas y proteínas asociadas a los cromosomas que forman un cromosoma se llaman **cromátidas hermanas**, las cuales están unidas unas a otras por entrecruzamiento de proteínas a lo largo de su longitud.

ANIMACIÓN FOCALIZADA: Mitosis VIDEO: Visualización de la mitosis con sondas fluorescentes

FIGURA 19-2 Las etapas de la mitosis. Durante la profase, la envoltura nuclear se rompe, los microtúbulos forman el aparato del huso mitótico y los cromosomas se condensan. En la metafase, la unión de los cromosomas a los microtúbulos a través de los cinetocoros se completa. Durante la anafase, los motores de los microtúbulos y el acortamiento de los microtúbulos del huso traccionan las cromátidas hermanas hacia polos opuestos del huso. Después del movimiento de los cromosomas a los polos del huso, estos se descondensan, y las células reensamblan las membranas nucleares alrededor de los núcleos de las células hijas y sufren citocinesis.



Durante la **interfase**, la parte del ciclo celular entre el final de una fase M y el inicio de la siguiente, la membrana nuclear externa es continua con el retículo endoplasmático. Con el inicio de la mitosis en **profase**, la envoltura nuclear se retrae al interior del retículo endoplasmático en la mayoría de las células de los eucariontes superiores, y las membranas del Golgi se rompen y se convierten en vesículas. Esto es necesario para que los microtúbulos, que son nucleados por los **centrosomas**, puedan interactuar con los cromosomas para formar el **huso mitótico**, que consiste en un haz de microtúbulos con forma de pelota de fútbol con un grupo de microtúbulos en forma de estrellas que radian de cada extremo, o polo del huso. Un complejo de multiproteínas, el **cinetocoro**, se ensambla en cada **centrosoma**. Después de la ruptura de la envoltura nuclear, los cinetocoros de las cromátidas hermanas se asocian con los microtúbulos que vienen de los polos del huso opuestos (véase la Fig. 18-37), y los cromosomas se reúnen en un llano en el centro de la célula en **metafase**. Durante el período de la mitosis **anafase**, las cromátidas hermanas se separan. Inicialmente, son llevadas por los microtúbulos hacia los polos del huso y después se ven más separadas a medida que los polos del huso se alejan uno del otro (véase la Fig. 19-2).

Una vez que se ha completado la separación de los cromosomas, el huso mitótico se desensambla y los cromosomas se descondensan durante la **telofase**. La envoltura nuclear se vuelve a formar alrededor de los cromosomas segregados a medida que se descondensan. La división física del citoplasma, llamada **citocinesis**, produce dos células hijas. Después de la mitosis, las células en replicación entran en la fase G_1 y se embarcan en otra vuelta del ciclo.

La progresión de las etapas del ciclo celular es la misma para todos los eucariontes, aunque el tiempo que lleva completar un giro del ciclo varía considerablemente entre los organismos. Las células humanas que se replican rápidamente progresan a través de todo el ciclo celular en aproximadamente 24 horas: G_1 lleva 9 horas; la fase S, 10 horas; G_2 , 4,5 horas; y la mitosis, 30 minutos. En contraste, todo el ciclo lleva solo 90 minutos en levaduras de crecimiento rápido. ¡Las divisiones celulares que ocurren durante el inicio del desarrollo del embrión de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* se completan en tan solo 8 minutos!

En los organismos multicelulares, la mayoría de las células diferenciadas “salen” del ciclo celular y sobreviven durante días, semanas o, en algunos casos (p. ej., células nerviosas y células del cristalino), durante toda la vida de los organismos sin volver a dividirse. Por lo general, esas células *posmitóticas* salen del ciclo celular en G_1 , y entran en una fase llamada G_0 (véase la Fig. 19-1). Algunas células en G_0 pueden regresar al ciclo celular y reanudar la replicación; este reingreso está regulado, y proporciona así control de la proliferación celular.

Las cinasas dependientes de ciclina controlan el ciclo celular de los eucariontes

Como se mencionó en la introducción del capítulo, el paso a través del ciclo celular está controlado por proteincinasas heterodiméricas compuestas por una subunidad catalítica y otra reguladora. Las concentraciones de las subunidades catalíticas, las **cinasas dependientes de ciclina (CDK)**, son constantes a través de todo el ciclo celular. Sin embargo, no tienen actividad cinasa a menos que estén asociadas con una subunidad reguladora de **ciclina**. Cada CDK puede asociarse con un pequeño número de diferentes ciclinas que determinan la especificidad del sustrato del complejo, es decir, qué proteínas fosforila. Cada ciclina solo está presente y activa durante la etapa del ciclo ce-

lular que promueve y, por lo tanto, restringe la actividad cinasa de las CDK que une a esa etapa del ciclo celular únicamente. Los complejos ciclina-CDK activan o inhiben cientos de proteínas involucradas en la progresión del ciclo celular al fosforilarlas a sitios reguladores específicos. Así, la progresión adecuada a lo largo del ciclo celular está gobernada por la activación de los complejos de ciclina-CDK apropiados en el momento adecuado. Como veremos, la restricción de la expresión de ciclina en la etapa apropiada del ciclo celular es uno de los mecanismos que utilizan las células para regular las actividades de cada heterodímero de ciclina-CDK.

Varios principios clave gobiernan el ciclo celular

El objetivo de cada división celular es generar dos células hijas de composición genética idéntica. Para lograr esto, *los eventos del ciclo celular deben ocurrir en el orden adecuado*. La replicación del DNA siempre debe ocurrir antes de la segregación de los cromosomas. En la actualidad, sabemos que la actividad de las proteínas clave que promueven la progresión del ciclo celular, las CDK, *fluctúa durante el ciclo celular*. Por ejemplo, las CDK que promueven la fase S están activas durante la fase S pero inactivas durante la mitosis. Las CDK que promueven la mitosis solo están activas durante la mitosis. Estas *oscilaciones* de la actividad de las CDK son un aspecto fundamental del control del ciclo celular en los eucariontes, y hemos adquirido gran comprensión a lo largo de los últimos años sobre la forma en que estas oscilaciones se generan. Las oscilaciones se generan por **mecanismos de retroalimentación positivos**, en los que CDK específicas promueven su propia activación. Estos bucles de retroalimentación positivos están acoplados con **mecanismos de retroalimentación negativos** subsiguientes en los que, indirectamente o con un retraso programado, las CDK promueven su propia inactivación. Las oscilaciones no solo impulsan hacia adelante el ciclo celular, sino que también crean transiciones abruptas entre las diferentes etapas del ciclo celular, esenciales para provocar las diferentes etapas del ciclo celular.

En la maquinaria de oscilación del ciclo celular, hay un sistema de mecanismos de vigilancia que se asegura que el próximo evento del ciclo celular no sea activado antes de que el anterior se haya completado o antes de que los errores que ocurrieron durante el paso anterior se hayan corregido. Estos mecanismos de vigilancia se llaman **vías del punto de control**, y su trabajo es asegurar la precisión de los procesos de replicación y segregación de los cromosomas. El sistema que se asegura que los cromosomas se segreguen de manera precisa es tan eficiente que ocurre un error en la segregación ¡una vez en 10^4 - 10^5 divisiones! Estas múltiples capas de control sobre la maquinaria de control del ciclo celular se aseguran de que el ciclo sea robusto y carezca de errores.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 19.1

Generalidades del ciclo celular y su control

- El ciclo celular eucarionte está dividido en cuatro fases: G_1 (el período entre la mitosis y la iniciación de la replicación del DNA nuclear), S (el período de la replicación del DNA nuclear), G_2 (el período entre la compleción de la replicación del DNA nuclear y la mitosis) y M (mitosis).
- Las células se predestinan a una nueva división celular en un punto específico de G_1 conocido como START.

- Los complejos ciclina-CDK, compuestos de una subunidad reguladora de ciclinas y una subunidad de cinasa dependiente de ciclina (CDK), impulsan el avance de una célula a través del ciclo celular.

- Las ciclinas activan las CDK y están presentes solo en la etapa del ciclo celular que promueven.

- Las actividades de las CDK oscilan durante el ciclo celular. Los bucles de retroalimentación positiva y negativa impulsan estas oscilaciones.

- Los mecanismos de vigilancia, llamados vías del punto de control, garantizan que cada paso del ciclo celular se complete correctamente antes de que se inicie el siguiente.

19.2 Organismos modelo y métodos para estudiar el ciclo celular

La resolución de los mecanismos moleculares que gobiernan la progresión del ciclo celular en los eucariontes fue notablemente rápida e impulsada por la combinación poderosa de los enfoques genéticos y bioquímicos. En esta sección, analizaremos varios sistemas modelo y su contribución al descubrimiento de mecanismos moleculares de la división celular. Los tres sistemas más importantes utilizados para estudiar el ciclo celular son las levaduras unicelulares *Saccharomyces cerevisiae* (levadura en gemación) y *Schizosaccharomyces pombe* (levadura de fisión) y los ovocitos y embriones iniciales de la rana *Xenopus laevis*. También analizaremos la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, que mostró ser muy poderosa en el estudio de la interacción entre la división y el desarrollo celular así como también en la manera en que el estudio de células de tejidos en cultivo de mamíferos llevó a la caracterización del control del ciclo celular en los mamíferos.

Los estudios del ciclo de división celular en muchos sistemas experimentales diferentes también llevaron a dos notables descubrimientos acerca del control general del ciclo celular. En primer término, procesos moleculares complejos como el inicio de la replicación del DNA y la entrada en mitosis están regulados y coordinados por un número pequeño de grandes proteínas reguladoras del ciclo celular. En segundo término, estas grandes proteínas que los controlan están muy conservadas, de modo tal que los estudios del ciclo celular en hongos, erizos de mar, insectos, ranas y otras especies pueden aplicarse de manera directa a todas las células eucariontes, incluyendo las células humanas.

Las levaduras en gemación y fisión son sistemas poderosos para el análisis genético del ciclo celular

Las levaduras en gemación y fisión han demostrado ser sistemas valiosos para el estudio del ciclo celular. Si bien ambas pertenecen al reino de los hongos, solo tienen una relación lejana. Ambos organismos pueden existir en el estado haploide y llevan solamente una copia de cada cromosoma. El hecho de que estas levaduras puedan existir como células haploides las convierte en poderosos sistemas genéticos. Es fácil generar mutaciones que inactivan genes en las haploides porque solo hay una copia de cada gen (un sistema diploide requeriría una mutación que inactíve en cada una de las dos copias del gen para volver su actividad no funcional). La levadura haploide puede utilizarse fácilmente para visualizar o seleccionar mutantes con defectos específicos, como defectos en la

proliferación celular. Las ventajas adicionales de ambos sistemas son la relativa facilidad con la que uno puede manipular la expresión de genes individuales, sus genomas completamente secuenciados y la facilidad con la que se los puede cultivar y manipular para que los cultivos de las células de levadura progresen a través del ciclo celular de manera sincrónica.

Las células de las levaduras en gemación son de forma ovoide y se dividen por gemación (Fig. 19-3a). El brote es la futura célula hija y comienza a formarse en concomitancia con el inicio de la replicación del DNA y continúa creciendo a través de todo el ciclo celular (Fig. 19-3b). Por ende, es posible inferir la etapa del ciclo celular a partir del tamaño del brote, lo que hace de *S. cerevisiae* un sistema útil para identificar los mutantes que están bloqueados en etapas específicas del ciclo celular. De hecho, fue en este organismo donde Lee Hartwell y cols. identificaron por primera vez los mutantes que eran defectuosos en el progreso a lo largo de etapas específicas del ciclo celular. Al igual que las células de los mamíferos, el ciclo celular de las levaduras en gemación tiene una fase G_1 larga, y el estudio del ciclo celular de la levadura en gemación nos ayudó a comprender la forma en que está controlada la transición de la fase G_1 -S.

Las células de las levaduras de fisión tienen forma de vara y crecen completamente por la elongación de sus extremos (Fig. 19-4a). Después de que se completa la mitosis, ocurre la citocinesis por la formación de un tabique (Fig. 19-4b). Los mecanismos moleculares que gobiernan la G_2 y la entrada en mitosis son muy similares entre las levaduras de fisión y las células de los metazoarios, y los estudios con este organismo revelaron los eventos moleculares que rodean la fase transición de la fase G_2 -M.

Tanto las levaduras en gemación como las de fisión son útiles para aislar los mutantes que se bloquean en pasos específicos del ciclo celular o los que exhiben una regulación alterada del ciclo. Dado que la progresión del ciclo celular es esencial para su viabilidad, los científicos aislaron mutantes condicionales que codifican proteínas que son funcionales a una temperatura pero se vuelven inactivas a otra, a menudo a una temperatura elevada (p. ej., debido al plegamiento inadecuado de las proteínas a la temperatura no permisiva). Los mutantes detenidos en una etapa particular del ciclo celular se distinguen fácilmente de las células en división normales al examinarlas en un microscopio. Así, en ambas levaduras se aislaron de inmediato las células con **mutaciones sensibles a la temperatura** que causan defectos en proteínas específicas requeridas para progresar a lo largo del ciclo celular (véase la Fig. 5-6). Esas células se llaman mutantes *cdc* (ciclo de división celular).

¿De qué manera es posible identificar qué gen es defectuoso en un mutante *cdc* dado? Los alelos de tipo silvestre de mutantes *cdc* recesivos sensibles a la temperatura pueden aislarse de inmediato al transformar las células mutantes haploides con una genoteca de plásmidos preparado a partir de células de tipo silvestre y luego poniendo en una placa las células transformadas a una temperatura no permisiva (Fig. 19-5). Las células mutantes haploides no pueden formar colonias a la temperatura no permisiva. Sin embargo, una célula mutante transformada puede crecer y convertirse en una colonia si también contiene un plásmido que lleve el alelo de tipo silvestre que complementa la mutación recesiva; luego pueden recuperarse los plásmidos que llevan el alelo de tipo silvestre de esas células, lo que permite la identificación del gen complementario. Dado que muchas de las proteínas que regulan el ciclo celular están muy conservadas, los cDNA humanos clonados en vectores de expresión de levaduras a menudo pueden complementar los mutantes del ciclo celular de la levadura y llevar al aislamiento rápido de genes humanos que codifican las proteínas de control del ciclo celular. De hecho, fue la capacidad del gen humano que codifica CDK1 de complementar los

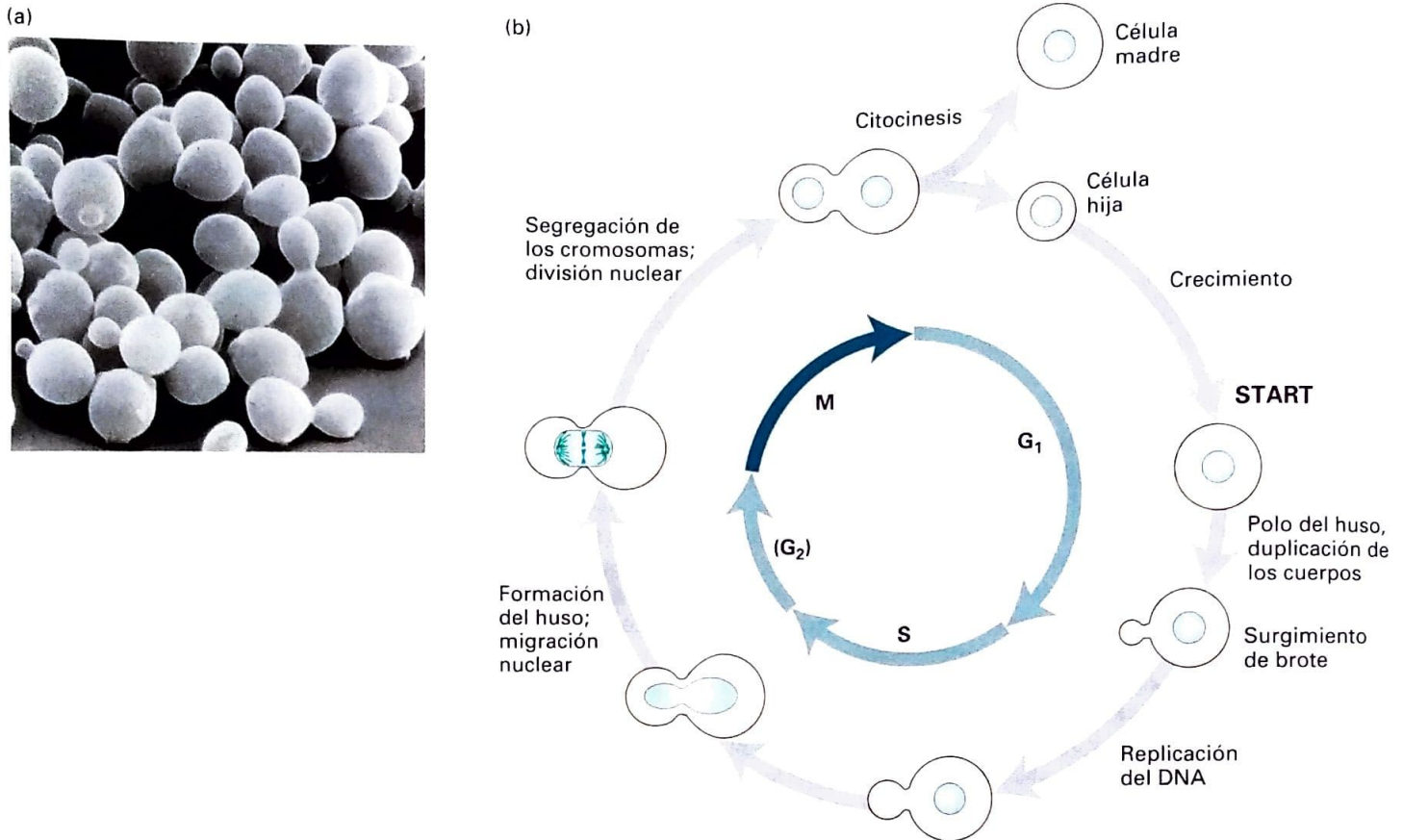


FIGURA 19-3 La gemación de la levadura *S. cerevisiae*. (a)

Fotomicrografía electrónica de barrido de células de *S. cerevisiae* en varias etapas del ciclo celular. Cuanto mayor sea el brote que surge hacia el final de la fase G₁, más avanzada estará la célula en el ciclo celular. (b) Eventos principales del ciclo celular de *S. cerevisiae*. Las células hijas nacen más pequeñas que las células madres y deben crecer en mayor medida en G₁ antes de que sean lo suficientemente grandes como para ingresar a la fase S. START es el

punto del ciclo celular después del cual las células están irreversiblemente determinadas a ingresar en el ciclo celular. G₁ no está bien definido en la levadura en gemación y, por lo tanto, se denota entre paréntesis. Nótese que la envoltura nuclear no se desensambla durante la mitosis de la *S. cerevisiae* y de otras levaduras. Los cromosomas pequeños de *S. cerevisiae* no se condensan lo suficiente como para ser visibles al microscopio óptico. (Parte [a] cortesía de E. Schachtbach y I. Herkowitz)

defectos del crecimiento causados por la inactivación de la levadura de fisión CDK1 la que llevó al reconocimiento del alto grado de conservación que existe entre las reguladoras del ciclo celular de los eucariontes.

Los ovocitos de rana y los embriones iniciales facilitan la caracterización bioquímica del motor del ciclo celular

Los estudios bioquímicos requieren la preparación de extractos celulares de muchas células. Para los estudios bioquímicos del ciclo celular, los óvulos y los embriones iniciales de los anfibios y de los invertebrados marinos son en particular apropiados. Típicamente, estos organismos tienen muchos óvulos, y la fertilización es seguida por múltiples ciclos celulares sincrónicos. Al aislar gran cantidad de óvulos de las hembras y fertilizarlos simultáneamente por medio de la adición de los espermatozoides (o tratarlos en maneras que imiten la fertilización), los investigadores pueden obtener extractos de células en puntos específicos del ciclo celular para analizar las actividades de las proteínas y las enzimas.

Para entender de qué manera los ovocitos y los huevos de las *X. laevis* se pueden usar para analizar la progresión del ciclo celular, primero debemos explicar los eventos de la maduración del ovocito, que se puede recapitular in vitro. Hasta ahora, analizamos la división mitótica; sin embargo, los ovocitos atraviesan una división meiótica (véase la Fig. 19-38 para una explicación general de la meiosis). A medida que los ovocitos se desarrollan en el ovario de la rana, replican su DNA y se detienen en la G₂ durante 8 meses, tiempo durante el cual crecen en tamaño hasta alcanzar un diámetro de 1 mm, almacenando todos los materiales que necesitan para las múltiples divisiones celulares del embrión inicial. Cuando un macho las estimula, las células de los ovarios de una hembra adulta secretan la hormona esteroide progesterona, que induce a los ovocitos detenidos en la G₂ a entrar en la meiosis. Como veremos en la Sección 19.8, la meiosis consiste en dos fases consecutivas de segregación de cromosomas, conocidas como meiosis I y meiosis II. La progesterona desencadena que los ovocitos entren en la meiosis I y avancen a la segunda metafase meiótica, donde se detienen y aguardan la fecundación (Fig. 19-6). En esta etapa, a las células se las llama ovocitos. Cuando se lo fecunda con espermatozoides, el núcleo del ovocito se libera de la detención en la metafase II y completa la meiosis.

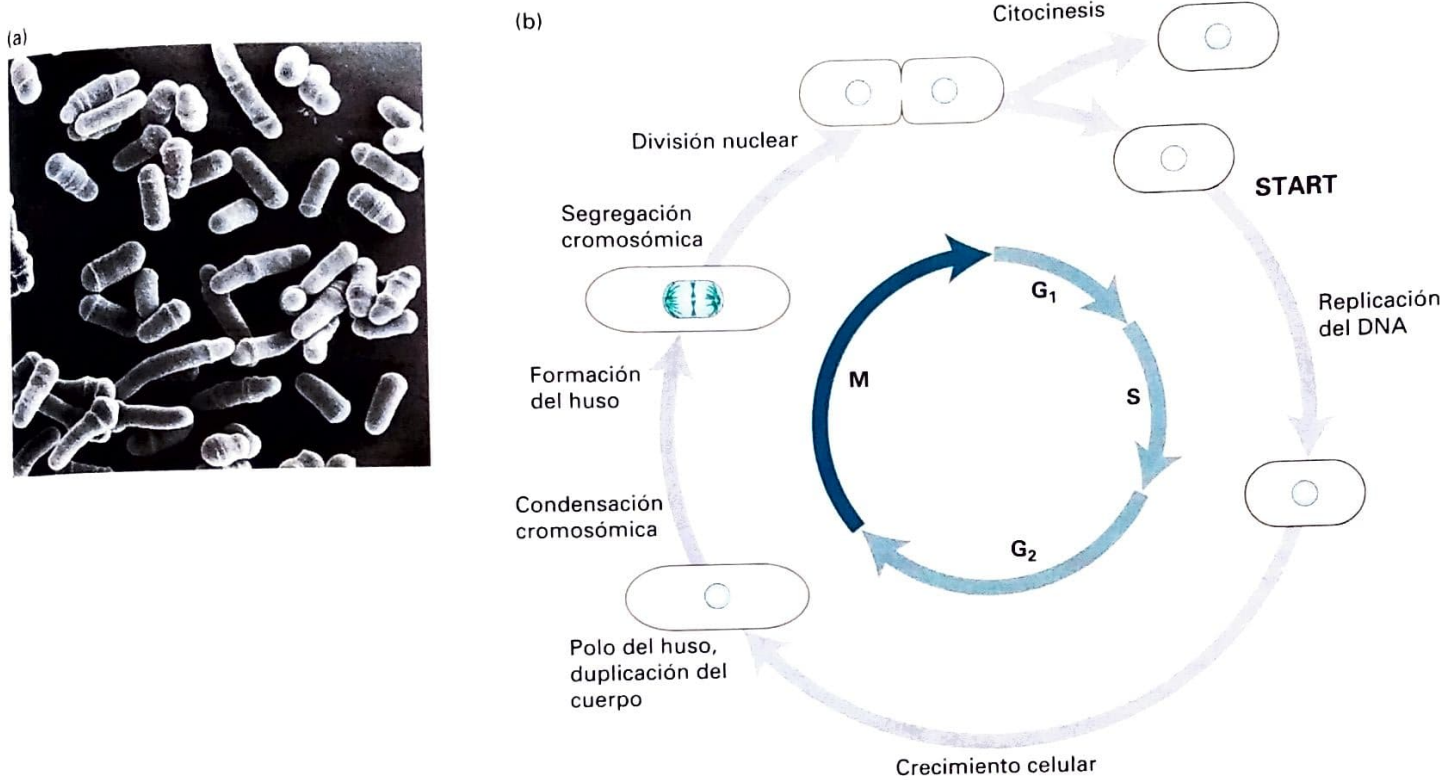


FIGURA 19-4 La fisión de la levadura *S. pombe*. (a) Fotomicrografía electrónica de barrido de células de *S. pombe* en varias etapas del ciclo celular. Las células largas están próximas a entrar en mitosis; las células cortas han pasado recientemente por citocinesis. (b) Principales eventos del ciclo celular

de la *S. pombe*. **START** es el punto del ciclo celular después del cual las células están irreversiblemente condicionadas a pasar por el ciclo celular. Como ocurre en *S. cerevisiae*, la envoltura nuclear no se rompe durante la mitosis. (Parte [a] cortesía de N. Hajibagheri.)

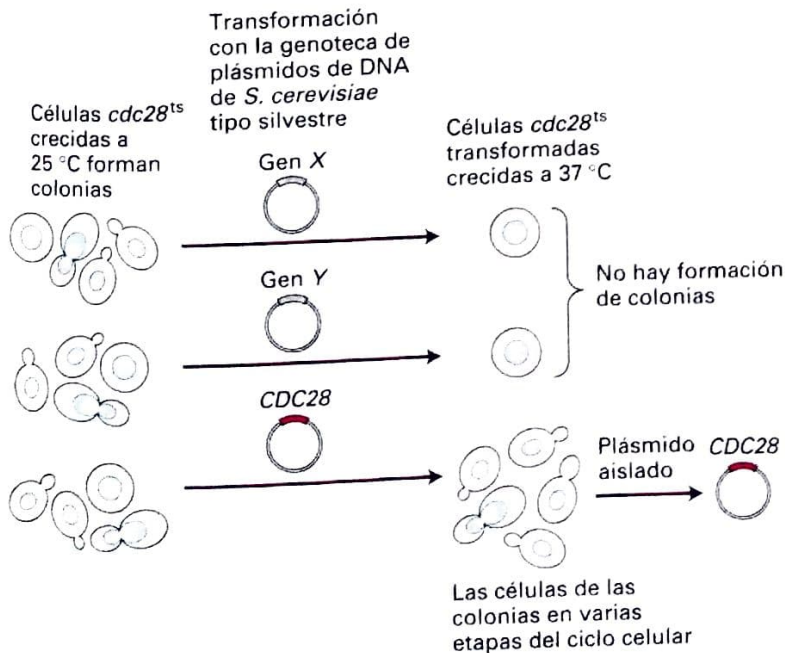


FIGURA EXPERIMENTAL 19-5 Los genes en el ciclo de división celular silvestre (CDC) pueden ser aislados de la genoteca de *S. cerevisiae* por complementación funcional de mutantes *cdc*. Las células mutantes con una mutación sensible a temperatura del gen *CDC* se transforman con una genoteca preparada a partir de células de tipo silvestre, sembradas sobre un agar nutriente a la temperatura no permisiva (37 °C). Cada célula transformada capta un único plásmido que contiene un fragmento único de DNA genómico. La mayor parte de tales fragmentos incluyen genes (p. ej., X e Y) que no codifican para la proteína defectuosa Cdc; las células transformadas que captan estos fragmentos no forman colonias a la temperatura no permisiva. La rara célula que capta un plásmido que contiene la versión silvestre del gen mutante (tal el caso en *CDC28*, una cinasa dependiente de ciclina) se complementa, lo que permite que la célula se replique y forme una colonia a la temperatura no permisiva. El DNA del plásmido aislado de esta colonia lleva el gen silvestre *CDC* que corresponde al gen defectuoso de las células mutantes. El mismo procedimiento se emplea para aislar los genes *cdc* silvestres de *S. pombe*. Véanse las Figuras 5-17 y 5-18 para ilustraciones más detalladas sobre la construcción y detección sistemática de una genoteca de levaduras.

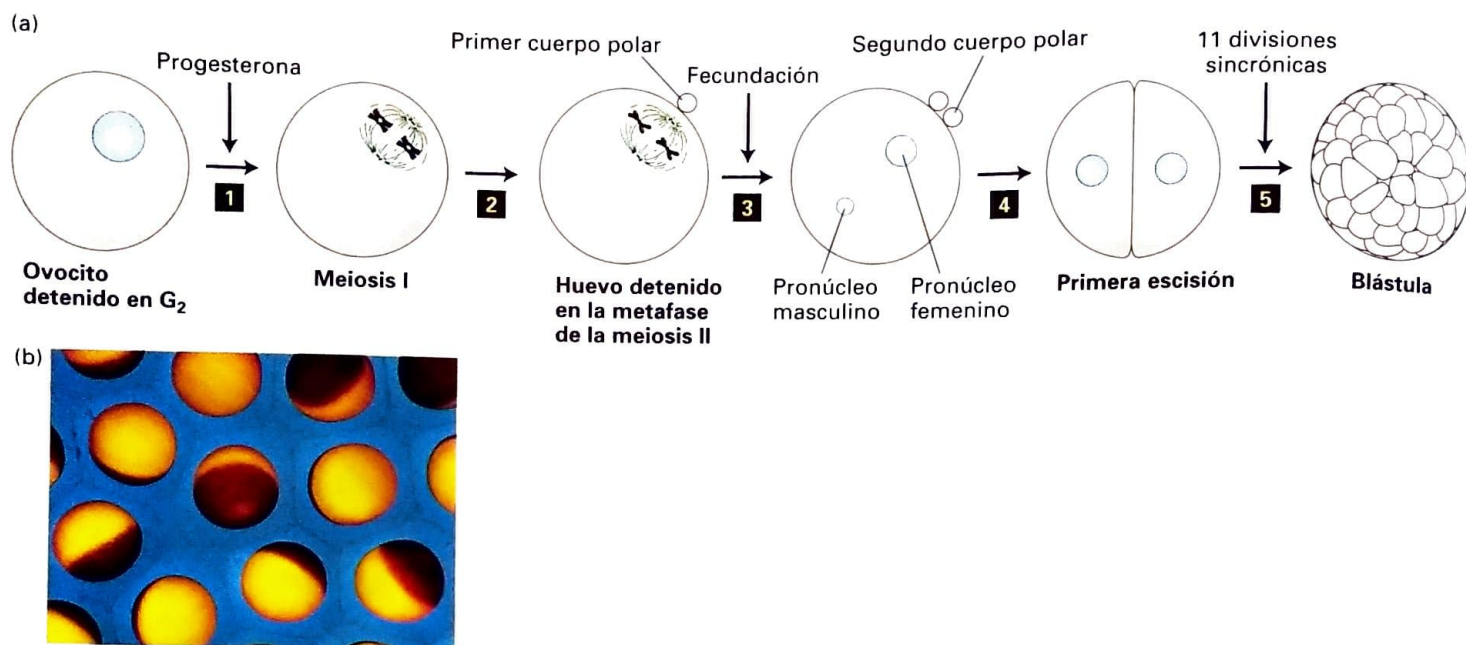


FIGURA 19-6 La progesterona estimula la maduración meiótica de los ovocitos de *Xenopus*. (a) Paso **1**: el tratamiento con progesterona de ovocitos de *Xenopus* detenidos en G₂ extraídos quirúrgicamente del ovario de una hembra adulta hace que los ovocitos ingresen en la meiosis I. Dos pares de cromosomas homólogos en sinapsis (azul) conectados a los microtúbulos del huso meiótico (verde) se muestran de modo esquemático para representar a las células en la metafase de la meiosis I. Paso **2**: segregación de los cromosomas homólogos y una división celular muy asimétrica que expulsa la mitad de los cromosomas a una pequeña célula llamada *primer cuerpo polar*. De inmediato, el ovocito inicia la meiosis II y se detiene en metafase II para producir un huevo. Dos cromosomas conectados a los microtúbulos del huso

se muestran esquemáticamente para representar células del huevo detenidas en la metafase de la meiosis II. Paso **3**: fecundación por espermatozoides que liberan los huevos de su detención en metafase y permite así que avancen a través de la anafase de la meiosis II y sufran una segunda división muy asimétrica que elimina una de las cromátidas de cada cromosoma en un segundo cuerpo polar. El pronúcleo femenino haploide resultante se fusiona con el pronúcleo del espermatozoide haploide para producir el cigoto diploide. Paso **4**: el cigoto sufre replicación del DNA y la primera mitosis. Paso **5**: la primera mitosis es seguida por 11 divisiones sincrónicas adicionales para la formación de una blástula. (b) Fotomicrografía de huevos de *Xenopus*. (Parte [b] copyright © ISM/Phototake)

El núcleo haploide del ovocito resultante se fusiona luego con el núcleo haploide del espermatozoide y produce un núcleo **diploide en el cigoto**. Sigue la replicación del DNA y comienza la primera división mitótica de embriogénesis. Luego, las células embrionarias resultantes proceden a lo largo de 11 ciclos celulares sincrónicos más rápidos y generan una esfera de células hueca llamada blástula. Entonces, la división celular se frena, y las divisiones posteriores son no-sincrónicas, con células en diferentes posiciones de la blástula dividiéndose en diferentes momentos.

La ventaja de usar *X. laevis* para estudiar los factores implicados en la mitosis es que se pueden preparar gran cantidad de ovocitos y huevos y todos proceden sincrónicamente a través de los eventos del ciclo celular que siguen a la administración de progesterona y a la fecundación. Esto hace que sea posible preparar cantidades de extracto suficientes para experimentos bioquímicos de células que estaban en el mismo punto del ciclo celular. Fue en este sistema donde se descubrieron por primera vez los complejos de ciclina-CDK que desencadenan la mitosis y la naturaleza oscilatoria de su actividad. Esta actividad se llamó **factor promotor de la maduración (MPF, maturation-promoting factor)** debido a su capacidad de inducir la entrada en meiosis al ser inyectado en los ovocitos en reposo en el G₂.

Las moscas de la fruta revelan la interrelación entre el desarrollo y el ciclo celular

Con frecuencia, el desarrollo de tejidos complejos requiere modificaciones específicas del ciclo celular. La comprensión de la interrelación entre el desarrollo y la división celular resulta así crítica si deseamos comprender

de qué manera se construyen los organismos complejos. La *Drosophila melanogaster* se ha establecido como el primer sistema modelo para el estudio de la interrelación entre el desarrollo y el ciclo celular. El desarrollo de este organismo no solo implica varios ciclos celulares muy inusuales; las técnicas genéticas poderosas que pueden aplicarse a las moscas de las frutas facilitaron el descubrimiento de genes implicados en el control del desarrollo del ciclo celular. Las primeras 13 divisiones nucleares del embrión de *Drosophila* fertilizado ocurren en un citoplasma común y son ciclos rápidos de replicación del DNA y mitosis (sin fases de retardo), impulsadas por reguladores clave del ciclo celular que se almacenaron en el citoplasma del óvulo a medida que este maduraba. Estas divisiones se llaman divisiones sincitiales y ocurren al unísono (Fig. 19-7). A medida que las reservas maternas se agotan, se introducen fases de espera, la primera G₂ seguida de la G₁. La mayoría de las células del embrión dejan de dividirse en este punto, forman membranas plasmáticas y utilizan un ciclo celular especializado conocido como endociclo. En el endociclo, las células replican su DNA pero no sufren mitosis. Esto lleva a un aumento en la dosis de los genes e impulsa la biosíntesis aumentada de macromoléculas, lo cual permite que las células individuales incrementen su tamaño. Así el embrión, que ahora se ha desarrollado a una larva que se arrastra, crece simplemente por el aumento del tamaño celular y no por multiplicación de las células. Un número seleccionado de células no comparte este destino. Estas se encuentran en los discos imaginales, los órganos que darán origen a los tejidos de la mosca adulta durante la metamorfosis, la cual ocurre durante el estadio de pupa y transforma las larvas en moscas adultas. Las divisiones que dan origen a la mosca adulta son ciclos celulares canónicos que transforman la mosca adulta en un organismo diploide.

VIDEO: Divisiones sinciciales del embrión de la *Drosophila*

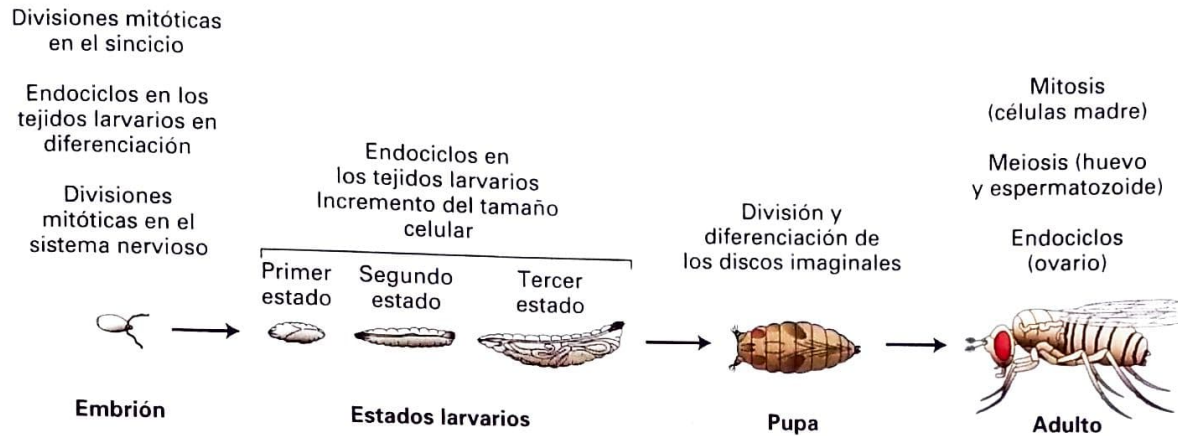


FIGURA 19-7 Patrones de división celular durante el ciclo vital de la *Drosophila melanogaster*. Después de la fecundación, los núcleos del embrión sufren 13 ciclos rápidos fase S-fase M. Estos son seguidos por tres divisiones que incluyen fase G₂. Estas divisiones nucleares ocurren con un citoplasma común y, por lo tanto, se llaman divisiones sinciciales. Durante las etapas tardías de la embriogénesis y a través del desarrollo larvario (con excepción del sistema nervioso), las células sufren endociclos. Esto conduce a un incremento de la ploidía y del tamaño celular y, por lo tanto, al crecimiento

larvario. En la pupa, durante un proceso llamado metamorfosis, los discos imaginales, los tejidos que dan lugar a los órganos del adulto, atraviesan divisiones mitóticas y luego se diferencian para formar estructuras adultas. Hay varios tipos de divisiones en la mosca adulta. Las células madre atraviesan divisiones mitóticas, la meiosis da origen a los espermatozoides y los huevos, y los endociclos crean células poliploides en el ovario. (Adaptado de Lee y Orr-Weaver, 2003. *Ann. Rev. Genet.* **37**:545-578.)

El estudio de los cultivos de tejidos celulares revela la regulación del ciclo celular de los mamíferos

La regulación del ciclo celular de las células humanas es más compleja que en otros sistemas no mamíferos. Para comprender este nivel incrementado de complejidad y las alteraciones del ciclo celular que son causas de cáncer, es importante estudiar el ciclo celular no solo en organismos modelos, sino también en células humanas. Los investigadores emplean las células normales o tumorales crecidas en cajas de plástico para estudiar las propiedades del ciclo de las células humanas, un método llamado cultivo de tejidos o cultivo celular. Sin embargo, es importante notar que muchos de los tipos celulares empleados para estudiar el ciclo de las células humanas per se tienen propiedades alteradas del ciclo celular debido a las alteraciones genéticas que ocurrieron durante su cultivo o porque fueron aisladas de tumores humanos. Más aún, las condiciones de cultivo in vitro no se asemejan a las que están presentes en los organismos y podrían llevar a una conducta alterada de las células. Si bien algunos aspectos de la división celular de los mamíferos no se reeditan en las condiciones de las células en cultivo (tal como la importancia de la organización de los tejidos y las señales del desarrollo que gobiernan el control del ciclo celular), los sistemas de cultivos de células proporcionan sin embargo conocimientos críticos acerca de los mecanismos intrínsecos de las células de los mamíferos que gobiernan las divisiones celulares. Los investigadores también trabajan para poder establecer sistemas de cultivo que se asemejen más cercanamente a la arquitectura de las células en los tejidos. Por ejemplo, en la actualidad están desarrollándose polímeros para permitir a los científicos el crecimiento de las células en cultivos 3-D.

Como veremos en el Capítulo 21, las células humanas en cultivo primario y otras células de mamífero tienen un espectro vital finito cuando se las cultiva in vitro. Las células humanas normales, por ejemplo, se dividen 25-50 veces, pero a partir de entonces la prolife-

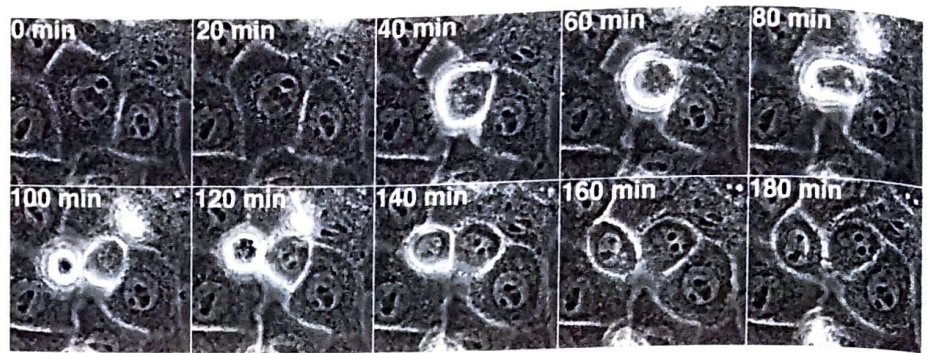
ración se hace más lenta y, por último, se detiene. Este proceso se llama *senescencia replicativa*. Las células pueden escapar a este proceso e inmortalizarse, lo que permite a los investigadores establecer líneas celulares. Aunque estas líneas celulares tengan alteraciones genéticas que afectan ciertos aspectos de la proliferación celular, sin embargo son una herramienta útil para estudiar la progresión del ciclo celular en células humanas. Estas líneas celulares proveen un suministro inagotable de células que, como veremos luego, pueden ser manipuladas para avanzar a través del ciclo celular de modo sincrónico, y permitir así el análisis de los niveles de proteínas y la actividad enzimática en diferentes etapas del ciclo celular.

Los investigadores emplean múltiples herramientas para estudiar el ciclo celular

El análisis experimental de las propiedades del ciclo celular requiere de nuestra capacidad para determinar la etapa del ciclo celular de células individuales. La microscopía óptica proporciona algunos parámetros para estimar el avance del ciclo celular. Por ejemplo, el microscopio óptico le permite a un investigador determinar si las células de mamífero en cultivo se encuentran en interfase (G₁, fase S y G₂) o en mitosis. Las células de mamífero en cultivo de tejido son planas y se adhieren a la caja de plástico durante la interfase, pero se redondean y forman estructuras esféricas cuando atraviesan la mitosis (Fig. 19-8). La microscopía de fluorescencia de las estructuras celulares o el análisis de marcadores específicos del ciclo celular, es decir de proteínas que solo están presentes en ciertas etapas del ciclo celular, permite una determinación más precisa de la etapa del ciclo celular.

Además de las herramientas microscópicas, los investigadores del ciclo celular usan la citometría de flujo para determinar el contenido del DNA de una población de células (Fig. 19-9; véase también la Fig. 9-2). Las células son tratadas con un colorante fluorescente que se

FIGURA 19-8 Células humanas que atraviesan la mitosis. Las células HeLa Kyoto fueron filmadas durante la mitosis. Las imágenes que se muestran fueron tomadas cada 20 minutos. Las células son planas durante la interfase, pero a medida que avanzan en la mitosis se redondean y se dividen. Luego, se aplanan nuevamente. (Cortesía de Sejal Vyas y Paul Chang, MIT.)



une al DNA y luego puede evaluarse en forma cuantitativa la cantidad de colorante que se incorpora al DNA de las células empleando un citómetro de flujo. Luego, las células son seleccionadas por su contenido de DNA y, de esta manera, es posible determinar el porcentaje de células que se encuentran en la fase S, G_1 , G_2 o en mitosis. Las células en G_1 tendrán la mitad del DNA que aquellas en G_2 o en mitosis. Las células que están atravesando la síntesis de DNA en la fase S tendrán una cantidad intermedia de DNA.

Para caracterizar diferentes eventos del ciclo celular, es esencial examinar poblaciones celulares que avancen a través del ciclo celular de modo sincrónico. Los investigadores logran esto mediante la *detención reversible* de las células en una etapa particular del ciclo celular. Habitualmente, esta detención del ciclo celular se logra restringiendo los nutrientes o añadiendo factores anticrecimiento, que hacen que las células se detengan en G_1 . En las levaduras en gemación, por ejemplo, las células tratadas con una feromona de apareamiento se detienen en G_1 . Cuando se elimina la feromona de las células (por

lo general, lavándolas extensamente), estas salen de la detención en G_1 y avanzan a través del ciclo celular de modo sincrónico. En las células de mamífero, la eliminación de los factores de crecimiento al eliminar el suero del medio de cultivo (carencia de suero) detiene a las células en G_0 . La nueva adición de suero permite que las células reingresen en el ciclo celular. Otros métodos implican el bloqueo de cierto paso del ciclo celular con sustancias químicas. La hidroxurea inhibe la replicación del DNA y lleva a una detención en la fase S. Al remover la sustancia, las células reanudarán la síntesis del DNA al unísono. El nocodazol desarma el huso mitótico y detiene el ciclo celular en la mitosis. Una vez que el fármaco se ha eliminado, las células reanudan el avance a la mitosis de modo sincrónico. En las levaduras en gemación y fisión, las mutantes del ciclo de división celular condicional (*cdc*) introducidas tempranamente han probado ser una herramienta poderosa para crear cultivos sincronizados. Las mutantes *cdc* sensibles a la temperatura, cuando se incuban a temperatura no permisiva, se detienen en una etapa particular del ciclo celular porque son defectuosas en cierta proteína clave del ciclo celular. El retorno a la temperatura permisiva les permite a las células continuar con el ciclo de división celular de modo sincrónico.

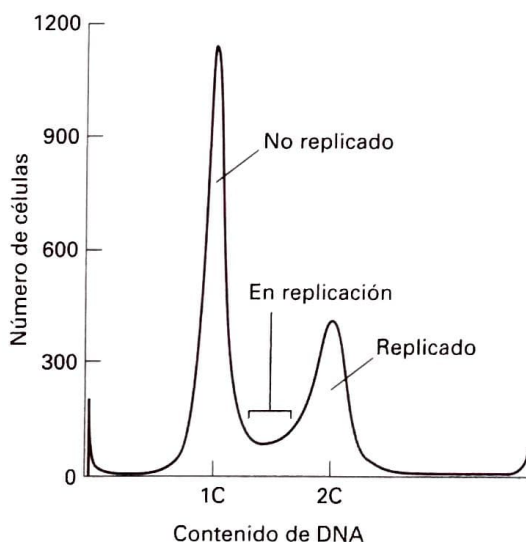


FIGURA EXPERIMENTAL 19-9 Análisis del contenido de DNA por citometría de flujo. Levaduras haploides crecidas en cultivo y teñidas con yoduro de propidinio, un colorante fluorescente que se incorpora al DNA. El eje x muestra el contenido de DNA, el eje y, el número de células. El análisis del contenido de DNA muestra el predominio de dos poblaciones de células: las células con DNA no replicado (1C) y las que tienen DNA replicado (2C). Las células entre ambos picos representan aquellas que están en proceso de sufrir la replicación de su DNA. (Cortesía de Heidi Blank.)

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 19.2

Organismos modelo y métodos para estudiar el ciclo celular

- La capacidad de aislar mutantes y las poderosas herramientas genéticas de las levaduras en gemación y fisión permitieron el aislamiento de factores clave importantes para la regulación del ciclo celular.
- Los ovocitos de rana y los embriones tempranos de huevos fertilizados sincrónicamente proporcionan fuentes de extractos para estudios bioquímicos de eventos del ciclo celular e identificaron la naturaleza oscilatoria de los complejos ciclinas-CDK.
- Las moscas de la fruta son un poderoso sistema para investigar las interrelaciones entre la división celular y los programas de desarrollo responsables de la construcción de organismos multicelulares.
- Las células en cultivo de tejidos humanos se emplean para estudiar las propiedades de los ciclos celulares de los mamíferos.

• La generación de poblaciones de células sincronizadas por la detención reversible de células en una etapa particular del ciclo celular permite al investigador examinar la conducta de las proteínas y los procesos celulares durante el ciclo celular.

19.3 Regulación de la actividad de la cinasa dependiente de ciclina (CDK)

En las siguientes secciones, describiremos el modelo actual de regulación del ciclo celular eucariote, resumido en la Figura 19-10, y presentaremos algunos de los experimentos que condujeron a su comprensión. Como veremos, los resultados obtenidos con diferentes sistemas y enfoques

experimentales han proporcionado conocimientos acerca de cada uno de los puntos de transición del ciclo celular. Un descubrimiento central en los estudios del ciclo celular fue que las cinasas dependientes de ciclina gobiernan el avance a través del ciclo celular. Es importante tener en mente durante todo este capítulo tres características clave acerca de estas cinasas:

- Las cinasas dependientes de ciclina (CDK) solo son activas cuando están unidas a una subunidad de ciclina reguladora.
- Diferentes tipos de complejos ciclina-CDK inician distintos eventos. G_1 CDK y CDK de fase G_1/S promueven el ingreso en el ciclo celular, CDK fase S desencadena la fase S y las CDK mitóticas inician los eventos de la mitosis (Fig. 19-11).
- Existen múltiples mecanismos que aseguran que las diferentes CDK solo sean activas en las etapas del ciclo celular que desencadenan.

VIDEO: Conducta dinámica de la ciclina mitótica de las células HeLa

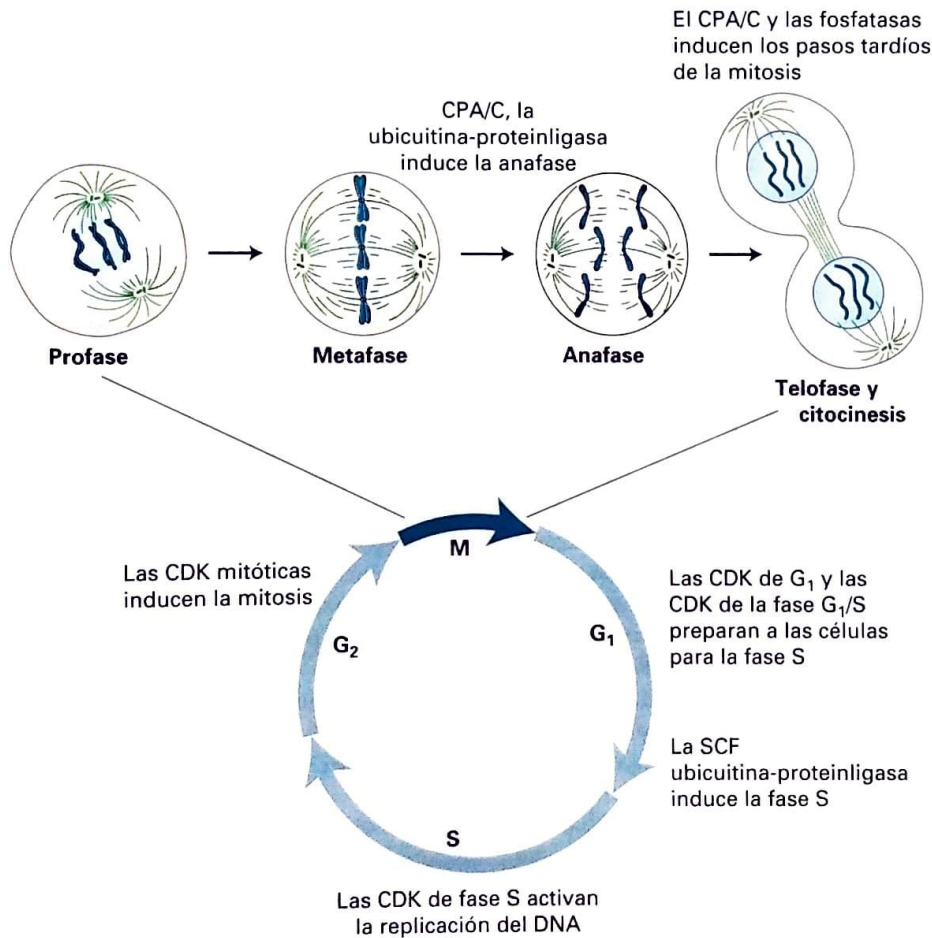
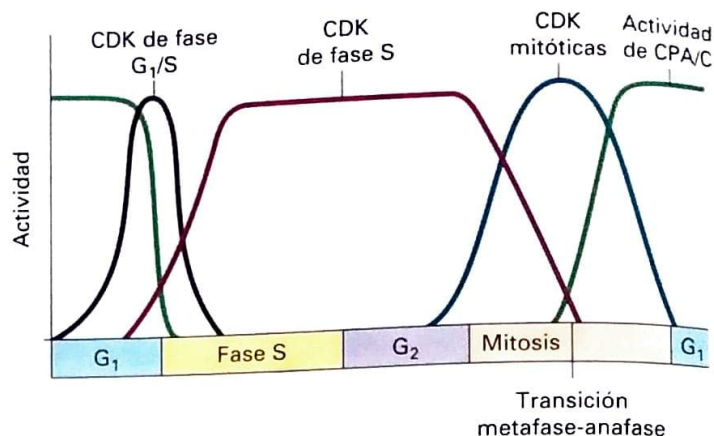


FIGURA 19-10 Regulación de las transiciones del ciclo celular. Las transiciones del ciclo celular están reguladas por las ciclinas-proteincinasas CDK, proteínfosfatasa y proteínligasa-ubiquitina. Aquí, el ciclo celular se encuentra representado, y las principales etapas de la mitosis se muestran en la parte superior. En la fase G_1 media, o G_1/S , superior. En G_1 temprana, no hay ciclina-CDK activas. En la fase G_1 superior, las CDK activan la transcripción de los genes necesarios para la replicación del DNA. Se inicia la fase S por la ubiquitina SCF-proteínligasa que ubiquitina los inhibidores de las CDK de la fase S, marcándolos para la degradación por los proteasomas. Las CDK de la fase S activan luego la replicación del DNA y se inicia su síntesis. Una vez que la replicación del DNA se ha completado, las células entran en G_2 . En la G_2 tardía, las CDK mitóticas desencadenan la entrada a la mitosis. Durante la profase, la envoltura nuclear se rompe y los cromosomas se

alinean en el huso mitótico, pero no pueden separarse hasta que el complejo promotor de la anafase (CPA/C), una proteínligasa-ubiquitina, ubiquitina la proteína inhibidora de la anafase securina, marcándola para la degradación por los proteasomas. Esto resulta en la degradación de complejos proteicos que unen las cromátidas hermanas, el inicio de la anafase cuando las cromátidas hermanas se separan. Después del movimiento de los cromosomas hacia los polos del huso, el CPA/C ubiquitina las ciclinas mitóticas y provoca su degradación por los proteasomas. La caída resultante en la actividad de las CDK mitóticas, junto con la acción de las proteínfosfatasa, da como resultado la descondensación de los cromosomas, el reensamble de las membranas nucleares alrededor de los núcleos de las células hijas y la citocinesis.

FIGURA 19-11 Panorama general del modo en que las CDK regulan el avance del ciclo celular. Las células albergan diferentes tipos de CDK que inician distintos eventos del ciclo celular. De modo importante, las CDK solo son activas en las etapas del ciclo celular que desencadenan. Las CDK de la fase G_1/S son activas en la transición entre G_1 -S para desencadenar la entrada al ciclo celular. Las CDK de la fase S son activas durante la fase S y desencadenan esta fase. Las CDK mitóticas son activas durante la mitosis y la desencadenan. Una ligasa de ubiquitina conocida como el complejo promotor de la anafase o ciclosoma (CPA/C) cataliza dos transiciones clave del ciclo celular, ubiquitinando proteínas y así marcándolas para su degradación. El CPA/C inicia la anafase y la salida de la mitosis.



En esta sección, primero analizaremos las propiedades de las CDK e investigaremos las bases estructurales de su activación y regulación. Luego, veremos el modo en que las ciclinas activan las CDK e investigaremos los múltiples mecanismos de regulación que restringen a las diferentes ciclinas a la etapa adecuada del ciclo celular. Veremos que la degradación proteica desempeña una parte esencial en este proceso. Además, analizaremos de qué manera las modificaciones postraduccionales de las CDK y las proteínas inhibitorias que se unen directamente a los complejos ciclina-CDK son mecanismos de control adicional esenciales en la restricción de diferentes actividades de las ciclinas-CDK a la etapa del ciclo celular adecuada.

Las cinasas dependientes de ciclinas son pequeñas proteincinasas que requieren una subunidad de ciclina reguladora para su actividad

Las cinasas dependientes de ciclina son una familia de pequeñas cinasas de serina/treonina (30-40 kD). No son activas en la forma monomérica sino, como se mencionó previamente, requieren una subunidad activadora para ser activas como proteincinasas. En la gemación y fisión de las levaduras, una única CDK controla el avance a través del ciclo celular. Su actividad está especificada por subunidades específicas de ciclina de esa etapa del ciclo celular. Las células de mamífero contienen hasta nueve CDK, con cuatro de ellas, CDK1, CDK2, CDK4 y CDK6, que tienen claramente una acción de regulación del avance del ciclo celular. Se unen a diferentes tipos de ciclinas y, en conjunto, promueven

distintas transiciones del ciclo celular. La CDK4 y la CDK6 son las CDK de G_1 y promueven la entrada en el ciclo celular, la CDK2 funciona como una CDK de la fase G_1/S y S, y la CDK1 es la CDK de la mitosis. Por razones históricas, los nombres de varias cinasas dependientes de ciclinas de levaduras y vertebrados son diferentes. Siempre que resulte posible, emplearemos los términos generales G_1 , G_1 /fase S, fase S y mitosis para describir las CDK en lugar de la terminología específica de la especie. El Cuadro 19-1 muestra una lista de los diferentes nombres de las distintas CDK e indica en qué momento del ciclo celular son activas.

Las CDK no solo están reguladas por la unión de las ciclinas, sino también por la fosforilación activadora e inhibitoria. En conjunto, estos eventos regulatorios aseguran que las CDK solo sean activas en la etapa adecuada del ciclo celular. La estructura tridimensional de las CDK proporciona mayor conocimiento acerca del modo en que la actividad de estas proteincinasas se encuentra regulada. Las CDK no fosforiladas e inactivas contienen una región flexible llamada el *bucle T* que bloquea el acceso de los sustratos proteicos al sitio activo al que se une el ATP (Fig. 19-12a). El bloqueo estérico por el bucle T explica en gran medida por qué la CDK libre, no unida a la ciclina, tiene poca actividad de proteincinasa. La CDK no fosforilada unida a una de sus ciclinas asociadas tiene actividad de proteincinasa mínima pero detectable in vitro, aunque puede ser esencialmente inactiva in vivo. Extensas interacciones entre la ciclina y el bucle T provocan un notable movimiento en la posición del bucle T, lo cual de este modo expone el sitio activo de la CDK (Fig. 19-12b). Como veremos brevemente, la alta actividad del complejo ciclina-CDK requiere la fosforilación de la treonina acti-

Cuadro 19-1 Ciclinas y CDK: nomenclatura y sus papeles en el ciclo celular de los mamíferos

CDK	Ciclina	Función	Nombre general
CDK1	Ciclina A, ciclina B	Mitosis	CDK mitóticas
CDK2	Ciclina E, ciclina A	Entrada al ciclo celular Fase S	CDK de fase G_1/S CDK de fase S
CDK4	Ciclina D	G_1 Entrada al ciclo celular	CDK de G_1
CDK6	Ciclina D	G_1 Entrada al ciclo celular	CDK de G_1

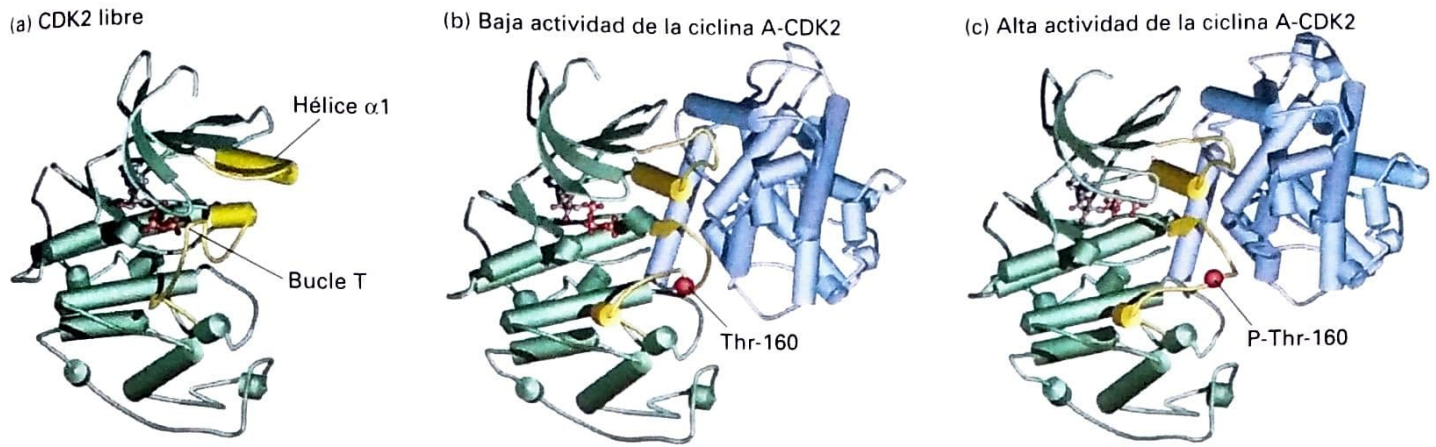


FIGURA 19-12 Modelos estructurales de las CDK2 humana. (a) CDK2 inactiva, libre, no unida a su subunidad de ciclina, ciclina A. En la CDK2 libre, el bucle T bloquea el acceso de los sustratos proteicos del fosfato γ del ATP unido, que se muestra en un modelo de esferas y palillos. Las conformaciones de las regiones resaltadas en amarillo están alteradas cuando la CDK se une a la ciclina A. (b) Complejo ciclina A-CDK2 de baja actividad no fosforilado. Los cambios de conformación inducidos por la unión de un dominio de la ciclina A (azul) hacen que el bucle T se separe del sitio activo de la CDK2, de modo tal que pueden unirse proteínas sustrato. La hélice α_1 de las CDK2, que interactúa

extensamente con la ciclina A, se desplaza varios angstroms al surco catalítico y reubica cadenas laterales catalíticas clave necesarias para la reacción de fosfotransferencia. La esfera roja marca la posición de la treonina (Thr-160) cuya fosforilación activa las CDK. (c) Complejo ciclina A-CDK2 fosforilado, de alta actividad. Los cambios de conformación inducidos por la fosforilación de la treonina activadora (esfera roja) alteran la forma de la superficie de unión al sustrato e incrementan en gran medida la afinidad por los sustratos proteicos. (Cortesía de P. D. Jeffrey. Véase A. A. Russo y cols., 1996, *Nature Struct. Biol.* 3:696.)

vadora en el bucle T, lo que provoca cambios de conformación adicionales en el complejo ciclina-CDK que incrementan en gran medida su afinidad por los sustratos proteicos (Fig. 19-12c). Como resultado, la actividad de cinasa del complejo fosforilado es cien veces superior a la del complejo no fosforilado.

Las ciclinas determinan la actividad de las CDK

Las ciclinas reciben este nombre porque sus niveles se modifican durante el ciclo celular. Forman una familia de proteínas definida por tres características centrales:

- Las ciclinas se unen a las CDK y las activan. La actividad y especificidad por el sustrato de cualquier CDK está primariamente definida por la ciclina particular a la cual se une.
- Las ciclinas solo están presentes durante la etapa del ciclo celular que desencadenan y ausentes en otras etapas de este.
- Las ciclinas no solo regulan una etapa particular del ciclo celular, sino que también ponen en movimiento una serie de eventos en preparación para la siguiente etapa del ciclo celular. De este modo, impulsan el ciclo celular hacia adelante.

Las ciclinas están divididas en cuatro clases definidas por su presencia y actividad durante el ciclo celular: ciclinas G_1 , ciclinas G_1/S , ciclinas de fase S y ciclinas mitóticas (véase el Cuadro 19-1). Los diferentes tipos de ciclinas son bastante distintos entre sí en cuanto a secuencia proteica, pero todos ellos contienen una región conservada de 100 aminoácidos conocida como la caja de ciclina y poseen estructuras tridimensionales semejantes.

Las ciclinas G_1 son el eje que coordina el ciclo celular con los eventos extracelulares. Su actividad está sujeta a la regulación por vías de transducción de las señales que detectan la presencia de factores

de crecimiento o señales inhibitoras de la proliferación celular. En los metazoarios, las ciclinas G_1 son conocidas como ciclinas Ds, y se unen a CDK4 y CDK6. Las ciclinas G_1 son inusuales en tanto sus niveles no fluctúan con un patrón específico durante el ciclo celular. En lugar de ello, en respuesta a la biosíntesis de macromoléculas y las señales extracelulares, sus niveles se incrementan de modo gradual durante el ciclo celular.

Las ciclinas G_1/S se acumulan durante los finales de G_1 , alcanzan niveles máximos cuando las células ingresan en la fase S y declinan durante esta fase (véase la Fig. 19-11). Son conocidas como ciclinas E en los metazoarios y se unen a la CDK2. La principal función de los complejos ciclina E-CDK2, junto con la ciclina D-CDK4/6, es desencadenar la transición G_1 -fase S. Esta transición es conocida como START y se define como el punto en el cual las células irreversiblemente están determinadas a dividirse y ya no pueden volver al estado G_1 . En términos moleculares, esto significa que las células inician la replicación del DNA y duplican sus centrosomas, que es el primer paso en la formación del huso mitótico que será empleado durante la mitosis.

Las ciclinas de la fase S se sintetizan concomitantemente con las ciclinas G_1 , pero los niveles permanecen elevados durante toda la fase S y no declinan hasta inicios de la mitosis. Hay dos tipos de ciclinas de fase S que desencadenan la fase S en los metazoarios: la ciclina E, que también puede promover el ingreso en el ciclo celular y, por lo tanto, es también una ciclina G_1/S , y la ciclina A. Ambas unen CDK2 (véase el Cuadro 19-1) y son directamente responsables de la síntesis de DNA. Como veremos en la Sección 19.4, estas proteincinasas fosforilan proteínas que activan DNA helicasas y cargan polimerasas sobre el DNA.

Las ciclinas mitóticas unen CDK1 para promover el ingreso y la progresión a través de la mitosis. Las ciclinas mitóticas de los metazoarios son las ciclinas A y B (nótese que la ciclina A también puede desencadenar la fase S cuando se une a CDK2). Los complejos ciclina mitótica-CDK se sintetizan durante la fase S y G_2 , pero, como veremos en breve, sus actividades se mantienen controladas hasta que se haya

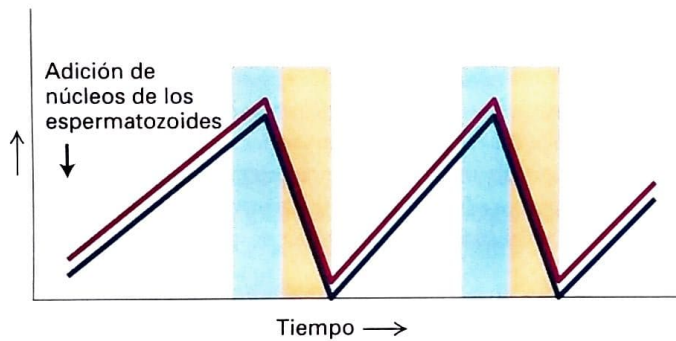
completado la síntesis del DNA. En la Sección 19.5 veremos que, una vez que se han activado, las CDK mitóticas promueven el ingreso en la mitosis al fosforilar y activar cientos de proteínas para impulsar la segregación cromosómica y otros aspectos de la mitosis. Su inactivación durante la anafase impulsa a las células para salir de la mitosis, lo cual implica el desensamblaje del huso mitótico, la descondensación de los cromosomas y la nueva formación de la envoltura nuclear y, finalmente, la citocinesis.

Las ciclinas mitóticas fueron las primeras ciclinas descubiertas, y fue su caracterización la que condujo al descubrimiento de la naturaleza oscilatoria de las actividades que gobiernan el avance del ciclo celular. El experimento que condujo al descubrimiento se describe al final de este capítulo como un experimento clásico de la biología celular (véase Experimento clásico 19.1, Fig. 1).

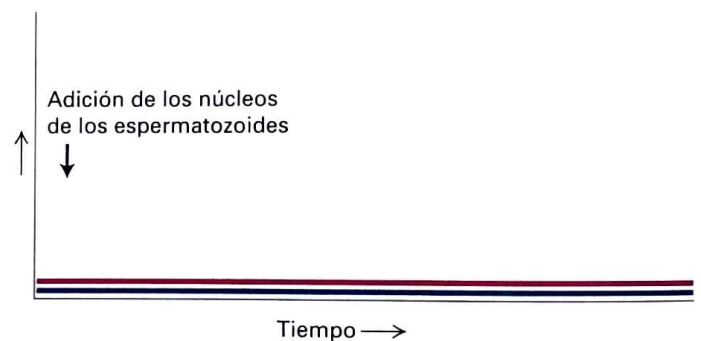
El hecho de que las ciclinas sean las proteínas limitantes de la velocidad en el desencadenamiento de las transiciones del ciclo celular fue descubierto empleando un sistema de un extracto embrionario. Utilizando extractos de huevos de rana, los investigadores mostraron que las ciclinas mitóticas son suficientes para inducir la mitosis. Extractos

citoplasmáticos preparados a partir de huevos no fertilizados de *Xenopus* contienen todos los materiales (mRNA y proteínas) necesarios para múltiples ciclos celulares. Cuando los núcleos preparados a partir de espermatozoides de *Xenopus* (los núcleos de los espermatozoides se usan en este experimento porque se aíslan fácilmente en gran número) se añaden a un extracto de huevos de este tipo, los núcleos y el DNA de su interior son inducidos a comportarse como si avanzaran a través del ciclo celular, es decir, replican su DNA y luego sufren mitosis en el extracto. De modo concomitante con las etapas finales de la mitosis, los niveles de ciclina declinan (Fig. 19-13a). Los investigadores deseaban determinar si esta proteína con sus niveles fluctuantes de hecho tenía la habilidad de inducir mitosis. Dado que las ciclinas mitóticas parecían ser inestables al final de la mitosis, los investigadores razonaron que, al eliminar el mRNA del extracto de huevos, se evitaría la nueva síntesis de todas las proteínas inestables del siguiente ciclo celular, incluyendo las de las ciclinas mitóticas (todas las otras proteínas estables estarían presentes en el extracto). Para hacer esto, digirieron todos los mRNA con una baja concentración de RNasa, que luego fue inactivada por la adición de un inhibidor específico. Este tratamiento

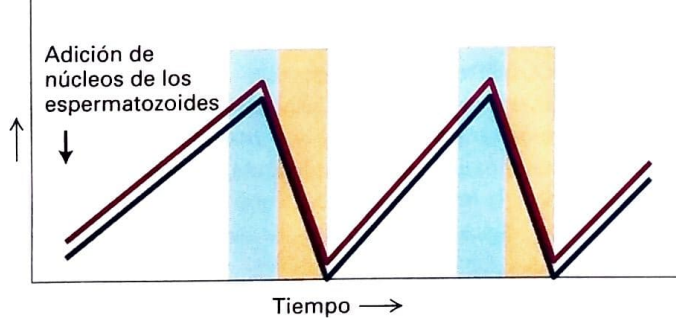
(a) Extracto no tratado



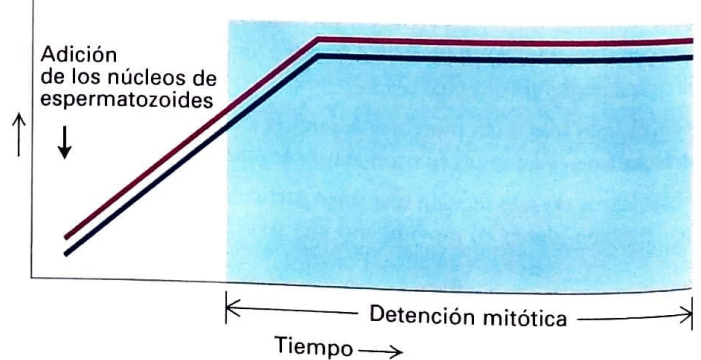
(b) Extracto tratado con RNasa



(c) Extracto tratado con RNasa más mRNA de ciclina mitótica tipo silvestre



(d) Extracto con RNasa más mRNA de ciclina mitótica no degradable



— = Actividad de CDK mitóticas
— = Concentración de ciclinas mitóticas
= Eventos mitóticos tempranos
= Eventos mitóticos tardíos

FIGURA EXPERIMENTAL 19-13 Las ciclinas mitóticas son limitantes de la velocidad para la mitosis. En todos los casos, la actividad de la CDK mitótica y la concentración de la ciclina mitótica fueron determinadas en varios momentos después de añadir núcleos de espermatozoides a un extracto de huevos de *Xenopus*, tratados según se indica en cada panel. Las observaciones microscópicas determinaron la ocurrencia de eventos mitóticos tempranos

(sombreado en azul), que incluyeron la condensación cromosómica y el desensamblaje de la envoltura nuclear, y de eventos tardíos (sombreado en anaranjado), incluyendo la descondensación cromosómica y el reensamblaje de la envoltura nuclear. Véase el texto para un análisis. (Véase A. W. Murray y cols., 1989, *Nature* 339:275; adaptado de A. Murray y T. Hunt, 1993, *The Cell Cycle: An Introduction*, W. H. Freeman y compañía.)

destruye los mRNA sin afectar los tRNA o los rRNA necesarios para la síntesis de proteínas. Cuando se añadieron los núcleos de espermatozoides a los extractos tratados con RNasa, los núcleos replicaron su DNA pero no sufrieron mitosis. Más aún, la proteína ciclina mitótica no fue detectada (Fig. 19-13b). La adición del mRNA de ciclina mitótica producida in vitro a partir de cDNA de ciclina mitótica clonada al extracto de huevos tratados con RNasa indujo la mitosis, según se observó con el extracto de huevos no tratados (Fig. 19-13c). Dado que la ciclina mitótica es la única proteína recién sintetizada en estas condiciones, estos resultados demostraron que la proteína es el único limitante para entrar en mitosis. Estudios posteriores demostraron que las ciclinas de fase G₁/S tienen propiedades similares. Su expresión es suficiente para promover el ingreso en el ciclo celular y, por lo tanto, todas las otras proteínas necesarias para el ingreso en el ciclo están presentes en cantidades ilimitadas. Así queda claro que la regulación de los niveles de ciclina es un aspecto esencial del ciclo celular eucarionte. Como veremos en la sección siguiente, las células emplean

múltiples mecanismos para restringir las ciclinas a la etapa adecuada del ciclo celular y para mantenerlas en la concentración correcta.

Los niveles de ciclina primariamente están regulados por la degradación proteica

Múltiples mecanismos aseguran que las CDK sean activas en la etapa adecuada del ciclo celular. El Cuadro 19-2 muestra una lista de estos reguladores clave de las CDK. En esta sección, analizaremos de qué manera la regulación de los niveles de ciclina se lleva a cabo. La activación precisa en el tiempo de las CDK depende, en parte, de la presencia de las ciclinas adecuadas en la etapa del ciclo celular en la que son necesarias. El control de la transcripción de las subunidades de ciclina es un mecanismo que asegura la expresión temporal adecuada de estas. En las células somáticas y en las levaduras, olas de actividad de los factores de transcripción ayudan a establecer olas de actividad de las ciclinas. Un principio general aquí es que una ola previa de actividad

Cuadro 19-2 Reguladores de la actividad de la ciclina

Tipo de regulador	Función
Cinasas y fosfatasa	
Cinasa CAK	Activa CDK
Cinasa Wee1	Inhibe CDK
Fosfatasa Cdc25	Activa CDK
Fosfatasa Cdc14	Activa Cdh1 para degradar ciclinas mitóticas
Fosfatasa Cdc25A	Activa CDK de la fase S en los vertebrados
Fosfatasa Cdc25C	Activa CDK mitóticas de los vertebrados
Proteínas inhibidoras	
Sic1	Se une e inhibe las CDK de la fase S
CKI p27 ^{KIP1} , p57 ^{KIP2} , p21 ^{CIP}	Se une e inhibe CDK
INK4	Se une e inhibe CDK de G ₁
Rb	Se une a E2F y evita la transcripción de múltiples genes de ciclo celular
Proteínligasas-ubiquitina	
SCF	Degradación de Sic1 o de p27 ^{KIP1} fosforiladas para activar las CDK de la fase S
CPA/C + Cdc20	Degradación de la securina, inicio de la anafase. Induce la degradación de ciclinas tipo B
CPA/C + Cdh1	Degradación de ciclinas tipo B en G ₁ y geminina en los metazoarios para permitir la carga de helicasas replicativas en los orígenes de replicación del DNA

transcripcional ayuda a producir los factores esenciales para generar una ola transcripcional posterior. Como veremos en la Sección 19.4, la transcripción de las ciclinas de la fase G_1/S es promovida por el **complejo de factores de transcripción E2F**. Entre los muchos otros genes que transcribe el E2F, se encuentran los factores de transcripción que promoverán la síntesis de las ciclinas mitóticas.

El control regulador más importante que restringe las ciclinas a la etapa adecuada del ciclo celular es la degradación mediada por ubiquitina de proteínas dependientes de los proteasomas. Dado que la degradación de las proteínas es un proceso irreversible, en el sentido de que las proteínas solo pueden ser vueltas a completar a través de la síntesis proteica de novo, este mecanismo de regulación es ideal para asegurar que la maquinaria del ciclo celular sea impulsada hacia adelante y que las células no puedan “retroceder” en el ciclo celular. En otras palabras, una vez que una ciclina particular se degradó, el proceso que se activa ya no puede ocurrir.

Recuerde que durante la degradación de proteínas mediada por ubiquitina, las ligasas de proteínas-ubiquitina poliubiquitinan las proteínas sustrato, marcándolas para la degradación por los proteasomas (véase la Fig. 3-29). Las ciclinas se degradan a través de la acción de dos ligasas ubiquitina-proteína diferentes, la **SCF** (que reciben su nombre de las primeras letras de sus constituyentes, Skp1, Culina, proteínas de la caja *F*) y el **complejo promotor de la anafase o ciclosoma** (abreviado **CPA/C** en este capítulo). El SCF controla las fase de transición de G_1/S por la degradación de las ciclinas de G_1 /fase *S* y, como veremos en detalle en breve, las proteínas inhibidoras CDK. El CPA/C degrada las ciclinas de la fase *S* y las de la mitosis; por lo tanto, promueve la salida de la mitosis. El CPA/C controla también el establecimiento de la segregación de los cromosomas en la transición metafase-anafase al degradar una proteína inhibidora de la anafase (tratada en la Sección 19.6).

El SCF y el CPA/C son ligasas de ubiquitina de múltiples subunidades que pertenecen a la familia del anillo RING de ligasas y ubiquitina. A pesar del hecho de que SCF y CPA/C pertenecen a la misma familia de ligasas y ubiquitina, su regulación es bastante distinta. El SCF reconoce sus sustratos solo cuando están fosforilados. Tiene actividad continua durante todo el ciclo celular, y la fosforilación regulada durante el ciclo celular de sus sustratos asegura que solo sean degradados en ciertas etapas del ciclo celular. En el caso de la degradación de proteínas dependiente de CPA/C, la regulación se revierte. Los sustratos son reconocibles a lo largo todo del ciclo celular, pero la actividad del CPA/C está regulada por el ciclo celular. El CPA/C es activado por la fosforilación en la transición metafase-anafase, a través de la acción de las CDK mitóticas y de otras proteincinasas. Luego, el CPA/C es activo durante todo el resto de la mitosis y durante la G_1 para promover la degradación de las ciclinas y de otros reguladores de la mitosis (véase la Fig. 19-11). La especificidad de sustratos del CPA/C fosforilado activo está determinada parcialmente por su asociación con uno o dos factores de direccionamiento al sustrato llamados Ccd20 y Cdh1. Durante la anafase, el CPA/C unido a Cdc20 ubiquitina las proteínas que llevan a la segregación de los cromosomas, mientras que durante la telofase y G_1 , el CPA/C-Cdh1 tiene como diana diferentes sustratos para su degradación. Los sustratos del CPA/C contienen motivos de reconocimiento. El primero en ser identificado es la **caja de destrucción**. Se encuentra en la mayoría de las ciclinas de fase *S* y mitóticas. Esta caja de destrucción es necesaria y suficiente para marcar las proteínas para su degradación.

Hoy en día sabemos que la degradación de las ciclinas en la transición adecuada del ciclo celular es esencial para el avance del ciclo celular. La importancia de la degradación de las ciclinas nuevamente fue

demostrada inicialmente en extractos de huevo de rana. Recuerde que la acumulación de ciclinas mitóticas no solo coincidió con la entrada en la mitosis, sino que su desaparición ocurrió concomitantemente con la salida de la mitosis. Este hallazgo hizo surgir la posibilidad de que la degradación de las ciclinas mitóticas fuera necesaria para que las células salieran de la mitosis. Para probar esto, los investigadores añadieron un mRNA que codificaba para una ciclina mitótica no degradable (que carecía de la caja de destrucción) a una mezcla de un extracto de huevos de *Xenopus* tratados con RNasa y núcleos de espermatozoides. Como se muestra en la Figura 19-13d, la entrada en la mitosis ocurrió según estaba programado, pero no así la salida de esta etapa. Este experimento demuestra que la salida de la mitosis requiere la degradación de la ciclina mitótica. Estudios posteriores demostraron que la inhibición de la degradación de otras ciclinas también afectó gravemente el avance del ciclo celular, lo cual indica que la degradación de las ciclinas mediada por ubiquitina es un aspecto esencial del ciclo celular eucarionte.

Las CDK están reguladas por la fosforilación activadora e inhibidora

La regulación de los niveles de ciclinas no es el único mecanismo que controla la actividad de las CDK. Los eventos de fosforilación activadora e inhibidora de la subunidad de CDK son esenciales para controlar la actividad de CDK-ciclina. La fosforilación de un residuo de treonina cercano al sitio activo de la enzima es necesaria para la actividad de las CDK. Esta fosforilación está mediada por la **cinasa activadora de CDK (CAK)**. En algunos organismos, la unión de la ciclina es un prerrequisito para la fosforilación de las CAK, mientras que en otros este evento de fosforilación ocurre antes de la unión a la ciclina. Aunque la secuencia de ensamblaje de CDK activa difiere entre los organismos, queda claro que la fosforilación de CAK de las CDK no es un paso limitante de la velocidad en la activación de las CDK. La actividad de las CAK es constante durante todo el ciclo celular y fosforila las CDK tan pronto como se forma un complejo ciclina-CDK.

Hay dos fosforilaciones inhibidoras sobre las CDK que desempeñan un papel crítico en el control de la actividad de las CDK. Contrario a lo que ocurre en la fosforilación activadora inducida de CAK, estas fosforilaciones inhibidoras están reguladas. Una tirosina altamente conservada (Y15 en las CDK humanas) y una treonina adyacente (T14 en los humanos) están sujetas a fosforilación regulada. Ambos residuos están situados en un bolsillo que une ATP de las CDK, y su fosforilación muy probablemente interfiere con el posicionamiento del ATP en el bolsillo. Los cambios en la fosforilación de estos sitios son esenciales para la regulación de las CDK mitóticas y también han sido implicados en el control de las CDK de la fase G_1/S y *S*. Como veremos en la Sección 19.5, una cinasa altamente conservada llamada Wee1 lleva a cabo esta fosforilación inhibidora, y una fosfatasa altamente conservada llamada Cdc25 media la desfosforilación.

Los inhibidores de las CDK controlan la actividad de la ciclina-CDK

Hasta ahora hemos analizado la importancia de regular los niveles de las proteínas ciclinas reguladoras y de la fosforilación de las CDK para el control de la actividad de estas. La capa última de control, que es de importancia crítica en la regulación de las CDK, es una familia de proteínas conocidas como **inhibidores de las CDK**, o **CKI**, que se unen directamente al complejo ciclina-CDK e inhiben su actividad. Como

veremos en la Sección 19.4, estas proteínas desempeñan un papel de especial importancia en la regulación de la transición de G_1/S y su integración con las señales extracelulares. Así, no resulta sorprendente que los genes que codifican estas CKI con frecuencia se encuentren mutados en los cánceres humanos (analizado en el Cap. 24).

Todos los eucariontes albergan CKI implicadas en la regulación de las CDK de fase S y mitóticas. Si bien estos inhibidores exhiben escasa similitud de secuencia, todos son esenciales para evitar la activación prematura de las CDK de fase S y fase M. Los inhibidores de las CDK G_1 desempeñan un papel esencial en la mediación de la detención G_1 en respuesta a señales de inhibición de la proliferación. Una clase de CKI, llamadas *INK4s* (inhibitors of kinase 4 o inhibidores de la cinasa 4), incluye varias proteínas pequeñas muy relacionadas que interactúan solamente con las CDK de G_1 . La unión de las INK4 a las CDK4 y CDK6 bloquea su interacción con la ciclina D y, así, su actividad de protein-cinasa. Una segunda clase de CKI presente en las células de los metazoarios consiste en tres proteínas (p21^{CIP}, p27^{KIP1} y p57^{KIP2}). Estas CKI inhiben las CDK de fase G_1/S y de fase S y deben degradarse antes de que pueda comenzar la replicación del DNA. Como analizaremos en la Sección 19.7, la p21^{CIP} desempeña un papel importante en la respuesta de las células de los metazoarios al daño del DNA. Las CDK G_1 reguladas por las CKI desempeñan un papel crítico en la prevención de la formación de tumores. Por ejemplo, ambas copias del gen *INK4* que codifica p16 están inactivadas en una gran fracción de los cánceres humanos.

Alelos CDK especiales condujeron al descubrimiento de las funciones de las CDK

Diferentes CDK inician distintas fases del ciclo celular al fosforilar proteínas específicas. Ahora queda claro que más que fosforilar un pequeño número de proteínas, que a su vez inician cierta etapa del ciclo

celular, las CDK fosforilan una miríada de sustratos, iniciando de forma directa todos los aspectos de una fase dada del ciclo celular. El análisis de un pequeño número de sustratos ha proporcionado ejemplos de cómo la fosforilación por las CDK mitóticas media mucho de los eventos tempranos de la mitosis: la condensación de los cromosomas, la formación del huso mitótico y el desensamblaje de la envoltura nuclear. Analizaremos estos eventos en detalle en las secciones siguientes.

En años recientes, se han iniciado esfuerzos sistemáticos para identificar todos los sustratos de las CDK. El desafío consistente en identificar los sustratos de una cinasa particular es cómo distinguir los eventos de fosforilación de la cinasa de aquellos llevados a cabo por otras cinasas. Un hecho fundamental en la comprensión de qué proteínas son diana de las CDK fue facilitado por la ingeniería de una mutante de CDK en las levaduras en gemación que puede emplear un análogo del ATP que no es unido por otras cinasas (Fig. 19-14). Este análogo del ATP tiene un grupo bencilo de gran tamaño unido al N_6 de la adenina, que hace que el análogo sea demasiado grande para encajar en el bolsillo que une ATP de las cinasas de tipo silvestre. Sin embargo, el bolsillo que une ATP de la CDK mutante fue modificado para acomodar este análogo grande del ATP. En consecuencia, solo la CDK mutante puede emplear este análogo del ATP como sustrato para transferir sus fosfato γ a una cadena lateral proteica. Cuando el análogo del ATP bencilo N_6 con un fosfato γ marcado fue incubado con extractos celulares de levadura que contenían una CDK mitótica recombinante con el bolsillo de unión al ATP alterado, se marcaron múltiples proteínas. Los sustratos de la CDK mitótica de la levadura verdadera pudieron ser verificados entre estos sustratos potenciales, tratando las células que expresaban la CDK mutante con un derivado similar de otro análogo del ATP que une la CDK mutante del mismo modo que el análogo del ATP bencilo N_6 pero que no puede ser usado para la fosforilación del sustrato. Dado que el grupo bencilo de gran tamaño es estéricamente bloqueado para

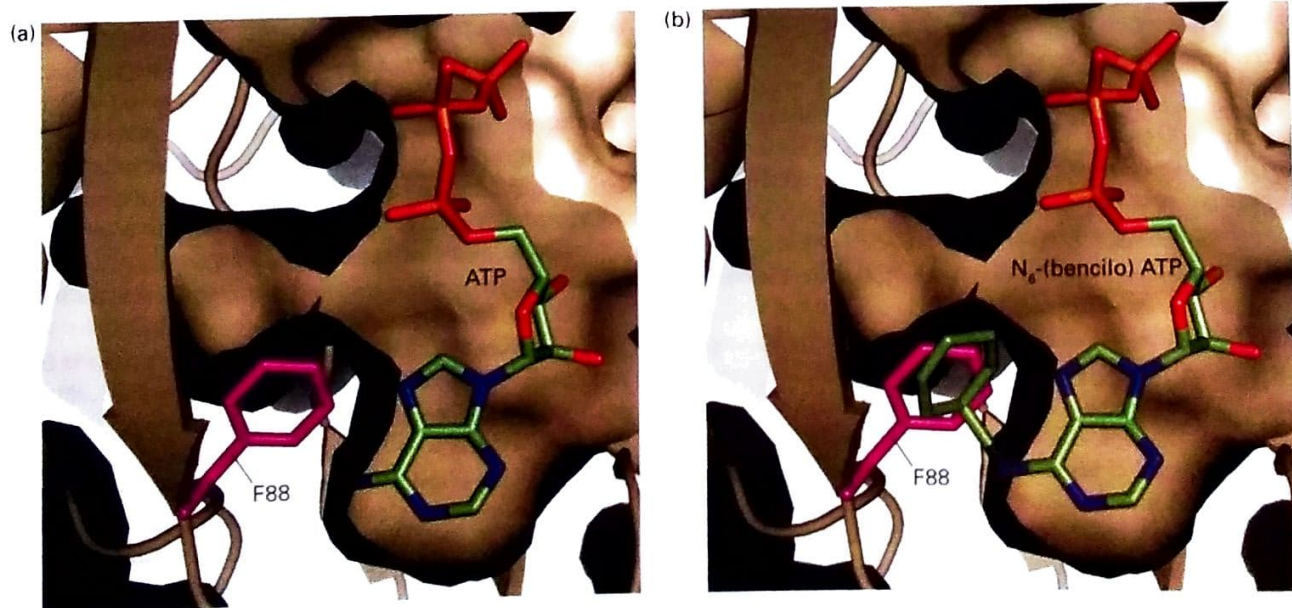


FIGURA 19-14 Mutante dependiente de análogo de ATP-CDK. (a) Representación de los sitios de unión al ATP y catalítico de la CDK1 (llamado Cdc28 en una levadura en gemación) de *S. cerevisiae* de tipo silvestre. El ATP y una cadena lateral de fenilalanina (púrpura) unidos en la vecindad del bolsillo de unión se muestran en formato de palillo. (b) Análogos de ATP de gran tamaño como los que contienen un grupo bencilo unido al nitrógeno amino N_6 son demasiado grandes como para encajar en el bolsillo de unión al ATP de las

proteincinasas de tipo silvestre y, por lo tanto, no pueden ser utilizados por ellas. En la mutante CDK de *S. cerevisiae*, la fenilalanina de la posición 88 se cambia por glicina, que carece de cadena lateral. La mutante exhibe alta actividad de protein-cinasa empleando N_6 -(bencilo) ATP. Estos modelos de CDK de *S. cerevisiae* se basan sobre estructuras cristalizadas del dominio PKA cinasa, que comparte una extensa homología con el dominio de cinasa de CDK de *S. cerevisiae*. (Véase: A. Ubiersax y cols., 2003, *Nature*, 425:589; K. Shah y cols., 1997, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 94:365.)

unirse a todas las otras cinasas, en consecuencia se inhibe solo la CDK mutante. Cuando las células que expresan la CDK mutante se trataron con este inhibidor específico de la CDK, la mayoría de las dianas de CDK mitótica, putativa, inicialmente identificadas se encontraron en estado desfosforilado, lo cual indica que estas proteínas en realidad son fosforiladas por las CDK *in vivo* e *in vitro*. En las levaduras, este procedimiento identificó la mayoría de los sustratos de CDK conocidos, más una cantidad superior a 50 proteínas adicionales en las levaduras. Enfoques similares se emplearon también en células de mamíferos para identificar sustratos de CDK. Por ejemplo, una búsqueda de sustratos para la ciclina CDK, A-CDK2 de la fase S, reveló 180 sustratos potenciales. Estos están siendo actualmente analizados respecto de sus funciones en el proceso del ciclo celular.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 19.3

Regulación de la actividad de la cinasa dependiente de ciclina (CDK)

- Las cinasas dependientes de ciclina se activan por las subunidades de las ciclinas. Su actividad está controlada en múltiples niveles.
- Diferentes subunidades de las ciclinas activan las CDK en distintas etapas del ciclo celular. Las ciclinas están presentes solamente en las etapas del ciclo celular que promueven.
- La degradación de las proteínas es el mecanismo clave responsable de restringir a las ciclinas en la etapa del ciclo celular adecuada. Esta degradación está mediada por el sistema de proteasoma ubiquitina y las ligasas de ubiquitina CPA/C y SCF.
- La activación y la fosforilación inhibidora de la subunidad de CDK contribuyen a la regulación de su actividad.
- Los inhibidores de las CDK (CKI) inhiben la actividad de las CDK al unirse directamente al complejo ciclina-CDK.
- Las CDK inician cada aspecto de cada etapa del ciclo celular al fosforilar muchas proteínas diana diferentes. Los esfuerzos sistemáticos de emplear proteincinasas diseñadas por ingeniería genética para unirse solo a formas modificadas del ATP han conducido a la identificación de muchos de estos sustratos.

19.4 Compromiso con el ciclo celular y replicación del DNA

La sección previa describió los múltiples mecanismos que controlan los diferentes complejos ciclina-CDK. En esta sección y en las dos siguientes, examinaremos cada etapa del ciclo celular cuidadosamente y analizaremos de qué manera una etapa particular del ciclo es inducida y controlada. Examinaremos de qué manera las células inician la replicación del DNA y la mitosis y cómo se segregan los cromosomas. Nos centraremos en el modo en que los complejos ciclina-CDK y otros reguladores clave del ciclo celular impactan en cada una de sus fases y examinaremos los mecanismos que coordinan sus actividades.

Esta sección investiga el modo en que las células deciden si se dividirán o no lo harán y de qué modo se inicia la replicación del DNA. El

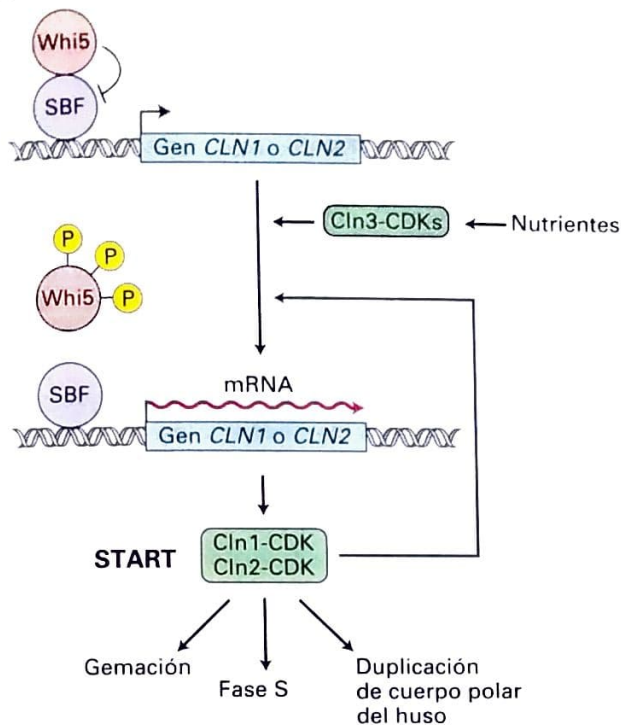
proceso de entrada al ciclo celular se comprende bien en las levaduras en gemación, y en este organismo fue en el que inicialmente se descubrió esta transición del ciclo celular. Por lo tanto, examinaremos en primer término los eventos moleculares que gobiernan la entrada en el ciclo celular en la levadura en gemación. Luego, investigaremos las similitudes sorprendentes entre las vías que gobiernan la entrada en el ciclo celular en las levaduras y las células de metazoarios y debatiremos acerca del hecho de que muchos genes implicados en esta decisión con frecuencia están mutados en el cáncer. Luego, veremos que la decisión de entrar en el ciclo celular está bajo la influencia de eventos extracelulares y aprenderemos acerca de los mecanismos de señalización que expresan estas pistas extracelulares a la maquinaria del ciclo celular. Finalmente, debatiremos acerca de los mecanismos moleculares que gobiernan la iniciación de la replicación del DNA. Describiremos el modo en que la degradación de una CKI de fase S resulta esencial para este proceso y descubriremos el modo en que las CDK aseguran que la replicación del DNA ocurra solo durante la fase S y, entonces, únicamente en una ocasión.

Las células están comprometidas irreversiblemente en la división celular en un punto del ciclo celular llamado START

En la mayoría de las células eucariontes, la decisión clave de si una célula se dividirá o no se hace en el punto en el cual esta entra o no a la fase S. En la mayoría de los casos, una vez que la célula está comprometida para ingresar en el ciclo celular, debe completarlo. La levadura en gemación *Saccharomyces cerevisiae* regula su proliferación de este modo, y gran parte de nuestra comprensión actual de los mecanismos moleculares que controlan la entrada en el ciclo celular se originaron con estudios genéticos sobre *S. cerevisiae*.

Cuando las células de *S. cerevisiae* en G_1 han crecido lo suficiente, comienzan un programa de expresión génica que conduce al ingreso en el ciclo celular. Si las células en G_1 se cambian de un medio rico a un medio bajo en nutrientes antes de que hayan alcanzado un tamaño crítico, permanecerán en G_1 y crecerán con lentitud hasta que sean lo suficientemente grandes como para entrar en el ciclo celular. Sin embargo, una vez que las células en G_1 alcanzan el tamaño crítico, están condicionadas a completar el ciclo celular ingresando en la fase S y procederán a través de G_2 y mitosis, aunque se las haya cambiado a un medio bajo en nutrientes. El punto en la G_1 tardía en que las células de *S. cerevisiae* irrevocablemente están condicionadas a ingresar y atravesar el ciclo celular completo se denomina **START**.

La actividad de CDK es esencial para la entrada a la fase S. Esto se notó por primera vez en las levaduras en gemación, donde mutantes sensibles a la temperatura en el gen que codifica para la CDK1 se detienen en G_1 y fracasan en formar un brote y en iniciar la replicación del DNA (CDK1 es la única CDK en el genoma de la levadura en gemación y se conoce como *CDC28*). Sabemos ahora que una cascada de CDK desencadena el ingreso en el ciclo celular. Las CDK de G_1 estimulan la formación de las CDK de la fase G_1/S , que luego inician la formación del brote, la duplicación del centrosoma y la replicación del DNA. En las levaduras, el gen de la ciclina G_1 se llama *CLN3* (Fig. 19-15a). Su mRNA se produce a nivel casi constante durante todo el ciclo celular, pero su traducción es regulada en respuesta a los niveles de nutrientes y, como veremos en breve, *CLN3* es un eje que acopla la entrada del ciclo celular a señales de nutrientes. Una vez que se ha sintetizado suficiente Cln3 a partir de su mRNA, se fosforilan los complejos Cln3-

(a) *S. cerevisiae*

(b) Metazoarios

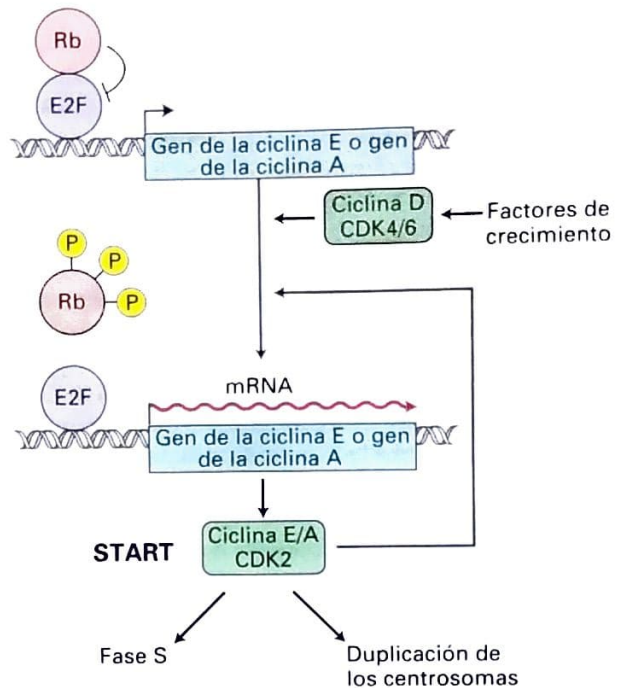


FIGURA 19-15 Control de la transición de fase G₁-S. (a) En la levadura en gemación, la actividad de Cln3-CDK se eleva durante G₁ y está controlada por la disponibilidad de nutrientes. Una vez que está lo suficientemente activa, la cinasa fosforila el inhibidor de la transcripción Whi5 y promueve su exportación desde el núcleo. Esto provoca que el complejo del factor de transcripción SBF induzca la transcripción de las ciclinas de fase G₁/S *CLN1* y *CLN2* y otros genes cuyos productos son necesarios para la replicación del DNA. Las CDK de fase G₁/S adicionalmente fosforilan Whi5, promoviendo la transcripción adicional de *CLN1* y *CLN2*. Una vez que se han producido niveles suficientemente altos de CDK de fase G₁/S, se atraviesa el START. Las células entran al ciclo celular: inician la replicación del DNA, la formación de los brotes y la duplicación del

cuerpo polar del huso. (b) En los vertebrados, la actividad de G₁-CDK se eleva durante G₁ y es estimulada por la presencia de los factores de crecimiento. Cuando se sostiene la señalización de los mitógenos, los complejos resultantes ciclina D-CDK4/6 comienzan a fosforilar Rb y liberan cierta cantidad de E2F, que estimula la transcripción de los genes que codifican la ciclina E2, CDK2 y el propio E2F. Los complejos ciclina E-CDK2 fosforilan adicionalmente Rb, lo que da como resultado un bucle de retroalimentación positiva que conduce a un rápido aumento en la expresión y actividad tanto de E2F como de ciclina E-CDK2. Una vez que la CDK de fase G₁/S es suficientemente elevada, las células atraviesan el START. Comienza la replicación del DNA y la duplicación de los centrosomas.

CDK y se inactiva el represor transcripcional Whi5. La fosforilación del Whi5 promueve su exportación fuera del núcleo, lo que permite que el complejo del factor de transcripción SBF induzca la transcripción de los genes de ciclina de fase G₁/S *CLN1* y *CLN2* así como de otros genes importantes para la replicación del DNA. Una vez producido, Cln1/2-CDK contribuye a la fosforilación ulterior de Whi5. Este bucle de retroalimentación positiva asegura la rápida acumulación de CDK de fase G₁/S. Una vez que se ha alcanzado el nivel crítico de Cln1/2-CDK, estas CDK de fase G₁/S promueven la formación de brotes, la entrada a la fase S y la duplicación del centrosoma (conocido también como cuerpo polar del huso, que posteriormente en el ciclo celular organizará el huso mitótico). Este estado de actividad CDK de la fase G₁/S, suficiente para iniciar la fase S, la formación de brotes y la duplicación del centrosoma, es la definición molecular de START.

El factor de transcripción E2F y su regulador Rb controlan la transición G₁-fase S en los metazoarios

Los eventos moleculares que gobiernan el ingreso a la fase S en los mamíferos (y de hecho en todos los metazoarios) son notablemente similares a los de las levaduras en gemación (Fig. 19-15b). Las ciclinas G₁ están presentes durante todo G₁ y con frecuencia se encuentra que

se expresan en niveles aumentados en respuesta a los factores de crecimiento. A su vez, las CDK G₁ activan los miembros de una pequeña familia de factores de transcripción relacionados, conocidos colectivamente como *factores de transcripción E2F* (E2F). Durante G₁, los E2F se mantienen inactivos a través de su asociación con la proteína del retinoblastoma (Rb), y las CDK de G₁ activan las E2F al fosforilar e inactivar la Rb. Los E2F luego activan genes que codifican muchas de las proteínas implicadas en la síntesis del DNA. También estimulan la transcripción de genes que codifican para las ciclinas de la fase G₁/S y la fase S. Así, los E2F funcionan en la G₁ tardía de forma similar al complejo del factor de transcripción SBF de *S. cerevisiae*.

Resulta clave para la regulación de la función de E2F la **proteína Rb**. Cuando los E2F están unidos a la Rb, funcionan como represores de la transcripción. Esto ocurre porque la Rb recluta enzimas que modifican cromatina, que promueven la desacetilación y metilación de lisinas específicas de las histonas, que hacen que la cromatina asuma una forma condensada inactiva para la transcripción. La Rb inicialmente fue identificada como el gen mutado en el retinoblastoma, un cáncer infantil de la retina. Estudios posteriores encontraron que *RB* estaba inactivado en casi todas las células cancerosas por mutación de ambos alelos de *RB* o por la regulación anormal de la fosforilación de Rb.

La regulación de la proteína Rb por las CDK G_1 de las células de mamífero es análoga a la regulación de las CDK-Cln3 de *Whi5* en las levaduras. La fosforilación en múltiples sitios por las CDK G_1 evita la asociación de Rb con E2F y promueve su exportación al exterior del núcleo. Esto permite que E2F active la transcripción de los genes necesarios para la entrada a la fase S. Una vez que la expresión de los genes que codifican para las ciclinas G_1/S y CDK es inducida por la fosforilación de ciertas moléculas Rb, los complejos CDK de fase G_1/S resultantes fosforilan adicionalmente Rb en la G_1 tardía. Esto es uno de los principales eventos bioquímicos responsables del paso a través de la START. Dado que E2F también estimula su propia expresión y la de la CDK-ciclina G_1/S , la regulación cruzada positiva de E2F y CDK-ciclina G_1/S produce un incremento rápido de ambas actividades en la G_1 tardía.

A medida que se acumulan, las CDK de fase S y las CDK mitóticas mantienen la proteína Rb en estado fosforilado durante las fases S, G_2 y M temprana. Después de que las células completan la anafase e ingresan en la G_1 temprana o G_0 , una caída en todas las actividades de la ciclina-CDK conduce a la desfosforilación de Rb. En consecuencia, la Rb hipofosforilada está disponible para inhibir la actividad de E2F durante la G_1 temprana del siguiente ciclo y en las células detenidas en G_0 . Así, la actividad de CDK de la fase G_1/S permanece baja hasta que las células deciden ingresar en un nuevo ciclo celular y las CDK de G_1 rompen el asa inhibidor de Rb sobre E2F.

Las señales extracelulares gobiernan la entrada en el ciclo celular

Que las células entren o no en el ciclo celular depende de la influencia extracelular, como así de señales intracelulares. Los organismos unicelulares, como las levaduras por ejemplo, entran en el ciclo celular solo cuando han alcanzado un tamaño adecuado, conocido como **tamaño celular crítico**. A su vez, este tamaño crítico está controlado por los nutrientes disponibles en el ambiente. Esta coordinación entre el tamaño celular y la entrada en el ciclo celular será analizada en la Sección 19.7. Aquí restringimos nuestra discusión al hecho de que la síntesis de la ciclina G_1 es una respuesta a la velocidad de la síntesis proteica, que a su vez está controlada por vías reguladas por los nutrientes del medioambiente. Esta vinculación entre la biosíntesis de macromoléculas y la maquinaria del ciclo celular se comprende mejor en las levaduras en gemación. En estos organismos, el transcripto de ciclinas *G1 CLN3* contiene un marco de lectura abierto corriente arriba, corto que inhibe la iniciación de la traducción en el marco de lectura abierto *Cln3* cuando los nutrientes están limitados. Esta inhibición está disminuida cuando los nutrientes son abundantes. En presencia de suficientes nutrientes, la vía TOR, que detecta los nutrientes y las señales de factores de crecimiento, está activa y la vía estimula la actividad traduccional (véase la Fig. 8-30). Dado que la *Cln3* es una proteína muy inestable, su concentración fluctúa con la velocidad de traducción de su mRNA. En consecuencia, la actividad y cantidad de los complejos *Cln3*-CDK, que depende de la concentración de la proteína *Cln3*, está en gran medida regulada por los niveles de nutrientes.

En los organismos multicelulares, las células están rodeadas por nutrientes y, como tales, los nutrientes por lo general no son limitantes de la velocidad para la proliferación. En realidad, la proliferación está regulada por la presencia de factores que promueven el crecimiento (**mitógenos**) y factores inhibidores del crecimiento (**an-**

timitógenos) en las vecindades de la célula. La adición de mitógenos a células de mamífero detenidas en G_0 induce (como analizamos en el Capítulo 16) vías de transducción de las señales ligadas a la tirosinasa que inician cascadas de transducción de las señales que finalmente influyen la transcripción y el control del ciclo celular. Hacen esto de múltiples modos.

Los mitógenos activan la transcripción de múltiples genes. La mayoría de estos genes caen en una de dos clases (genes de *respuesta temprana* o *respuesta demorada*) dependiendo de cuán pronto aparezcan sus mRNA codificados. La transcripción de los genes de respuesta temprana es inducida a los pocos minutos después de la adición de factores de crecimiento por cascadas de transducción de la señal que activan factores de transcripción preexistentes en citosol o en el núcleo (véase el Cap. 16). Muchos de los genes de respuesta temprana codifican factores de transcripción, tales como c-Fos y c-Jun, que estimulan la transcripción de los genes de respuesta demorada. Los factores de transcripción de respuesta temprana AP-1 y Myc inducen la transcripción de genes que codifican las ciclinas G_1 y CDK. Además de estar controlados por la transcripción de genes que codifican las ciclinas G_1 , las CDK G_1 están reguladas por las CKI. La CKI p15INK4b es un potente inhibidor de CDK. En algunos tejidos, los mitógenos inhiben la producción de esta CKI al impedir su transcripción.

La proliferación celular en muchos tejidos no solo está regulada por los mitógenos que promueven la proliferación, sino también por antimitógenos, que evitan la entrada en el ciclo celular. De modo similar, durante la diferenciación las células dejan de dividirse e ingresan en G_0 . Algunas células diferenciadas (p. ej., fibroblastos y linfocitos) pueden ser estimuladas para reingresar en el ciclo y replicarse. Sin embargo, muchas células diferenciadas posmitóticas, nunca reingresan en el ciclo celular para replicarse nuevamente. Los antimitógenos y las vías de diferenciación evitan la acumulación de las CDK G_1 . Antagonizan la producción de la ciclina G_1 e inducen la producción de CKI. El factor β de crecimiento transformante (TGF- β) es un antimitógeno importante. Esta hormona induce una cascada de señalización que detiene G_1 e induce la expresión de p15INK4b. Como veremos en el Capítulo 24, las vías de señalización que regulan las CDK de G_1 están mutadas en la mayoría de los cánceres humanos.

La degradación de un inhibidor CDK de la fase S desencadena la replicación del DNA

El ingreso en la fase S está definido por el desenrollamiento de los orígenes de replicación del DNA. Los eventos moleculares que conducen a este evento se conocen mejor en *S. cerevisiae*. Las CDK de fase G_1/S desempeñan un papel esencial en este proceso. Apagan la maquinaria de degradación que degrada las ciclinas de la fase S durante la salida de la mitosis y G_1 e inducen la degradación de una CKI que inhibe la CDK de la fase S.

Uno de los sustratos importantes de los complejos CDK-ciclina de fase G_1/S es Cdh1. Durante la anafase tardía, este factor de direccionamiento al sustrato dirige el CPA/C para ubiquitinar proteínas del sustrato que incluyen a las ciclinas de la fase S y mitóticas marcándolas para la proteólisis por los proteasomas. El CPA/C-Cdh1 permanece activo durante todo G_1 y evita la acumulación prematura de las ciclinas mitóticas y de la fase S. La fosforilación de Cdh1 por las CDK ciclinas de G_1/S hace que se disocie del complejo CPA/C, lo que inhibe la ubiquitinación adicional de las ciclinas de fase S y mitóticas durante la G_1 tardía (Fig. 19-16). Esto, combinado con la transcripción inducida de

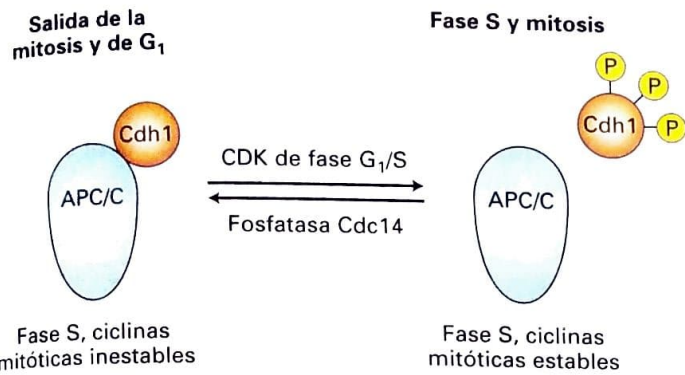


FIGURA 19-16 Regulación de los niveles de ciclina de fase S y mitótica en la levadura en gemación. En la anafase tardía, el complejo promotor de la anafase (CPA/C) ubiquitina las ciclinas de fase S y mitóticas. La actividad del CPA/C está dirigida hacia las ciclinas mitóticas por un factor de especificidad llamado Cdh1. La actividad de Cdh1 está regulada por la fosforilación. Durante la salida de la mitosis y G_1 , el factor de especificidad es desfosforilado y está activo; durante la fase S y la mitosis, el Cdh1 está fosforilado y se disocia del CPA/C, y la ubiquitinligasa es inactiva. Las CDK de fase G_1/S , que no son sustratos de CPA/C-Cdh1, fosforilan Cdh1 en la transición de G_1-S . Una fosfatasa específica llamada Cdc14 remueve el fosfato regulador del factor de especificidad en la anafase tardía.

las ciclinas de fase S durante la G_1 tardía, permite que las proteínas ciclinas de fase S se acumulen a medida que el complejo ciclina G_1/S -CDK aumente. Posteriormente en el ciclo celular, las CDK de fase S y mitóticas toman el control para mantener Cdh1 en el estado fosforilado y, por lo tanto, inactivo. Solo a medida que las CDK declinan y se activa una fosfatasa proteica conocida como Cdc14 estos fosfatos inhibitorios se eliminan de la Cdh1, lo que lleva a su reactivación. En las células de mamífero, hay mecanismos similares responsables de la estabilización de las ciclinas de fase S y mitóticas, pero la fosfatasa implicada en la desfosforilación de la Cdh1 no se ha identificado.

En *S. cerevisiae*, a medida que los heterodímeros ciclina-CDK de fase S se acumulan en la G_1 tardía después de la inactivación de CPA/C-Cdh1, inmediatamente se inactivan por la unión de una CKI llamada Sic1 que se

expresa tardíamente en la mitosis y en la G_1 temprana (Fig. 19-17). Dado que la Sic1 específicamente inhibe los complejos CDK de la fase S y de la fase M pero carece de efecto en los complejos CDK de la fase G_1 y de la fase G_1/S , funciona como un inhibidor de la fase S. La iniciación de la replicación del DNA ocurre cuando el inhibidor Sic1 se degrada precipitadamente después de su ubiquitinación por la proteinligasa-ubiquitina SCF.

La degradación de la Sic1 es inducida por su fosforilación de las CDK de fase G_1/S (véase la Fig. 19-17). Debe estar fosforilada en al menos seis sitios, que son sustratos relativamente malos para las CDK de fase G_1/S , antes de que se haya unido suficientemente bien por SCF para que sea ubiquitinada. Múltiples sitios de fosforilación de CDK de fase G_1/S , pobres, llevan a una respuesta ultrasensible del tipo interruptor en la degradación de Sic1 y, así, a la activación precipitada de las CDK de la fase S (Fig. 19-18). Si las Sic1 se inactivaran después de la fosforilación de un sitio único, las moléculas Sic1 comenzarían a fosforilarse tan pronto como los niveles de actividad CDK de fase G_1/S empezaran a elevarse, lo cual llevaría a una disminución gradual de los niveles de Sic1. Por el contrario, cuando varios sitios necesitan estar fosforilados a bajos niveles de actividad CDK de fase G_1/S , solo unos pocos sitios se fosforilan y Sic1 no se destruye. Solo cuando los niveles de CDK de fase G_1/S son altos, Sic1 está suficientemente fosforilada en múltiples sitios como para marcarla para su degradación. Así, la degradación de la Sic1 ocurre solo cuando la actividad de CDK de fase G_1/S ha alcanzado su máximo y virtualmente todos los demás sustratos de CDK de fase G_1/S han sido fosforilados.

Una vez que la Sic1 se ha degradado, los complejos ciclina-CDK de fase S inducen la replicación del DNA por, como veremos en breve, fosforilación de varias proteínas implicadas en la activación de las helicasas replicativas. Este mecanismo para activar los complejos ciclina-CDK de fase S (es decir, inhibirlos a medida que las ciclinas se sintetizan y luego degradar precipitadamente al inhibidor) permite la súbita iniciación de la replicación en un gran número de orígenes de replicación. Una ventaja obvia de la proteólisis para controlar el paso a través de este punto crítico en el ciclo celular es que la degradación proteica es un *proceso irreversible*, lo cual asegura que las células proceden en una dirección a través del ciclo. La dependencia de este evento en la fosforilación de múltiples sitios de baja fosforilación hace que la degradación de Sic1 y, por ende, la activación de la replicación del DNA sea abrupta.

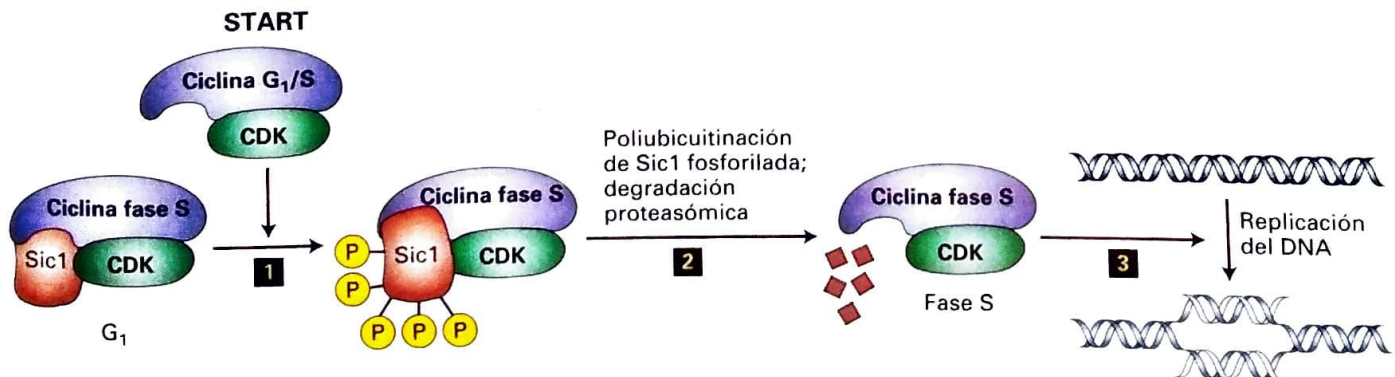


FIGURA 19-17 Control del establecimiento de la fase S tardía en *S. cerevisiae* por la proteólisis regulada del inhibidor de la fase S tardía, Sic1. Los complejos de ciclina-CDK de la fase S comienzan a acumularse en G_1 , pero son inhibidos por Sic1. Esta inhibición evita el inicio de la replicación del DNA hasta que las células hayan completado todos los eventos de G_1 . Las CDK de la fase G_1/S se ensamblan en la G_1 tardía, fosforilan Sic1 en múltiples

sitios (paso 1), marcándola para la ubiquitinación por la SCF ubiquitinligasa y la degradación proteasómica posterior (paso 2). Las CDK de fase S se activan y luego desencadenan la iniciación de la síntesis de DNA (paso 3) por la fosforilación y el reclutamiento de los activadores de la MCM helicasa a los orígenes de replicación del DNA. (Adaptado de R. W. King y cols., 1996, *Science* 274:1652)

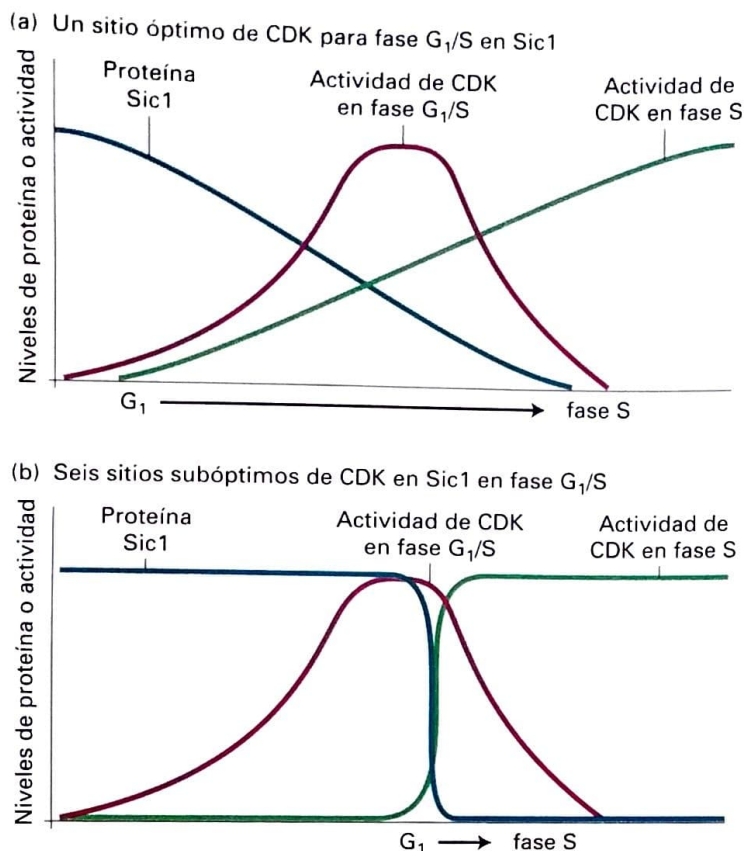


FIGURA 19-18 Seis sitios de fosforilación subóptima de las CDK en la fase G_1/S en Sic1 crean una entrada del tipo interruptor al ciclo celular. (a) Un único sitio óptimo de CDK en fase G_1/S en Sic1 resultaría en una transición lenta de fase G_1-S . A medida que las CDK de fase G_1/S se acumulen durante la G_1 , la Sic1 se degradaría en forma progresiva. Como resultado, se incrementarían lentamente las CDK de la fase S, la iniciación de la fase S sería un evento paulatino. (b) Seis sitios de fosforilación subóptima aseguran que la Sic1 está solo completamente fosforilada y así es reconocida por el SCF cuando las CDK de fase G_1/S han alcanzado niveles altos. Esto asegura también que la degradación de la Sic1 ocurra rápidamente y cuando las CDK de la fase G_1/S hayan completado todas sus otras tareas G_1 . (Adaptado de Nash y cols., 2001, *Nature*, 414:514-521; y D. O. Morgan, 2006)

La entrada a la fase S en las células de metazoarios está regulada de modo similar a lo que ocurre en una levadura en gemación. Al igual que Sic1, la CKI p27 evita la activación prematura de las CDK de fase S durante G_1 . Sin embargo, a diferencia de Sic1, esta CKI inhibe tanto las CDK de fase S como las de fase G_1/S y tiene funciones adicionales en el ciclo celular. Por ejemplo, a la vez que inhibe las CDK de fase G_1/S y fase S, p27 ayuda a ensamblar y así a activar las CDK de G_1 . De forma similar a la situación de las levaduras, sin embargo, p27 es retirada de los complejos ciclina-CDK por la degradación proteica dependiente de p27. Por estimulación con mitógenos, proteincinasas activadas por mitógenos fosforilan p27 y promueven su exportación desde el núcleo al citoplasma, donde se localiza una de las ligasas de la ubiquitina celular, la KPC. Una segunda vía, análoga a la que opera en Sic1, marca la p27 para su degradación en la transición de fase G_1-S . A medida que las CDK de fase G_1/S y de la fase S alcanzan altos niveles durante la G_1 tardía e inicios de la fase S, comienzan a fosforilar p27, marcando la CKI para ubiquitinación por la SCF. La degradación de

la p27 provoca la activación de las CDK de la fase G_1/S y de la fase S. Estas cinasas comienzan entonces la fase S fosforilando proteínas importantes para el inicio de la replicación del DNA.

La replicación en cada origen es iniciada una vez y solo una vez durante el ciclo celular

Como analizamos en el Capítulo 4, los cromosomas eucariontes se replican a partir de múltiples orígenes de replicación. El inicio de la replicación desde estos orígenes ocurre durante toda la fase S. Sin embargo, ningún origen se inicia más de una vez por cada fase S. Más aún, la fase S continúa hasta que la replicación a partir de múltiples orígenes a lo largo de la longitud de cada cromosoma da como resultado la replicación completa del cromosoma total. Estos dos factores aseguran que se mantenga el número correcto de copias de genes cuando la célula prolifera.

Las CDK de la fase S desempeñan un papel esencial para regular la replicación del DNA. Las cinasas inician la replicación del DNA solo en las transiciones de fase G_1/S y evitan la reiniciación a partir de orígenes que ya se han iniciado. Analizaremos primero de qué manera está controlado el inicio de la replicación del DNA y el papel de las CDK de la fase S en el proceso antes de pasar a los mecanismos por los cuales estas cinasas evitan la reiniciación.

Los mecanismos subyacentes al inicio de la replicación del DNA se comprenden mejor en las levaduras en gemación, de modo que enfocaremos nuestro análisis en estos organismos. Sin embargo, es importante notar que las proteínas y mecanismos que controlan la iniciación de la síntesis del DNA son básicamente los mismos en todas las especies eucariontes. Un complejo proteico conocido como el *complejo de reconocimiento del origen (CRO)* está asociado con todos los orígenes de replicación del DNA. En la levadura en gemación, los orígenes de replicación contienen una secuencia núcleo conservada de 11 pares de bases, a las cuales se une el CRO. En los organismos multicelulares, los orígenes de replicación del DNA carecen de una secuencia consenso reconocible. En lugar de ello, factores asociados a la cromatina dirigen los CRO al DNA. Los CRO y dos factores de iniciación de la replicación adicionales, el Cdc6 y el Cdt1, se asocian con el CRO en los orígenes durante G_1 para cargar las helicasas de replicación, conocidas como complejo de la helicasa MCM, sobre el DNA (Fig. 19-19, paso 1). Las helicasas MCM funcionan para desenrollar el DNA durante el inicio de la replicación del DNA.

Para asegurar que los orígenes se inician solo una vez al comienzo de la fase S, la carga del complejo de la helicasa MCM y su activación ocurren en estados de fosforilación opuestos. Las helicasas MCM solo pueden cargarse en un estado de DNA de baja actividad de CDK, que ocurre cuando las CDK están inactivadas durante la salida de la mitosis y durante la G_1 temprana. En otras palabras, las helicasas MCM se cargan sobre el DNA cuando están desfosforiladas. Por el contrario, la activación de las helicasas MCM y el reclutamiento de las polimerasas del DNA al origen del DNA desenrollado se desencadenan por las CDK de la fase S. Recuerde que las CDK de la fase S solamente se vuelven activas cuando los niveles de CDK de fase G_1/S alcanzan su máximo y las CDK de la fase S se destruyen. Entonces, la desfosforilación de las CDK de la fase S y una segunda proteincinasa heterodimérica, la DDK, activan la helicasa MCM y reclutan las polimerasas a los sitios de inicio de la replicación (Fig. 19-19, pasos 2 y 3).

Entonces, ¿de qué manera las CDK y la DDK de la fase S colaboran para iniciar la replicación del DNA? El CRO y los otros dos factores

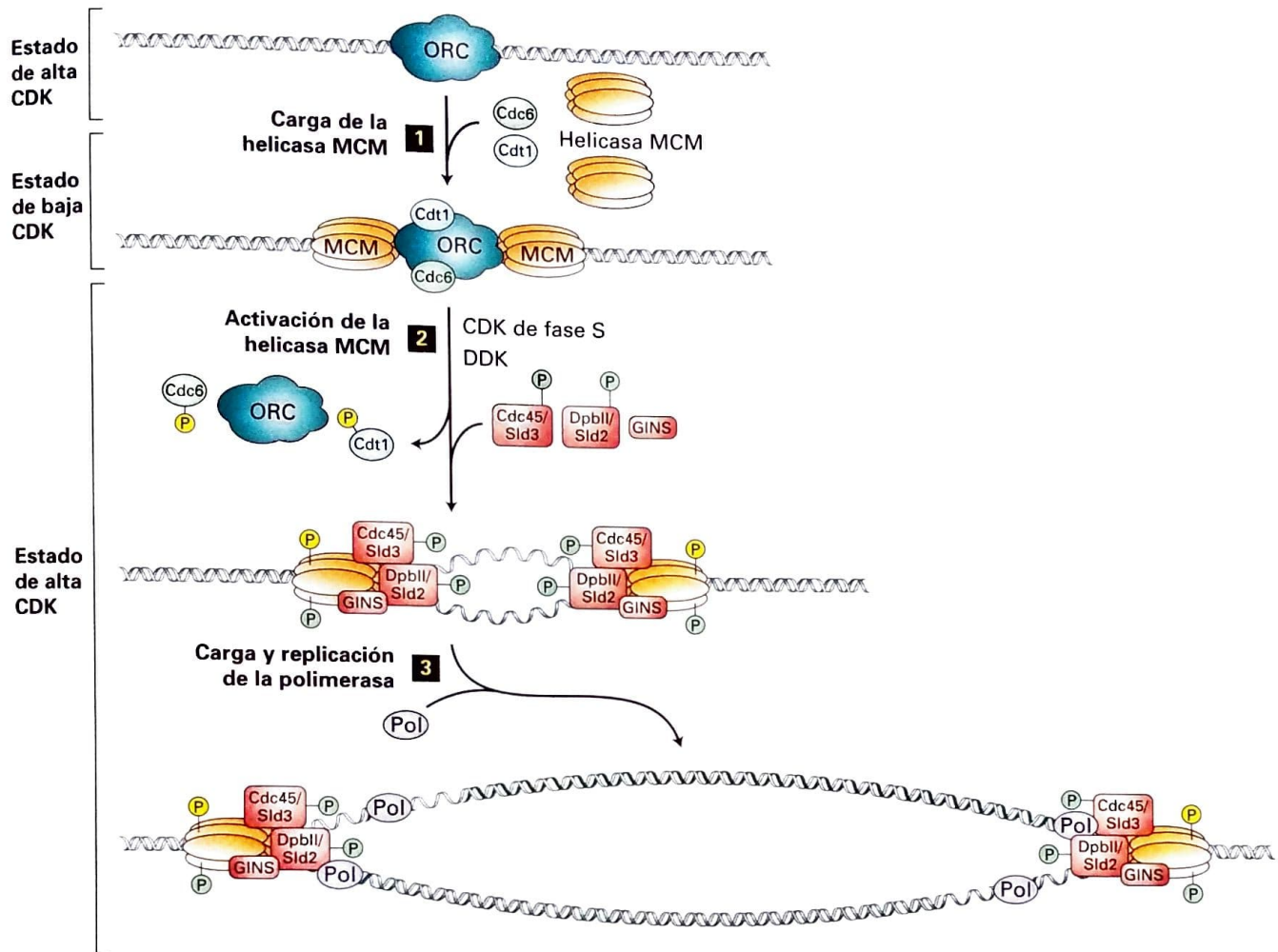


FIGURA 19-19 Los mecanismos moleculares que gobiernan el inicio de la replicación del DNA. Paso **1**: durante la salida de la mitosis y la G_1 temprana, cuando la actividad de la CDK es baja, los factores de carga del MCM, ORC, Cdc6 y Cdt1 cargan la helicasa replicativa, el complejo de MCM, al origen del DNA. Paso **2**: la activación de las CDK de la fase S y de la DDK marcan el inicio de esta fase. Fosforilan la helicasa MCM, Sld2 y Sld3 (dibujadas como eventos de fosforilación verde) para facilitar la carga de los activadores de la helicasa MCM –los complejos Cdc45-Sld3 y GINS– sobre los sitios de iniciación de la replicación. Esto lleva a que las helicasas MCM

desenrollen el DNA. Las CDK de la fase S también evitan que se vuelvan a cargar las helicasas MCM por refosforilación de los componentes pre-RC, Cdc6 y Cdt1 (que se muestran como eventos de fosforilación en amarillo) y promueven su liberación de los orígenes y la degradación por el SCF. Las CDK de la fase S también fosforilan las helicasas MCM, lo cual conduce a su exportación desde el núcleo cuando las helicasas se desenganchan del DNA cuando se ha completado la replicación. Paso **3**: las DNA polimerasas son reclutadas a los orígenes, lo cual conduce a la iniciación de la síntesis del DNA (véase la Fig. 4-31).

de iniciación, el Cdc6 y el Cdt1, reclutan las helicasas MCM a sitios de iniciación de la replicación durante G_1 , cuando la actividad de CDK es baja (véase la Fig. 19-19, paso **1**). Cuando la DDK y las CDK de fase S se reactivan en la G_1 tardía, la DDK fosforila dos subunidades de la helicasa MCM. Las CDK de la fase S fosforilan dos proteínas llamadas Sld2 y Sld3. Estos eventos de fosforilación tienen un efecto activador, y promueven así el reclutamiento de activadores de la helicasa MCM a sitios de iniciación de la replicación (los eventos de fosforilación que se muestran en verde en la Fig. 19-19, pasos **2** y **3**). Los activadores de la helicasa se llaman complejo Cdc45-Sld3 y complejo GINS. No está claro aún el modo exacto en que promueven la activación de las helicasas MCM. Además de activar la helicasa MCM para desenrollar el DNA, el complejo Cdc45-Sld3 y el complejo GINS reclutan polimerasas al DNA, la polimerasa ϵ para sintetizar la hebra conductora y la polimerasa δ para sintetizar la hebra retardada (véase la Fig. 19-19, paso **3**). La maquinaria de replicación inicia entonces la síntesis del DNA.

Las CDK de fase S no solo son esenciales para iniciar la replicación del DNA, sino que también son responsables de asegurar que cada origen se inicie solo una vez durante la fase S. La evitación del reinicio de los orígenes durante la fase S se lleva a cabo mediante la fosforilación de varios componentes de la maquinaria de carga de la helicasa MCM y de la propia helicasa MCM. Para distinguir estos eventos de fosforilación de aquellos requeridos para el inicio de la replicación del DNA, se los indica en amarillo en la Fig. 19-19. Concomitante con la activación de la helicasa MCM, el Cdc6 y Cdt1 se disocian de los sitios de inicio de la replicación. Una vez que se disocian, su fosforilación conduce a su degradación por la ligasa de ubiquitina SCF. La fosforilación de la helicasa MCM conduce a la exportación de estas proteínas desde el núcleo después de que se disocian del DNA, al haber completado replicación del DNA. Así, sólo después de que la actividad de CDK ha descendido por CPA/C-Cdh1 durante la salida de la mitosis, las helicasas MCM pueden ser recargadas sobre el DNA. Como resultado de ello, la carga

de la helicasa está restringida a las etapas tardías de la mitosis y a la G_1 temprana (véase la Fig. 19-19, paso 1).

Los mecanismos generales que gobiernan el inicio de la replicación del DNA en células de metazoos son paralelos a aquellos que ocurren en *S. cerevisiae*, aunque aparecen muchas diferencias en los vertebrados. La fosforilación de los activadores de la helicasa MCM por las CDK de fase G_1/S y las CDK de fase S probablemente promueve su reclutamiento a sitios de iniciación de la replicación del DNA. Como ocurre en las levaduras, la fosforilación de los factores de carga de MCM posiblemente evita la nueva carga de helicasas de MCM hasta que la célula atraviesa la mitosis, lo que asegura que la replicación a partir de cada origen ocurra solo una vez durante cada ciclo celular. En los metazoos, una segunda proteína pequeña, la geminina, contribuye a inhibir la reiniciación en los orígenes hasta que las células completan un ciclo celular entero. La geminina se expresa en la G_1 tardía; se une a los factores de carga de la helicasa MCM y la inhibe a medida que se liberan desde los orígenes, una vez que se ha iniciado la replicación del DNA, durante la fase S (véase la Fig. 19-19, paso 2), lo cual contribuye a inhibir la reiniciación en un origen. La geminina contiene una caja de destrucción en su N-terminal que es reconocida por el CPA/C-Cdh1, y esto provoca que se ubiquitine en la anafase tardía y sea degradado por proteasomas. Esto libera los factores de carga de la helicasa MCM, que también se desfosforilan a medida que declina la actividad de las CDK, para unirse a un CRO sobre los orígenes de replicación y cargar helicasas MCM durante la siguiente fase G_1 .

Las hebras de DNA duplicadas se unen durante la replicación

Durante la fase S, a medida que los cromosomas se duplican para formar cromátidas hermanas, se unen entre sí mediante vínculos proteicos. Las uniones entre las cromátidas hermanas establecidas durante la fase S serán esenciales para su segregación precisa durante la mitosis.

Los complejos proteicos que establecen cohesión entre las cromátidas hermanas se llaman **cohesinas**. El complejo de las cohesinas está compuesto por cuatro subunidades: Smc1 (en ocasiones llamado también *Rad21*), Smc3, Scc1 y Scc3. Smc1 y Smc3 son miembros de la familia de proteínas SMC, caracterizadas por dominios largos de espirales enrolladas, flanqueados por un dominio globular con actividad de ATPasa. El dominio de ATPasa interactúa con Scc1 y Scc3, y juntos forman una estructura anular. El mecanismo estructural por el cual las cohesinas vinculan a las cromátidas hermanas no se comprende, pero es probable que los anillos de cohesina abracen una o ambas copias del DNA replicado. Sin embargo, está claro que las cohesinas son esenciales para mantener las moléculas de DNA replicadas juntas. Cuando extractos de huevos de *Xenopus* fueron vaciados de cohesinas por tratamiento con anticuerpos específicos para las proteínas SMC cohesina, los extractos carentes de ellas fueron capaces de replicar el DNA en los núcleos de los espermatozoides añadidos, pero las cromátidas hermanas resultantes no se asociaron adecuadamente entre sí.

Algunos detalles del modo en que las cohesinas son cargadas sobre el DNA para mediar la cohesión de las cromátidas hermanas están siendo revelados. Sabemos que el establecimiento de la cohesión entre las cromátidas hermanas está fuertemente vinculado a la replicación del DNA. Las cohesinas se asocian con los cromosomas durante G_1 (Fig. 19-20, paso 1). Durante la replicación del DNA, son cargadas sobre los cromosomas, de modo tal que pueden mantener a las cromátidas hermanas juntas. Muy probablemente esto ocurre a medida que las horquillas de replicación duplican el DNA (Fig. 19-20, paso 2). Para convertir el DNA-cohesinas G_1

unidas a complejos cohesivos, se requieren varios factores de carga de las cohesinas (incluyendo un complejo proteico relacionado con proteínas que cargan la pinza deslizante en la horquilla de replicación) y la acetilación de la subunidad Smc3. Como veremos en la Sección 19.6, las cohesinas son esenciales para unir con precisión las cromátidas hermanas replicadas al huso mitótico y para su segregación durante la mitosis.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 19.4

Compromiso con el ciclo celular y replicación del DNA

- START define una etapa de G_1 después de la cual las células están irreversiblemente condicionadas al ciclo celular. Desde el punto de vista molecular, se define como el punto en que la actividad de CDK de la fase G_1/S alcanza niveles suficientes para iniciar la fase S.
- Los eventos moleculares que promueven la entrada al ciclo celular se conservan a través de las especies. Las CDK de G_1 inhiben un inhibidor de la transcripción. Esto permite la transcripción de las ciclinas de fase G_1/S y otros genes importantes para la fase S.
- Las señales extracelulares como el estado nutricional (en las levaduras) y la presencia de mitógenos y antimitógenos (en los vertebrados) regulan la entrada al ciclo celular.
- Varios factores de crecimiento de los polipéptidos llamados mitógenos estimulan a las células de mamífero en cultivo a proliferar, al inducir la expresión de genes de respuesta temprana. Muchos de ellos codifican factores de transcripción que estimulan la expresión de genes de respuesta retardada que codifican para ciclinas de fase G_1/S y factores de transcripción E2F.
- Las CDK de fase G_1/S fosforilan e inhiben Cdh1, el factor de especificidad que dirige el complejo que promueve la anafase (CPA/C) para ubiquitinar las ciclinas de fase S y M. Esto permite que las ciclinas de la fase S se acumulen en la G_1 tardía.
- En las levaduras, las CDK de fase S inicialmente son inhibidas por la Sic1. La fosforilación marca la Sic1 para la ubiquitinación por la SCF ubiquitina-proteínligasa y para la degradación proteasómica al liberar las CDK de la fase S activada que desencadenan el inicio de la fase S (véase la Fig. 19-17).
- La replicación del DNA se inicia por los sitios de carga de la helicasa conocidos como orígenes de replicación.
- La carga y la activación de la MCM helicasa ocurren en estados del ciclo celular mutuamente excluyentes: la carga de la MCM helicasa puede ocurrir solo cuando la actividad de las CDK es baja (durante la G_1 temprana); las MCM helicasas se activan cuando la actividad de las CDK es alta.
- Las CDK de fase S y las DDK desencadenan el inicio de la replicación del DNA por el reclutamiento de activadores de la MCM helicasa a los orígenes (véase la Fig. 19-19).
- El inicio de la replicación del DNA ocurre en cada origen solo una vez durante el ciclo celular. Esto se logra porque las CDK de la fase S activan las helicasas y, al mismo tiempo, evitan que las helicasas adicionales se carguen sobre el DNA.

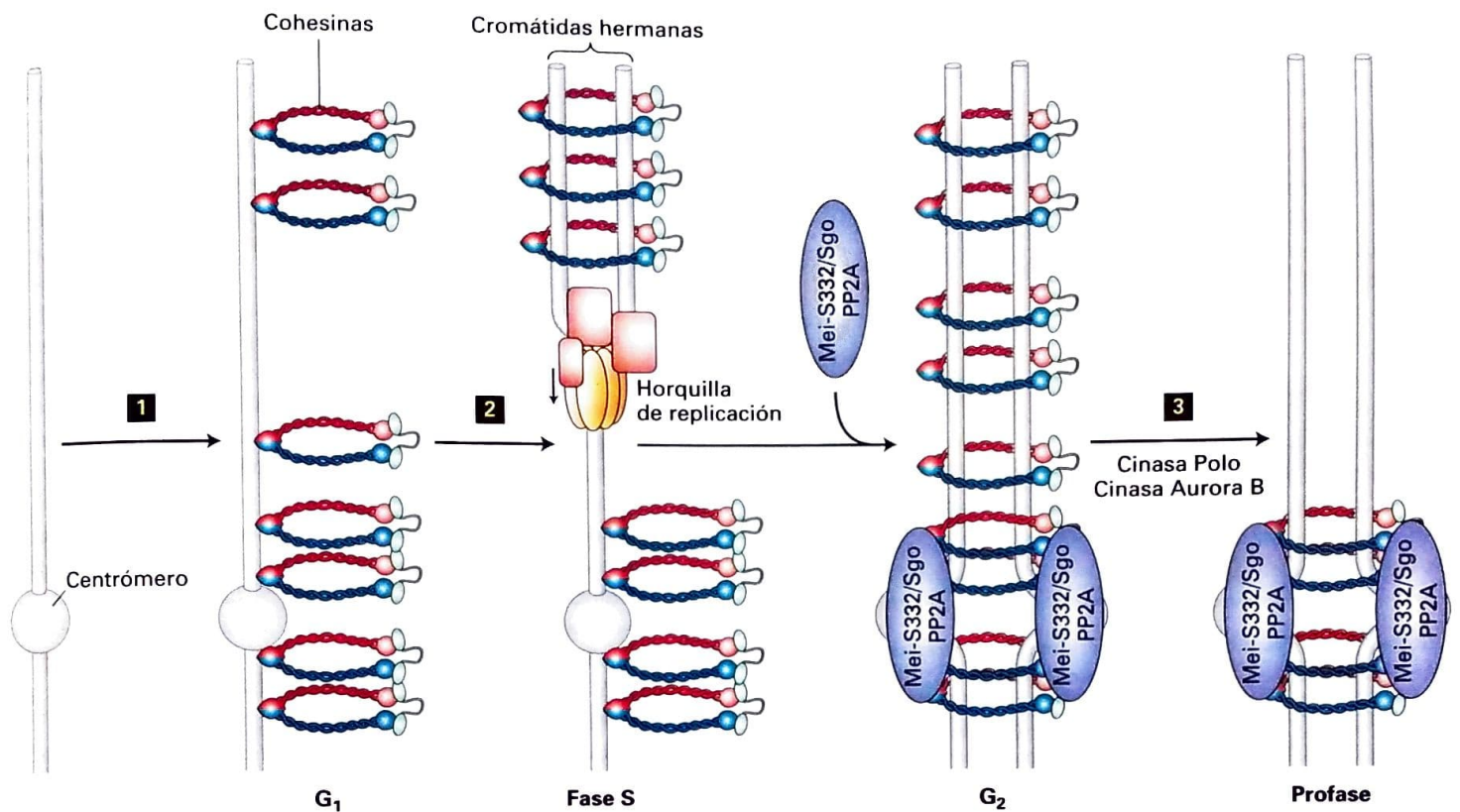


FIGURA 19-20 Modelo para establecer la unión mediante cohesinas de las cromátidas hermanas. Hay fuerte evidencia de que el complejo de cohesinas es circular, pero no se sabe si un único anillo de cohesinas vincula las cromátidas hermanas o si dos anillos, uno de cada una alrededor de las cromátidas hermanas separadas, están vinculados entre sí para vincularlas en una cadena. Por simplicidad, aquí se muestra un solo anillo. Paso 1: las cohesinas son cargadas sobre los cromosomas durante G_1 , pero no poseen propiedades cohesivas (indicadas como las cohesinas lateralmente asociadas con los cromosomas). Paso 2: concomitante con la replicación del DNA, y muy probablemente muy cercana a la horquilla de replicación, las cohesinas se convierten en moléculas cohesivas, capaces de mantener juntas a las

cromátidas hermanas (indicadas como anillos de cohesinas que rodean a las cromátidas hermanas replicadas). Esta conversión a cohesinas cohesivas requiere factores de carga de las cohesinas. Durante G_2 , las cromátidas hermanas se replican y se vinculan a lo largo de toda la longitud mediante cohesinas. Durante este momento, las proteínas Meis-S332/Sgo reclutan a la proteína fosfatasa 2A (PP2A) a las regiones centroméricas. Paso 3: en las células de los vertebrados, las cohesinas se liberan de los brazos de los cromosomas durante la profase y la metafase temprana por acción de la cinasa Polo y la cinasa Aurora B. Hacia el final de la metafase, las cohesinas quedan retenidas solo en la región del centrómero, donde la PP2A evita la fosforilación de la cohesina y, así, la disociación a través del reclutamiento de la PP2A.

- Las cohesinas establecen vinculaciones entre las moléculas de DNA replicadas. Este mecanismo de unión está acoplado a la replicación del DNA.

19.5 Entrada en mitosis

Una vez que se ha completado la fase S y que el genoma completo se ha duplicado, los pares de cromosomas con DNA duplicado —las cromátidas hermanas— se segregan a las futuras células hijas. Este proceso requiere no solo de la formación del aparato que facilita esta segregación —el huso mitótico—, sino esencialmente un remodelamiento completo de la célula. Los cromosomas se condensan y se unen al huso mitótico, la envoltura nuclear se desensambla y casi todos los orgánulos se reconstruyen o se modifican. Todos estos eventos son desencadenados por las CDK de la mitosis. En esta sección, primero se analizará el modo en que las CDK se activan precipitadamente después de completarse la replicación del DNA durante G_2 . Luego veremos de qué manera estas

proteincinasas llevan a cabo los notables cambios en las células, necesarios para facilitar la segregación de las cromátidas hermanas durante la anafase centrándose en los eventos, como ocurren en los metazoos.

La activación precipitada de las CDK mitóticas inicia la mitosis

Las CDK mitóticas inician la mitosis. Mientras que los niveles de la subunidad CDK catalítica son constantes durante todo el ciclo celular, las ciclinas mitóticas gradualmente se acumulan durante la fase S. La mayoría de los eucariontes contienen múltiples ciclinas mitóticas que, por razones históricas, son llamadas ciclina A y ciclina B. A medida que se ensamblan, los complejos CDK mitóticos se mantienen en estado inactivo a través de la fosforilación inhibitoria de la subunidad CDK. Recuerde de la Sección 19.3 que dos tirosinas y treoninas muy conservadas de las CDK de los mamíferos se someten a la fosforilación regulada. En la CDK1, la CDK mitótica, la fosforilación de la tirosina 15 y la treonina 14 mantienen los complejos ciclina-CDK mitóticos en un estado inactivado. El estado de fosforilación de T14 y Y15 está con-

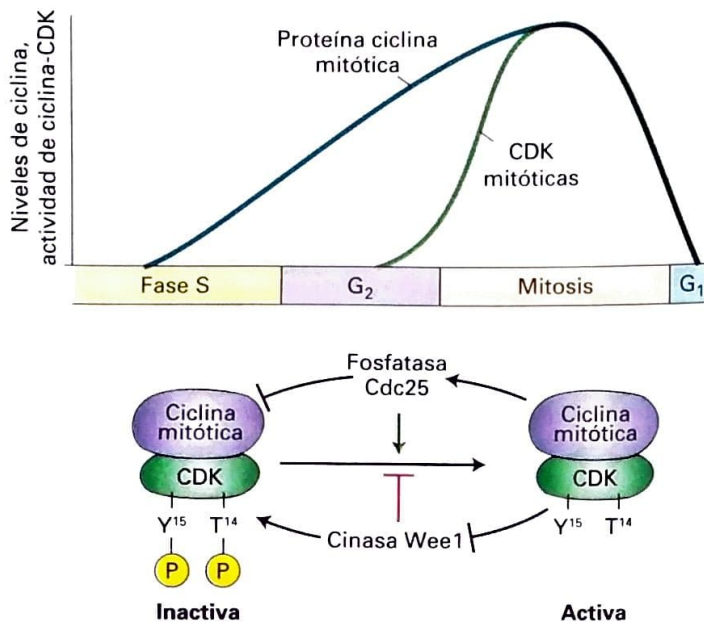


FIGURA 19-21 La fosforilación de la subunidad CDK restringe la actividad CDK mitótica durante las fases S y G₂. Las ciclinas mitóticas se sintetizan durante las fases S y G₂ y se unen a CDK1. Sin embargo, el complejo ciclina-CDK no es activo, porque la treonina 14 y la tirosina 15 de la subunidad CDK1 son fosforiladas por la proteincinasa Wee1. Una vez que se ha completado la replicación del DNA, la proteínofosfatasa Cdc25 se activa y la fosfatasa desfosforila la CDK1. Las CDK mitóticas activas estimulan adicionalmente a la Cdc25. Al mismo tiempo, las CDK mitóticas inhiben a la Wee1, la proteincinasa que ubica la fosforilación inhibitoria sobre la subunidad CDK. La replicación en curso del DNA inhibe la actividad de Cdc25. Aún no se comprende integralmente de qué manera la Cdc25 se activa en un inicio al completarse la replicación del DNA para poner en movimiento estos bucles de retroalimentación.

trolado por una proteincinasa de especificidad doble conocida como **Wee1** y una fosfatasa de especificidad dual, la **Cdc25** (Fig. 19-21). La regulación de las CDK mitóticas por estas actividades subyace la activación abrupta de su actividad de cinasa en la transición de la fase G₂-M y explica la observación de que, aunque las ciclinas mitóticas se acumulen gradualmente durante la fase S y la G₂, las CDK mitóticas no se activan hasta que las células entren en mitosis.

Los estudios hechos en la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* desentrañaron los mecanismos que conducen a la activación precipitada de las CDK mitóticas durante G₂. La proteincinasa Wee1 de especificidad doble fosforila las CDK de la tirosina inhibitoria 15. (La treonina 14 no se fosforila en la CDK 1 de *S. pombe*). Las levaduras con un gen *wee1*⁺ defectuoso activan las CDK mitóticas prematuramente y así experimentan un ingreso prematuro a la mitosis. Las mutantes de Wee1 no solo entran en mitosis prematuramente, sino que también son más pequeñas. Esto ocurre porque, a diferencia de lo que sucede en la mayoría de los otros eucariontes, que coordinan el tamaño y la división celular durante G₁, en las levaduras en fisión esta coordinación ocurre en G₂. Las levaduras en fisión que llevan un gen mutante para CDK1, en el cual el residuo de tirosina 15 es reemplazado por fenilalanina (la cual tiene estructura similar a la tirosina pero no puede ser fosforilada), muestran la misma activación mitótica prematura de CDK e ingreso en mitosis. La fosfatasa que se opone a la Wee1 es la Cdc25. Las levaduras en fisión que llevan mutaciones en el gen *cdc25*⁺ se detienen en G₂, lo que indica que la fosfatasa es esencial para la entrada en mitosis.

Los vertebrados contienen múltiples proteincinasas Wee1 y múltiples **fosfatasas Cdc25**, que colaboran para controlar no solo la actividad mitótica de CDK, sino también la actividad de CDK de la fase G₁/S. Un miembro de la familia Cdc25 de fosfatasas, la Cdc25A, se activa en la G₁ tardía. Elimina la fosforilación inhibitoria sobre la tirosina 15 de las CDK de la fase G₁/S y la subunidad catalítica de las CDK de la fase S para activar las cinasas. Otro miembro de la familia, la Cdc25C, es activa durante G₂ y elimina la fosforilación inhibitoria en las CDK mitóticas.

La activación de las CDK mitóticas es la consecuencia de la inactivación rápida de la Wee1 y la activación de la Cdc25. Resultan centrales para esta rápida transición los bucles de retroalimentación, en los que las CDK mitóticas activan a las Cdc25 e inactivan a la Wee1 (véase la Fig. 19-21). La fosforilación de la Cdc25 por las CDK mitóticas estimula su actividad de fosfatasa; la fosforilación de la Wee1 por las CDK mitóticas inhibe su actividad de cinasa. La replicación del DNA en curso inhibe la actividad de la Cdc25. Un tema crítico del cual sabemos poco es de qué manera este bucle de retroalimentación positiva se inicia una vez que se ha completado la replicación del DNA. Se ha sugerido que las CDK que funcionan tempranamente en el ciclo celular son las que inician el bucle de retroalimentación positiva.

Aunque no se sabe aún de qué manera se inicia la activación precipitada de las CDK mitóticas, queda claro que una vez que se activan, estas cinasas proteicas ponen en movimiento todos los eventos necesarios para aprestar a la célula para la segregación cromosómica. La activación de las CDK mitóticas está asociada con cambios en la localización celular de estas cinasas. En un inicio, las CDK mitóticas se asocian con los centrosomas, donde se piensa que facilitan la maduración de estos. Entonces, ingresan en el núcleo, donde llevan a cabo la condensación cromosómica y la ruptura de la envoltura nuclear. En la información que sigue, analizaremos de qué manera las CDK mitóticas llevan a cabo la ejecución coordinada de la mitosis.

Durante el inicio de la replicación del DNA, las CDK de fase S operan en conjunto con las DDK para promover la activación de la helicasa MCM. Como ocurre con el inicio de la replicación de DNA, las CDK colaboran con otras proteincinasas para llevar a cabo los eventos mitóticos. La familia de las **cinasas Polo** es crítica para la formación del huso mitótico, así como para la segregación de los cromosomas. La familia de las **cinasas Aurora** desempeña papeles centrales en la formación del huso mitótico y asegura que los cromosomas se unan a este de modo correcto, de forma tal que se segregan con precisión durante la mitosis. Su contribución a los distintos eventos de la mitosis también será analizada.

Las CDK mitóticas promueven la ruptura de la envoltura nuclear

Durante la interfase, los cromosomas están rodeados por la envoltura nuclear. Los centrosomas que forman el huso mitótico están localizados en el citoplasma. Para que los cromosomas interactúen con los microtúbulos nucleados por los centrosomas, la envoltura nuclear debe desmantelarse.

La envoltura nuclear es una extensión de doble membrana del retículo endoplasmático que contiene muchos complejos del poro nuclear (véanse las Figs. 9-32 y 13-33). La bicapa lipídica de la membrana nuclear interna está asociada con la **lámina nuclear**, una red de filamentos de lamina adyacente a la cara interna de la envoltura nuclear (Fig. 19-22a). Las tres **laminas** nucleares (A, B y C) presentes en las células de

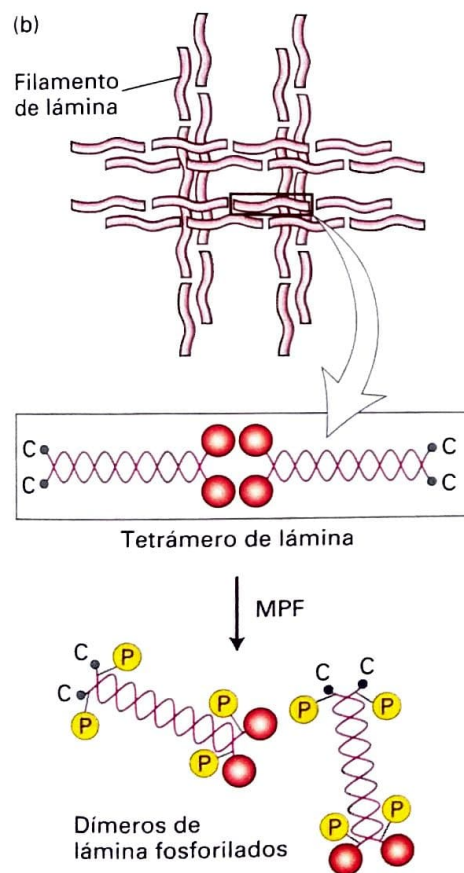
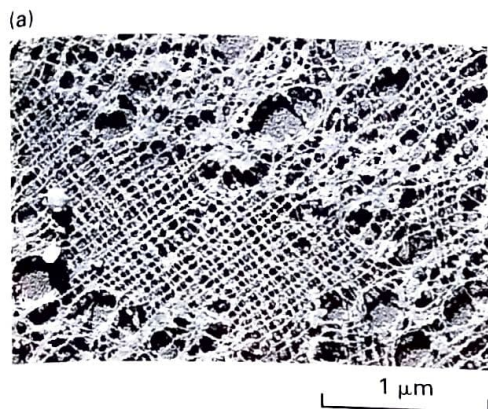


FIGURA 19-22 La lámina nuclear y su regulación por la fosforilación.
 (a) Fotomicrografía electrónica de la lámina nuclear de un ovocito de *Xenopus*. Nótese la red tipo malla regular de los filamentos intermedios de lámina. La estructura se encuentra adyacente a la membrana nuclear interna (véase la Fig. 18-46). (b) Diagramas esquemáticos de la estructura de la lámina nuclear. Dos conjuntos perpendiculares de filamentos de 10 nm de diámetro contruidos con láminas A, B y C a partir de la lámina nuclear (arriba). Los filamentos de lámina individuales están formados por la polimerización de extremo a extremo de tetrámeros de lámina, que consisten en dos dímeros de espirales enrolladas de lámina (centro). Los círculos rojo y azul representan los dominios globulares N-terminal y C-terminal, respectivamente. La fosforilación de residuos específicos de serina cerca de los extremos de la sección central con forma de bastón de los dímeros de lámina provoca la despolimerización de los tetrámeros (abajo). Como resultado, la lámina nuclear se desintegra. [Parte (a) tomada de U. Aebi y cols., 1986, *Nature* 323:560; cortesía de U. Aebi; parte (b) adaptada de A. Murray y T. Hunt, 1993, *The Cell Cycle: An Introduction*, W. H. Freeman y compañía.]

los vertebrados pertenecen a una clase de proteínas del citoesqueleto, los filamentos intermedios, que son críticos para dar sostén a las membranas celulares. Las laminas A y C, codificadas por la misma unidad de transcripción y producidas por corte y empalme alternativo de un pre-mRNA único, son idénticas, excepto por una región de 133 residuos en la región C-terminal de la lamina A, que está ausente en la lamina C. La lamina B, codificada por una unidad de transcripción distinta, está modificada postraduccionalmente por la adición de un grupo isoprenilo hidrofóbico, cerca de su región carboxi-terminal. Este ácido graso queda inserto en la membrana nuclear interna, y de este modo ancla la lamina nuclear a la membrana (véase la Fig. 10-19). Las tres laminas nucleares integran dímeros que contienen una sección central con forma de espiral enrollada helicoidal α con forma de bastón y una cabeza globular y un dominio de cola; la polimerización de estos dímeros a través de asociaciones cabeza-cabeza y cabeza-cola genera los filamentos intermedios que componen la lámina nuclear (Fig. 19-22b).

Una vez que se activan las CDK mitóticas al final de G_2 , fosforilan residuos de serina específicos de las tres laminas nucleares. Esto provoca la despolimerización de los filamentos intermedios de lamina (véase la Fig. 19-22b). Los dímeros de lamina A y C fosforilados son liberados a la solución, mientras que los dímeros de lamina B fosforilados permanecen asociados con la membrana nuclear, a través del ancla de isoprenilo. La despolimerización de las laminas nucleares lleva a la desintegración de la red de lamina nuclear y contribuye al desensamblaje de la envoltura nuclear.

Las CDK mitóticas afectan también otros componentes de la envoltura nuclear (Fig. 19-23). Las CDK fosforilan **nucleoporinas** específicas, que hacen que los complejos del poro nuclear se disocien a subcomplejos durante la profase. La fosforilación de proteínas integrales de la membrana interna del núcleo ocurre a través de la disminución de su afinidad por la cromatina y contribuye adicionalmente al desensamblaje de la envoltura nuclear. El debilitamiento de las asociaciones entre las proteínas de la membrana nuclear interna y la lámina nuclear y la cromatina permite que las hojas de la membrana nuclear interna se retraigan al retículo endoplasmático, que se continúa con la membrana nuclear externa.

Las CDK mitóticas promueven la formación del huso mitótico

Una función clave de las CDK mitóticas es inducir la formación del huso mitótico, conocido también como aparato mitótico. Como vimos en el Capítulo 18, el huso mitótico está constituido por microtúbulos que se unen a los cromosomas a través de estructuras proteicas especializadas, asociadas con los cromosomas, denominadas **cinetocoros**. En la mayoría de los organismos, el huso mitótico es organizado por los **centrosomas**, en ocasiones llamados **cuerpos polares del huso**. Contienen una tubulina especializada, la tubulina γ , la cual, junto con las proteínas asociadas, nuclea a los microtúbulos. Las plantas superiores y los ovocitos de los metazoos constituyen excepciones notables a los mecanismos de ensamblaje del huso basados en los centrosomas. En estas células, los extremos (–) de los microtúbulos están entrecruzados y estos se autoensamblan en un huso.

La función del huso mitótico es segregar los cromosomas, de modo tal que las cromátidas hermanas se separen entre sí y se muevan a los polos opuestos del huso mitótico (véase la Fig. 18-37). Para lograr esto, los cromosomas deben unirse al huso mitótico, de manera que un cinetocoro de cada par de cromátidas hermanas se una a los microtúbulos

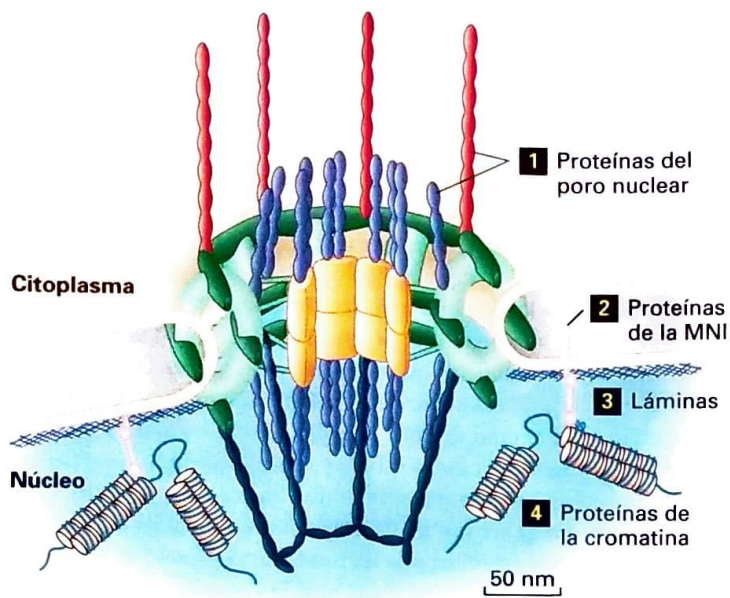


FIGURA 19-23 Las proteínas de la envoltura nuclear son fosforiladas por las CDK mitóticas. Paso 1: los componentes del complejo del poro nuclear (CPN) son fosforilados por las CDK mitóticas en la profase, lo que ocasiona que los CPN se disocien en subcomplejos CPN asociados a la membrana solubles. Paso 2: la fosforilación de las CDK mitóticas de las proteínas de la membrana nuclear interna (MNI) inhibe sus interacciones con la lámina nuclear y la cromatina. Paso 3: la fosforilación de las CDK mitóticas de las láminas nucleares provoca su despolimerización y la disolución de la lámina nuclear. Paso 4: la fosforilación de las CDK mitóticas de las proteínas de la cromatina induce la condensación de la cromatina e inhibe las interacciones entre la cromatina y la envoltura nuclear. (Adaptado de B. Burke y J. Ellenberg, 2002, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:487)

que surgen de polos opuestos. Luego, se dice que las cromátidas hermanas están **biorientadas**. A partir de ahora, analizaremos de qué manera se forma el huso mitótico, de qué modo se unen a él los cromosomas y cómo las células corrigen las uniones defectuosas.

Durante G_1 , las células contienen un único centrosoma que funciona como el centro nucleador de microtúbulos principal de la cé-

lula. La formación del huso mitótico se inicia en la transición entre la fase G_1 y la fase S, con la duplicación de los centrosomas. El mecanismo por el cual ocurre esta duplicación no es bien comprendido, pero en el corazón de este proceso se encuentra la duplicación del par de **centríolos**, microtúbulos cortos, dispuestos ortogonalmente entre sí. Como se analizó en el Capítulo 18, las células en G_1 contienen un único par de centriolos. Simultáneamente con la entrada a la fase S, se desencadena la separación de los dos centriolos por las CDK de fase G_1/S , y cada uno de estos comienza a generar un centriolo hijo (véase la Fig. 18-35). Durante la fase S, los nuevos centriolos crecen y maduran, cada par de centriolos comienza a ensamblar material centrosómico y, hacia G_2 , se han formado ambos centrosomas. Varias proteincinasas adicionales se han identificado como responsables del control de la duplicación de los centrosomas. Entre ellas, resulta central un miembro de la familia de las cinasas Polo conservadas, la Plk4. De qué modo las CDK de fase G_1/S y la Plk4 promueven la duplicación de los centrosomas aún no se comprende, pero se piensa que involucra la fosforilación de múltiples componentes de los centrosomas, lo cual facilita su duplicación y su crecimiento. Como veremos, las cinasas Polo no solo desempeñan un papel central en la duplicación de los centrosomas, sino que también participan en esencialmente todos los aspectos de la mitosis.

El paso clave de iniciación de la formación del huso mitótico es el corte de los lazos que vinculan a los centrosomas duplicados. Esta **disyunción de los centrosomas** ocurre en G_2 y es desencadenada por las CDK mitóticas (véase la Fig. 18-35). Tan pronto como ha ocurrido esta separación, los microtúbulos se han nucleado a partir de ambos centrosomas y se separan uno de otro, traccionados por la proteína motora dineína. Las particularidades de la formación de los arreglos microtubulares y el ensamblaje del huso mitótico se analizaron en el Capítulo 18. Aquí consideraremos brevemente el modo en que los cromosomas se unen al huso mitótico y de qué manera se corrigen los errores de este proceso.

Para que los cromosomas se segreguen con precisión durante la mitosis, el par de cromátidas hermanas debe permanecer biorientado establemente sobre el huso mitótico (Fig. 19-24). ¿Cómo se logra esto? Una vez que los centrosomas se han separado uno del otro, los microtúbulos, en un mecanismo de búsqueda y captura, comienzan a interactuar con los cinetocoros de los pares de cromátidas hermanas. Inicialmente, los cromosomas se deslizan a lo largo de la longitud de los microtúbulos, impulsados por proteínas motoras. Cuando el cromosoma llega al final

VIDEO: División celular normal en la embriogénesis de *C. elegans*

FIGURA 19-24 Unión del cromosoma al huso mitótico. Los cromosomas se unen al huso mitótico y se congregan en el centro del huso. Luego, se unen mediante sus cinetocoros a los extremos de los microtúbulos (llamados uniones al extremo) y estas uniones son estabilizadas por microtúbulos adicionales. Se muestra la unión final a los cromosomas, donde el cromosoma se ha biorientado de modo estable sobre el huso mitótico.

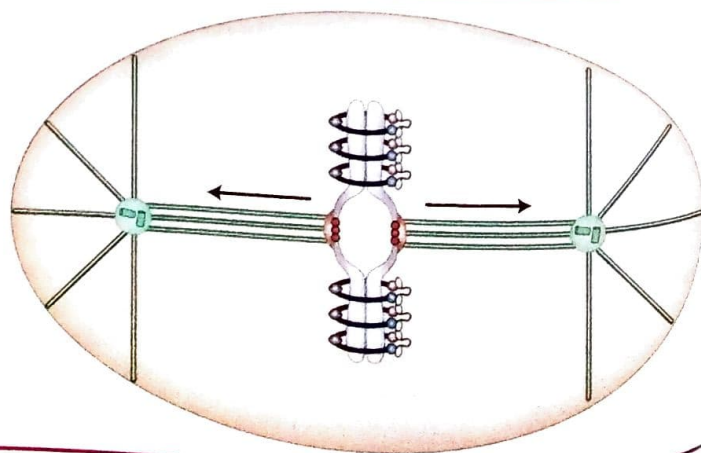
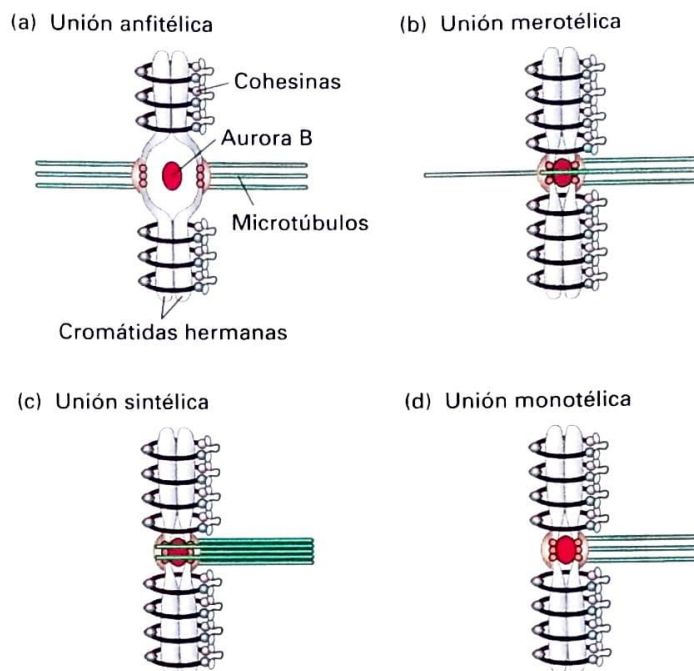


FIGURA 19-25 Uniones estables e inestables de los cromosomas.

Cuando los cinetocoros hermanos se unen a los microtúbulos que emanan de polos opuestos del huso, están establemente unidos. Esta configuración se llama **unión anfitélica**. (a) Los microtúbulos (verde) traccionan los cinetocoros (pardo); las cohesinas resisten esta fuerza de tracción. Esto lleva a que los cinetocoros sean traccionados desde la proteincinasa Aurora B (zona roja), que se localiza en el espacio interno entre los cinetocoros hermanos. Como resultado, la Aurora B ya no puede fosforilar los factores de unión al microtúbulo en el cinetocoro y las uniones cinetocoro-microtúbulo son estables. Cuando un cinetocoro se une a microtúbulos que emanan de dos polos opuestos del huso (**unión merotética**, b) o ambos cinetocoros hermanos se unen a microtúbulos que emanan del mismo polo del huso (**unión sintética**, c) o uno de los cinetocoros hermanos se une a los microtúbulos (**unión monotética**, d), los cinetocoros no son traccionados por la zona Aurora B. Como resultado, la Aurora B fosforila las subunidades de unión del cinetocoro y las uniones al microtúbulo se desestabilizan.



de un microtúbulo, los cinetocoros se unen a los microtúbulos en una unión del extremo, en cuya configuración final los cromosomas se encuentran vinculados al huso mitótico. Los cinetocoros de las cromátidas hermanas se unen entonces a los microtúbulos que emanan del polo opuesto del huso. En el extremo, se dice que el par de cromátidas hermanas está establemente biorientado sobre el huso mitótico.

El objetivo final de la unión de los cromosomas al huso mitótico es que todos y cada uno de los cromosomas se encuentre unido a este de modo biorientado (también conocido como **unión anfitélica**; Fig. 19-25a). ¿De qué manera la célula “sabe” que esto ha ocurrido? El análisis microscópico de la unión de los cromosomas ha mostrado que, al inicio, muchos cromosomas se unen a los microtúbulos de manera defectuosa. Un cinetocoro puede unirse a los microtúbulos que emanan de ambos polos, una situación llamada **unión merotética** (Fig. 19-25b). Los cinetocoros de un par de cromátidas hermanas pueden unirse a microtúbulos del mismo polo (**unión sintética**; Fig. 19-25c) o tan solo un cinetocoro puede unirse a los microtúbulos (**unión monotética**; Fig. 19-25d). Claramente, ninguna de estas uniones es productiva en el sentido de que no resultaría en una segregación cromosómica precisa. Así, debe haber mecanismos que detecten y corrijan estas uniones defectuosas.

El mecanismo de detección empleado por las células para hallar las uniones incorrectas se basa en la tensión. Cuando las cromátidas hermanas están correctamente unidas a los microtúbulos, sus cinetocoros se encuentran en tensión (véase la Fig. 19-25a). Los microtúbulos unidos a los cinetocoros los traccionan y las moléculas de cohesión que mantienen a las cromátidas hermanas juntas resisten estas fuerzas, lo que crea tensión en los cinetocoros. La unión merotética, sintética o monotética conduce a una tensión insuficiente en los cinetocoros, y esto permite a la célula distinguir estas formas defectuosas de unión y diferenciarlas de la forma anfitélica.

¿De qué manera la célula puede detectar si los cinetocoros están en tensión o no lo están? La proteincinasa **Aurora B** y sus factores de regulación asociados, en conjunto conocidos como el complejo pasajero de los cromosomas (CPC), detectan los cinetocoros que no están en tensión y cortan estas uniones de los microtúbulos; así, dan a las células una segunda oportunidad de unirse correctamente. Las bases moleculares de este mecanismo de detección se comprenden en parte. La

Aurora B fosforila algunos componentes de los cinetocoros implicados en la unión a los microtúbulos. Cuando se fosforilan, estas proteínas pierden su actividad de unión a los microtúbulos. La Aurora B se localiza en la región de las cromátidas hermanas *entre* los dos cinetocoros. Cuando estos no están en tensión, se encuentran muy cercanos a la Aurora B, y la proteincinasa puede fosforilar las subunidades que se unen a los microtúbulos de los cinetocoros y desestabilizar cualquier unión cinetocoro-microtúbulo (véase la Fig. 19-25b-d). Cuando los microtúbulos se unen correctamente a los cinetocoros, las fuerzas de aquéllos traccionan a los cinetocoros y los alejan de Aurora B; así, la cinasa ya no puede alcanzar sus dianas en los cinetocoros (véase la Fig. 19-25a).

Los microtúbulos traccionan continuamente sobre los cromosomas. Una vez que todos los cromosomas se han unido a los microtúbulos de modo anfitélico, lo único que puede evitar que estos se segreguen a los polos y los mantengan en el medio del huso son los complejos de cohesina (véase la Fig. 19-25a). Como veremos en la Sección 19.6, es el seccionamiento de estas moléculas de cohesina el que inicia la segregación de los cromosomas en la anafase.

La condensación de los cromosomas facilita la segregación

La segregación de los cromosomas no solo requiere la construcción del aparato que los segregue, sino también que el DNA se compacte en estructuras que faciliten su transporte. Un intento de segregar los largos complejos de proteína-DNA entretreídos, presentes en las células en interfase, llevaría a la ruptura del DNA y así a la pérdida de material genético. Para evitar este destino, las células compactan sus cromosomas durante la profase en las estructuras densas con las que hemos tomado contacto a través de la microscopía óptica o electrónica (Fig. 19-26).



FIGURA 19-26 Fotomicrografía electrónica de barrido de un cromosoma en metafase. Durante la metafase, los cromosomas están completamente condensados y las dos cromátidas hermanas individuales son visibles. [Biophoto Associates/Photo Researchers.]

La condensación de los cromosomas resulta en una pronunciada reducción en su longitud, hasta 10 000 veces en los vertebrados. El segundo aspecto clave del proceso de compactación es la separación de las cromátidas hermanas entrelazadas. Este proceso se llama **resolución de las cromátidas hermanas** y está mediado en parte por la actividad desencadenadora de la topoisomerasa II y va mano a mano con el proceso de condensación.

La condensación de los cromosomas no se comprende muy bien, pero resulta central para este proceso un complejo proteico conocido como **complejo de la condensina**. Este complejo proteico está relacionado con el complejo de la cohesina, que vincula a las cromátidas hermanas manteniéndolas juntas después de la replicación del DNA, y que fue inicialmente identificado sobre la base de su capacidad de promover la condensación cromosómica en extractos de rana. Al igual que lo que ocurre con el complejo de la cohesina, las condensinas están compuestas de dos subunidades proteicas SMC de espirales enrolladas, que se asocian a través de sus dominios ATPasa con subunidades no-SMC. Cuando la función de la condensina se pierde en las células, los cromosomas no se condensan y la separación de las cromátidas hermanas no se resuelve. El modo en que las condensinas compactan los cromosomas no se comprende, pero en una analogía con los anillos de las cohesinas, las condensinas crean vínculos intracromosómicos que empaquetan los cromosomas en bucles característicos que se ven en las fotomicrografías electrónicas de los cromosomas compactados.

Tal como ocurre en los eventos mitóticos iniciales, la condensación de los cromosomas finalmente es desencadenada por las CDK mitóticas. No se conocen los mecanismos exactos por los cuales estas cinasas inducen la condensación de los cromosomas, pero parece que las CDK mitóticas inducen el proceso, al menos parcialmente, activando las

condensinas. Dos de las subunidades de condensina no-SMC son dianas de las CDK mitóticas. Su fosforilación estimula a las condensinas a superenrollar el DNA in vitro.

Por último, los procesos que actúan en paralelo con las condensinas contribuyen también a la compactación cromosómica. La disociación de las cohesinas desde los cromosomas es un proceso paralelo de este tipo. Una gran fracción de las cohesinas es eliminada de los cromosomas durante la profase (véase la Fig. 19-20, paso 3). Este proceso es mediado por la fosforilación de los organismos, por la cinasa Polo y la cinasa Aurora B. En la mayoría de los organismos, las cohesinas sólo se mantienen alrededor de los centrómeros. Las cohesinas que están alrededor de los centrómeros están protegidas de la eliminación dependiente de la fosforilación por la proteínofosfatasa 2A (PP2A). Esta fosfatasa es reclutada a regiones centroméricas por un miembro de una familia de factores de direccionamiento de PP2A conocidos como la familia de proteínas Mei-S332/Shugoshin. El reservorio protegido de cohesinas proporciona la resistencia necesaria a la fuerza de tracción ejercida por los microtúbulos para establecer la tensión en los cinetocoros biorientados. Como veremos en la Sección 19.8, este mecanismo de protección también desempeña un papel esencial en el establecimiento del patrón de agregación de los cromosomas en la meiosis.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 19.5

Entrada en mitosis

- Las CDK mitóticas inducen la entrada en la mitosis en todos los eucariontes.
- Las CDK mitóticas se mantienen inactivas hasta la finalización de la replicación del DNA por la fosforilación inhibitoria sobre la subunidad de las CDK.
- Las CDK mitóticas promueven su propia activación a través de los bucles de retroalimentación positiva que conducen a la rápida inactivación de la cinasa Wee1 y a la activación de la fosfatasa Cdc25.
- Las CDK mitóticas inducen la degradación de la envoltura nuclear en la mayoría de los eucariontes por las láminas fosforilantes.
- La duplicación de los centrosomas ocurre durante la fase S. Las CDK mitóticas inducen la separación de los centrosomas duplicados, lo que inicia la formación del huso mitótico.
- Las cromátidas hermanas se unen al huso mitótico a través de los cinetocoros de modo biorientado, con un cinetocoro hermano que se une a los microtúbulos que emanan de un polo del huso y el otro a los microtúbulos nucleados por el otro polo del huso.
- Las células detectan la biorientación de las cromátidas hermanas a través de mecanismos basados en la tensión. Cuando los cinetocoros no están bajo tensión, la proteínocinasa Aurora B fosforila las subunidades que se unen a los microtúbulos de los cinetocoros que disminuye su afinidad de unión al microtúbulo.
- Los cromosomas deben estar compactados para segregarse.
- Las condensinas, complejos proteicos relacionados con las cohesinas, facilitan la condensación de los cromosomas que son activados por las CDK mitóticas.

19.6 Fin de la mitosis: segregación de cromosomas y salida de la mitosis

Una vez que todos los cromosomas se han condensado y se han unido correctamente al huso mitótico, comienza su segregación. En esta sección, analizaremos de qué manera el seccionamiento de las cohesinas por una proteasa conocida como separasa desencadena el movimiento de los cromosomas en la anafase y cómo se encuentra regulada esta escisión. Luego exploraremos el modo en que la maquinaria regulada esta la escisión de las cohesinas en la transición metafase-anafase, el CPA/C, también inicia la inactivación de las CDK mitóticas. Posteriormente veremos de qué manera las fosfatasas activadas al final de la mitosis participan en la inactivación de las CDK mitóticas y llevan a cabo el desensamblaje de las estructuras mitóticas y la reinitación de la célula al estado G_1 . Luego, finalizaremos esta sección con un análisis de la citocinesis, el proceso que genera las dos células hijas.

La escisión de las cohesinas mediada por las separasas inicia la segregación de los cromosomas

Como mencionamos en la sección previa, cada cromátida hermana de un cromosoma en metafase está unida a los microtúbulos por medio de su cinetocoro (véase la Fig. 19-24). En metafase, el huso está en un estado de tensión, con fuerzas que traccionan ambos cinetocoros hacia los polos opuestos del huso. Las cromátidas hermanas no se separan porque se mantienen juntas en sus centrómeros por complejos de cohesina. En todos los organismos analizados hasta la fecha, la pérdida de cohesinas desde los cromosomas desencadena el movimiento de los cromosomas en la anafase. El mecanismo responsable de esta pérdida de cohesinas desde los cromosomas también está conservado. Una proteasa conocida como **separasa** corta una subunidad de la cohesina llamada Scc1 o Rad21 y rompe los círculos proteicos que vinculan a las cromátidas hermanas (Fig. 19-27). Una vez que este vínculo se ha roto, se inicia la anafase como una fuerza hacia los polos ejercida sobre los cinetocoros, que mueven las cromátidas hermanas escindidas hacia los polos del huso.

La escisión de las cohesinas fue descubierta en las levaduras en gemación. El análisis de la subunidad Scc1 por la técnica de Western blot mostró que la proteína migraba en geles de SDS PAGE de acuerdo con su peso molecular, predicho a partir de G_1 hasta metafase, pero durante la anafase, la proteína corría considerablemente más rápido en el gel de SDS PAGE, lo cual indicaba que de alguna manera era más pequeña. Estudios ulteriores demostraron que la forma de la Scc1 que migraba más rápido era, de hecho, un producto de escisión. Un análisis de la identidad de la proteína responsable de la escisión de la cohesina provino del estudio de mutantes de la levadura previamente identificadas, que fracasaban en la segregación de los cromosomas durante la anafase. Una mutante del gen que codificaba *ESPI* –que conocemos como separasa– fracasó en producir el fragmento de escisión. El análisis posterior reveló no solo que la separasa es una proteasa, sino que la escisión de la cohesina resulta esencial para la segregación cromosómica. Las células que expresan una forma de Scc1 con sus sitios de escisión mutados no pueden segregar sus cromosomas. Dada la naturaleza irreversible de la escisión de Scc1, es absolutamente esencial que la actividad de la separasa esté muy controlada. De aquí en adelante, analizaremos esta regulación.

El CPA/C activa la separasa a través de la ubiquitinación de la securina

Antes de la anafase, una proteína conocida como **securina** se une a la separasa y la inhibe (véase la Fig. 19-27). Una vez que todos los cinetocoros se han unido a los microtúbulos del huso del modo biorientado correcto, el CPA/C ubiquitina ligasa, dirigida por un factor específico Cdc20, ubiquitina la securina (nótese que este factor de especificidad es diferente del Cdh1, que tiene como diana los sustratos CPA/C para la degradación en etapas posteriores durante la mitosis). La securina poliubiquitinada es rápidamente degradada por proteasomas; por lo tanto, libera separasa.

El CPA/C^{Cdc20} es activado en la profase por la fosforilación, por acción de las CDK mitóticas, de varias subunidades del CPA/C. Sin embargo, este CPA/C^{Cdc20} fosforilado no es activo hasta que todos los

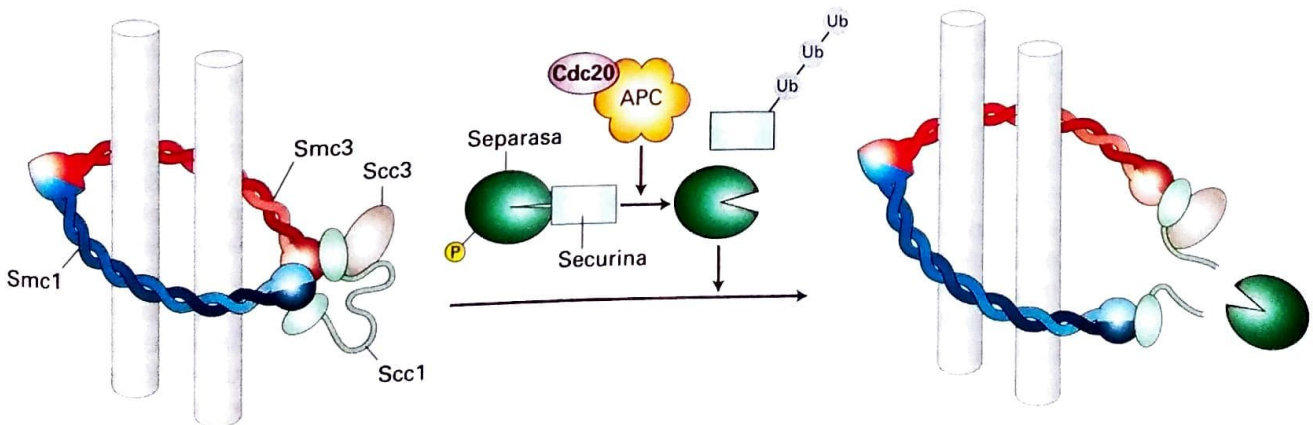


FIGURA 19-27 Regulación de la escisión de la cohesina. La separasa, una proteasa que puede escindir la subunidad Scc1 de los complejos de cohesina, es inhibida antes de la anafase por la unión de la securina. Las CDK mitóticas también inhiben la separasa al fosforilarla. Cuando todos los cinetocoros se han unido a los microtúbulos del huso y el aparato mitótico está adecuadamente ensamblado y orientado, el factor de especificidad Cdc20, asociado con el

CPA/C, se dirige hacia él para ubiquitinar la securina y las ciclinas mitóticas. Después de la degradación de la securina y el descenso en la actividad de la CDK mitótica, la separasa liberada y desfosforilada escinde la subunidad Scc1, con lo cual rompe los círculos de cohesina y permite que las cromátidas hermanas se separen por acción del aparato del huso que las tracciona hacia polos opuestos de este.

cromosomas estén biorientados sobre el huso mitótico. Como veremos en la Sección 19.7, el CPA/C^{Cdc20} es inhibido por una vía de puntos de control que asegura que la mitosis no procederá, hasta que todos los cromosomas hayan logrado una unión adecuada al aparato mitótico. La Cdc20 está inhibida hasta que cada cinetocoro se haya unido a los microtúbulos y haya tensión aplicada a los cinetocoros de todas las cromátidas hermanas, traccionándolas hacia los polos opuestos del huso. En las células de los vertebrados, también está regulada la separación por fosforilación. La actividad de las CDK mitóticas inhibe la separación durante la profase y la metafase. Solo cuando la actividad de la CDK mitótica comienza a declinar en la transición metafase/anafase, a través de la degradación proteica mediada por CPA/C^{Cdc20}, la separación puede volverse activa y desencadenar la segregación cromosómica.

Una vez que las cohesinas se han escindido, se asegura el movimiento de los cromosomas en la anafase. Como analizamos en el Capítulo 18, la segregación de los cromosomas está mediada por la despolimerización de los microtúbulos y las proteínas motoras, a medida que los polos del huso se separan uno de otro. La declinación de la actividad de las CDK mitóticas es importante para estos movimientos cromosómicos de la anafase. Cuando la inactivación de las CDK mitóticas está inhibida, ocurre la anafase, pero es anormal. La desfosforilación de un número de proteínas asociadas a los microtúbulos, que afectan su dinámica, parece importante para este proceso. En las levaduras en gemación, esta desfosforilación es llevada a cabo por la proteinofosfatasa Cdc14 que, como veremos, desempeña un papel fundamental en la etapa final del ciclo celular, la salida de la mitosis.

La inactivación de las CDK mitóticas desencadena la salida de la mitosis

La elongación del huso en la anafase y los eventos asociados con la salida de la mitosis (el desensamblaje del huso mitótico, la descondensación de los cromosomas y la nueva formación de la envoltura nuclear) son llevadas a cabo por la desfosforilación de los sustratos de las CDK. En otras palabras, la salida de la mitosis puede verse como la inversa del ingreso en la mitosis. Los eventos de fosforilación que desencadenaron los diferentes eventos mitóticos deben ser deshechos para que la célula revierta al estado G₁.

La desfosforilación de los sustratos CDK mitóticos es provocada por la inactivación de las CDK mitóticas. En la mayor parte de los organismos, la inactivación de las CDK mitóticas es desencadenada por la degradación mediada por CPA/C^{Cdc20} de las ciclinas mitóticas. A medida que las CDK mitóticas activan CPA/C^{Cdc20}, inician su propia muerte. En las levaduras en gemación, solo aproximadamente el 50 por ciento de las ciclinas mitóticas son degradadas por CPA/C^{Cdc20}. Como veremos en la Sección 19.7, un depósito de ciclinas mitóticas está protegido del CPA/C^{Cdc20} para permitir que haya tiempo suficiente para ubicar al huso mitótico con precisión dentro de la célula. No se sabe de qué manera una fracción de las ciclinas mitóticas está protegida de CPA/C^{Cdc20}, pero queda claro que es necesario un segundo paso de la mitosis que inactive las CDK para que ocurra la salida de esta fase. La proteína conservada fosfatasa Cdc14 lleva a cabo este segundo paso en la inhibición de la CDK mitótica.

En las levaduras en gemación, la inactivación completa de las CDK mitóticas requiere la destrucción de las ciclinas mitóticas por la CPA/C^{Cdh1} y la acumulación del inhibidor de CDK Sic1, que mantiene las CDK de la fase S bajo control hasta que las células ingresan en el ciclo

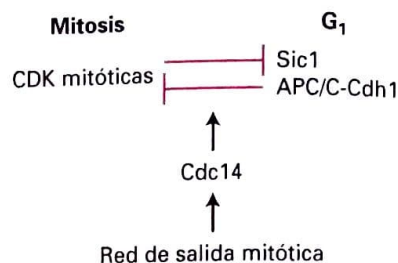


FIGURA 19-28 La proteinofosfatasa Cdc14 desencadena la salida de la mitosis en las levaduras en gemación. Durante la mitosis, la actividad de la CDK mitótica inhibe a sus inhibidores, CPA/C^{Cdh1} y Sic1. Durante G₁, CPA/C^{Cdh1} y Sic1 inhiben las CDK mitóticas. Durante la salida de la mitosis, la proteinofosfatasa Cdc14 mueve el interruptor entre estos dos estados antagonistas. La red de la salida mitótica activa la fosfatasa durante la anafase y permite que desfosforile a CPA/C^{Cdh1}, por lo tanto, la activa. La fosfatasa también promueve la acumulación de Sic1. Además, la Cdc14 desfosforila los muchos sustratos CDK mitóticos que conducen a la rápida salida de la mitosis.

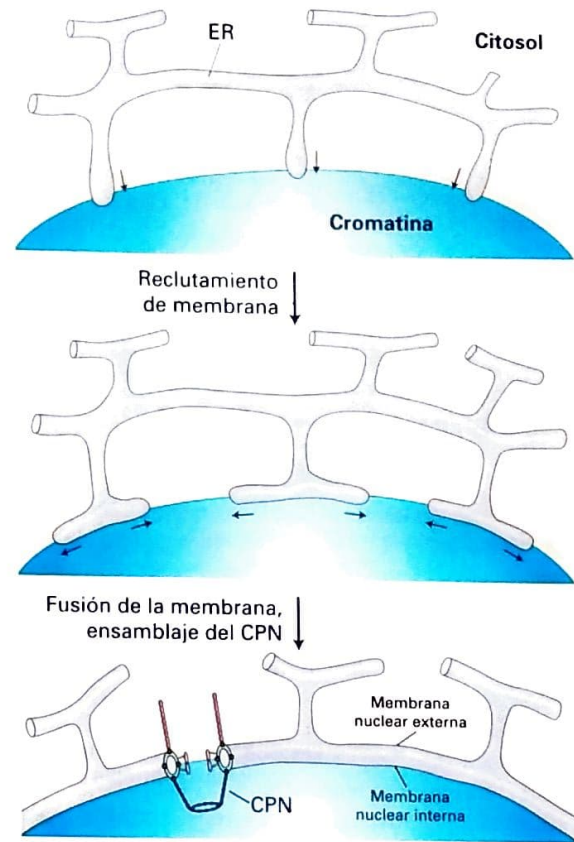
celular. Tanto el CPA/C^{Cdh1} como la Sic1 son inhibidos por las CDK mitóticas. Por el contrario, el CPA/C^{Cdh1} y la Sic1 inhiben las CDK mitóticas (Fig. 19-28). La proteinofosfatasa Cdc14 enciende el interruptor entre estos dos estados mutuamente antagónicos durante la anafase. La Cdc14 se mantiene inactiva durante la mayor parte del ciclo celular, pero la fosfatasa se activa durante la anafase por la vía de señalización de una GTPasa conocida como la red de salida de la mitosis (MEN). Esta cascada de señalización es, como veremos en la Sección 19.7, sensible a la posición del huso y solo se vuelve activa en la anafase, cuando este se halla adecuadamente ubicado dentro de la célula. Una vez que se ha activado durante la anafase, la Cdc14 desfosforila el CPA/C^{Cdh1} y la Sic1 para promover la degradación de las ciclinas mitóticas y la inactivación de las CDK mitóticas, respectivamente. Esto conduce a la salida de la mitosis.

La actividad de la fosfatasa también es esencial para la salida de la mitosis en los vertebrados. La simple inactivación de las CDK mitóticas no es suficiente para desencadenar la salida a tiempo de la mitosis. Aún no está claro qué fosfatasa desfosforila los sustratos de las CDK para reiniciar a la célula y volverla a la etapa G₁. Tanto la proteinofosfatasa 1 como la proteinofosfatasa 2A han estado implicadas en el proceso.

Finalmente, la reversión de la fosforilación de las CDK mitóticas cambia las actividades de muchas proteínas nuevamente a su estado de interfase. La desfosforilación de las condensinas, la histona H1 y otras proteínas asociadas a la cromatina conduce a la descondensación de los cromosomas mitóticos en la telofase. Se desconocen las dianas de las CDK, cuya desfosforilación es importante para el desensamblaje del huso mitótico, pero probablemente haya múltiples dianas proteicas. Se conoce más acerca del modo en que se reorganiza la envoltura nuclear. Se cree que las proteínas de la membrana nuclear interna desfosforiladas se unen nuevamente a la cromatina. Como resultado de ello, se piensa que múltiples proyecciones de la membrana del RE que contienen estas proteínas se asocian con la superficie de los cromosomas en descondensación y luego se fusionan unas con otras, dirigidas por un mecanismo desconocido para formar una doble membrana continua alrededor de cada cromosoma (Fig. 19-29). La desfosforilación de los subcomplejos del poro nuclear les permite reensamblarse en CPN completos que atraviesan las membranas interna y externa, poco después de la fusión de las proyecciones del RE. La Ran-GTP, necesaria para impulsar la mayoría de la importación y exportación nuclear (véase el Cap.13), estimula tanto la fusión de las proyecciones del RE

VIDEO: Dinámica de la envoltura nuclear durante la mitosis

FIGURA 19-29 Modelo para el reensamblaje de la envoltura nuclear durante la telofase. Extensiones del retículo endoplasmático (RE) se asocian con cada cromosoma en descondensación, luego se fusionan entre sí y del poro nuclear desfosforilados se reensamblan en poros nucleares y forman mininúcleos individuales llamados *cariómeros*. El cromosoma encerrado se descondensa adicionalmente y la fusión ulterior de las envolturas nucleares de todos los cariómeros en cada polo del huso forma un núcleo individual que contiene un conjunto completo de cromosomas. CPN: complejo del poro nuclear. (Adaptado de B. Burke y J. Ellenberg, 2002, *Nature Rev Mol Cell Biol* 3:487)



para formar envolturas nucleares hijas como el ensamblaje de los CPN (véase la Fig. 19-29). La concentración de la Ran-GTP es máxima en la microvecindad de los cromosomas en descondensación, porque el factor de intercambio Ran-guanina nucleótido (Ran-GEF) está unido a la cromatina. En consecuencia, la fusión de la membrana está estimulada en las superficies de los cromosomas en descondensación y forma láminas de membrana nuclear con CPN insertados.

La citocinesis crea dos células hijas

Cuando se ha completado la segregación de los cromosomas, el citoplasma y los orgánulos se distribuyen entre las dos futuras células hijas. Este proceso se llama **citocinesis**. Con la excepción de las plantas superiores, la división de las células es provocada por un **anillo contráctil**, formado por actina y el motor de actina miosina (véase la Fig. 17-36). Durante la citocinesis, el anillo se contrae de modo similar a la contracción muscular, tracciona la membrana hacia adentro y finalmente cierra la conexión entre las dos células hijas.

La citocinesis debe estar coordinada con otros eventos del ciclo celular en tiempo y espacio. Para que la división celular produzca dos células hijas, cada una de las cuales contendrá los componentes necesarios para la sobrevivencia, el plano de división debe estar ubicado de modo tal que cada célula reciba aproximadamente la mitad del contenido citoplasmático de la célula madre y *exactamente* la mitad del contenido genético. La citocinesis también debe estar coordinada con la secuencia temporal de los eventos del ciclo celular, la finalización de la mitosis. En los párrafos siguientes, exploraremos ambos aspectos de la regulación de la citocinesis.

En las células animales, el anillo contráctil se forma durante la anafase y se ubica en el medio del huso de la anafase. Esto asegura que cada célula hija reciba la mitad del material genético. A pesar de la importancia de esta coordinación, se sabe sorprendentemente poco acerca de ella. Algunos experimentos apoyan la idea de que se las señales enviadas desde la **zona media del huso** hacia la corteza celular son importantes para coordinar el sitio de citocinesis con la posición del huso. Otras investigaciones sugieren que los microtúbulos del huso interactúan con la corteza celular y ubican el **surco de segmentación** con respecto a la posición de los polos del huso. Más probablemente, una combinación de estas vías gobierne la formación del surco de segmentación durante la citocinesis.

En las levaduras en gemación y de fisión, el sitio de la citocinesis está determinado antes de la mitosis. En las levaduras en gemación, esto ocurre durante G_1 , cuando se determina el sitio de gemación.

En las levaduras de fisión, las proteínas importantes para la formación del anillo contráctil se acumulan en la zona media de la célula durante G_1 . Independientemente de la secuencia de eventos (el sitio de la mitosis primero, luego el sitio de la citocinesis o viceversa), queda claro que estos sucesos deben estar estrechamente coordinados. Como veremos en la Sección 19.7, las células han desarrollado mecanismos de vigilancia que aseguran que el sitio de la citocinesis está coordinado con la posición del huso. Esto es de especial importancia durante las **divisiones celulares asimétricas**, que dan origen a células de diferente tamaño y destino. Estas divisiones celulares son esenciales durante el desarrollo y en las divisiones de las células madre (véase el Cap. 21). La citocinesis también debe estar coordinada con otros eventos del ciclo celular. La principal señal para ella es la activación de las CDK mitóticas. Las células que expresan una versión estabilizada de las ciclinas mitóticas avanzan a través de la anafase, pero no sufren citocinesis. Las dianas de las CDK en la maquinaria de la citocinesis aún no han sido descubiertas.

Esto concluye nuestro análisis acerca de los eventos moleculares de la división celular. Como vimos, las cinasas dependientes de ciclinas y la degradación de proteínas mediadas por ubiquitinas son el centro de este control (Fig. 19-30). A continuación, analizaremos los mecanismos que aseguran que una etapa posterior del ciclo celular no se inicie hasta que la previa se haya completado y que cada paso del ciclo celular ocurra con precisión.

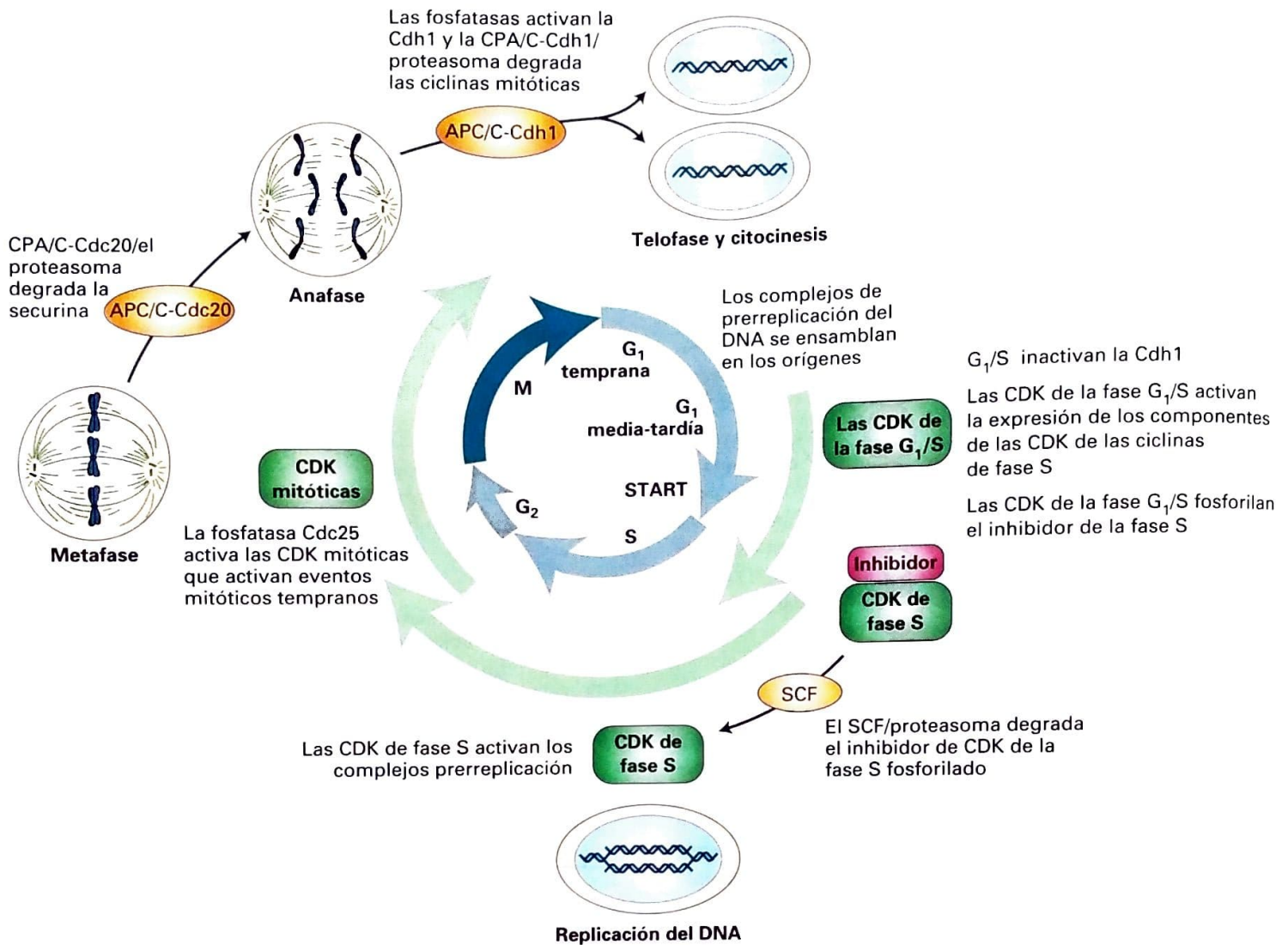


FIGURA 19-30 Procesos fundamentales del ciclo celular eucariótico. Véase el texto para análisis.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 19.6

Fin de la mitosis: segregación de cromosomas y salida de la mitosis

- La escisión de las cohesinas por la separasa induce la segregación de los cromosomas durante la anafase.
- Al inicio de la anafase, el CPA/C es dirigido por el Cdc20 para ubiquitinar la securina, que posteriormente se degrada por los proteasomas. Esto activa la separasa (véase la Fig. 19-27).
- La salida de la mitosis es desencadenada por la inactivación de las CDK mitóticas, principalmente llevada a cabo por la degradación de la ciclina mitótica.
- La salida de la mitosis requiere la actividad de las proteínofosfatasas, tales como la Cdc14, para eliminar las fosforilaciones mitóticas de muchas proteínas diferentes, lo que permite el desensamblaje del huso mitótico, la descondensación de los cromosomas y el reensamblaje de la envoltura nuclear.
- La citocinesis finaliza la fisión celular y debe estar coordinada con el sitio de la división nuclear. Esta coordinación es de especial importancia en células que realizan una división celular asimétrica.

19.7 Mecanismos de vigilancia en la regulación del ciclo celular

Los mecanismos de vigilancia conocidos como **vías de puntos de control** operan para asegurar que el siguiente evento del ciclo celular no se inicie hasta que el previo no se haya completado. Las vías de puntos de control consisten en **sensores** que controlan un evento celular particular, una **cascada de señalización** que inicia la respuesta y un **efector** que detiene el avance del ciclo celular y activa vías de reparación cuando resulta necesario. Los eventos del ciclo celular controlados por las vías de puntos de control incluyen el crecimiento, la replicación del DNA, el daño del DNA, la unión del cinetocoro al huso mitótico y la posición del huso dentro de la célula. Son responsables de la extraordinariamente alta fidelidad de la división celular, que asegura que cada célula hija recibe el número correcto de cromosomas, replicados con precisión. Operan controlando las actividades de las proteínasas de las CDK-ciclinas mediante una diversidad de mecanismos: la regulación de la síntesis y la degradación de las ciclinas, la fosforilación de las CDK en sitios inhibidores, la regulación de la síntesis y la estabilidad de los inhibidores de las

CDK (CKI) que inactivan los complejos ciclina-CDK y la regulación de CPA/C ubiquitina-proteínligasa.

Las vías de puntos de control establecen dependencias y evitan errores en el ciclo celular

Los experimentos que condujeron a la idea de los mecanismos de vigilancia o vías de puntos de control que establecen dependencias en el ciclo celular fueron simples y bellos en su interpretación. Recuerde que Lee Hartwell y cols. aislaron mutantes *cdc* de *S. cerevisiae* sensibles a la temperatura. Su caracterización y el estudio de los genes afectados en estos mutantes moldearon profundamente nuestro conocimiento del ciclo celular eucariote. Fue la caracterización de una de estos mutantes *cdc*, la *cdc 13*, lo que condujo a Hartwell y a sus colegas a formular el concepto de las vías de los puntos de control.

Para el propósito de nuestro presente análisis, el único hecho importante para tener en cuenta acerca de la función de *CDC13* es que el gen es necesario para la replicación de los telómeros y que, en su ausencia, persisten en las células grandes tramos de DNA telomérico replicado de manera incompleta. Las células que llevan un alelo sensible a la temperatura del gen *cdc13* como única fuente de *CDC13* se detienen con un contenido de DNA G_2 cuando se cambian a la temperatura restrictiva (Fig. 19-31a). Esta detención es indicativa de un defecto en la fase S tardía, o la entrada a la mitosis. Cuando las

células se regresan a la temperatura permisiva, la proteína sensible a la temperatura es nuevamente funcional, y las células continúan proliferando. Así, aunque las células mutantes *cdc13* no puedan dividirse a la temperatura restrictiva, retienen su viabilidad y así son capaces de reanudar la proliferación una vez que se las retorna a la temperatura permisiva a la que la proteína *cdc13* sensible a la temperatura resultó nuevamente funcional.

Para caracterizar el mutante *cdc13* con más detalle, Hartwell y cols. examinaron los efectos de introducir una segunda mutación en otro gen, una delección en el gen *RAD9*. El gen *RAD9* no es esencial para la viabilidad, pero cuando está delecionado, las células son muy sensibles a agentes que dañan el DNA, como los rayos X. Esta mutación por sí misma no afecta el crecimiento de las células a ninguna temperatura, pero tiene un efecto pronunciado en los mutantes *cdc13*. Cuando los investigadores examinaron el doble mutante *cdc13 rad9* a temperatura restrictiva, observaron que el mutante ya no se detenía en G_2 , sino que las células continuaban dividiéndose durante unas pocas divisiones (Fig. 19-31b). Cuando estas células retornaban a la temperatura permisiva, el doble mutante no podía reanudar la proliferación. Esto indica que mientras las células continuaban dividiéndose unas pocas veces a la temperatura restrictiva perdían su viabilidad.

Hartwell y cols. propusieron la siguiente explicación para esta observación: los mutantes *cdc13* se detienen a la temperatura restrictiva porque albergan un DNA replicado de forma incompleta. Este DNA dañado señala a la célula que detenga el avance en el ciclo celular e induce la reparación del daño porque la mitosis de las células con DNA dañado casi ciertamente conduciría a la muerte celular. El gen *RAD9* es parte de la maquinaria que contribuye a esta detención del ciclo celular. En las células que carecen del *RAD9*, el “alto al avance del ciclo celular”, la señal no opera y las células sufren mitosis a pesar del DNA replicado en forma incompleta. Esto mata a las células. Hartwell y cols. llamaron a este mecanismo de vigilancia la **vía del punto de control**.

Actualmente sabemos que las células albergan múltiples vías del punto de control para asegurar que una fase del ciclo celular no comience antes de que la previa se haya completado. Además de establecer dependencias, las vías del punto de control aseguran que cada aspecto de la replicación del cromosoma y su división ocurran con precisión. Por ejemplo, un único cinetocoro que no pueda unirse al huso mitótico puede detener el avance del ciclo celular en la metafase al activar el punto del control del ensamblaje del huso.

Cada punto del control está construido del mismo modo. Un sensor detecta un defecto en un proceso celular particular y, en respuesta a este defecto, activa una vía de transducción de la señal. Los efectores activados por la vía de señalización inician la reparación del defecto y detienen el avance del ciclo celular hasta que este defecto se corrija. A continuación, analizaremos las principales vías de puntos de control que gobiernan el avance del ciclo celular.

La vía del punto de control del crecimiento asegura que las células sólo entran en el ciclo celular después de una suficiente biosíntesis de macromoléculas

La proliferación celular requiere que las células se multipliquen a través del proceso de división celular y que las células individuales crezcan por medio de la biosíntesis de las macromoléculas. El crecimiento ce-

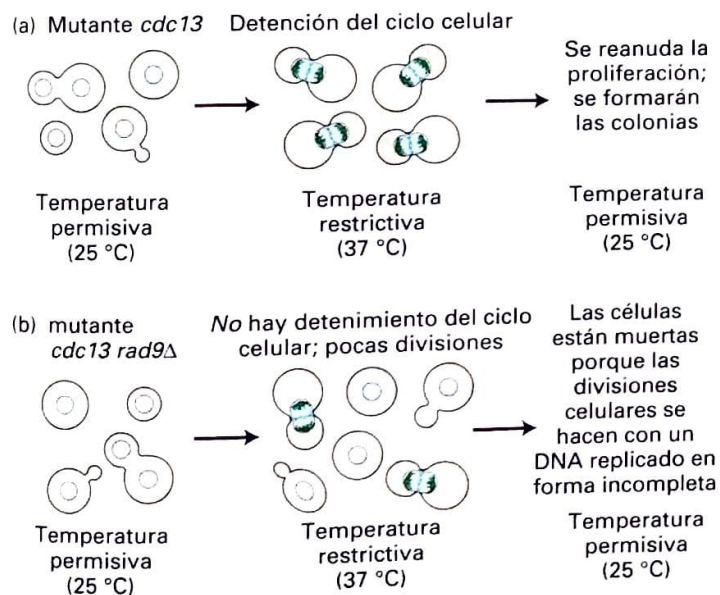


FIGURA EXPERIMENTAL 19-31 Experimento que llevó al concepto de vías del punto de control. (a) Cuando se pasan a la temperatura restrictiva, los mutantes *cdc13* detienen la progresión del ciclo celular por la replicación incompleta del DNA. Cuando las células se retornan a la temperatura permisiva, reanudan la proliferación porque mantuvieron la viabilidad durante el ciclo celular detenido. (b) Los mutantes dobles *cdc13 rad9Δ* no se detienen cuando se las pasa a la temperatura restrictiva, porque estas células no pueden detectar que su DNA se replicó de modo incompleto. Las células pasan por mitosis, y esto lleva a la muerte celular porque se pierde información genética. Por lo tanto, las células pierden viabilidad rápidamente a la temperatura restrictiva y ya no pueden reanudar la proliferación cuando vuelven a la temperatura permisiva

lular y su división son procesos separados, pero para que las células mantengan un tamaño constante a medida que se multiplican, el crecimiento y la división celulares deben estar estrechamente coordinados. Por ejemplo, cuando los nutrientes son limitados, las células reducen su tasa de crecimiento y la división celular debe ser reprimida, de manera concomitante. Este tipo de coordinación entre el crecimiento y la división celular es de especial importancia en los organismos unicelulares que experimentan cambios en la disponibilidad de nutrientes como parte de su ciclo de vida natural. Por lo tanto, no resulta sorprendente que existan mecanismos de vigilancia que ajusten la tasa de división celular de acuerdo con la tasa de crecimiento.

En la levadura en gemación, el crecimiento y la división celulares están coordinados en G_1 . En esta etapa del ciclo celular, los ciclos de crecimiento y división están ligados, lo que hace que la actividad de las CDK de G_1 dependa del crecimiento celular. ¿Qué aspecto del crecimiento está ligado al ciclo celular? Los experimentos clásicos que emplean inhibidores de la síntesis proteica indican que la tasa de crecimiento, y así el control del ciclo celular por el crecimiento, está determinada por la síntesis proteica. De qué manera controla la síntesis proteica la actividad de las CDK en G_1 es un área de investigación activa. La ciclina G_1 Cln3 está sujeta a control traduccional, lo cual hace que los niveles de esta ciclina sean especialmente sensibles a la velocidad de la síntesis de proteínas. Sin embargo, queda claro que este no es el único mecanismo. Aunque las vías moleculares que coordinan la división con el crecimiento celular aún no se comprendan, este control es en apariencia muy plástico. La extensión de G_1 y el *tamaño celular crítico*, es decir el tamaño al cual las células entran en el ciclo celular, cambian con la disponibilidad de nutrientes.

S. pombe crece como una célula con forma de bastón que incrementa su longitud en paralelo con su crecimiento y luego se divide al medio durante la mitosis para producir dos células hijas de igual tamaño (véase la Fig. 19-4). A diferencia de las levaduras en gemación y la mayoría de las células de los metazoos, que crecen primariamente durante G_1 , esta levadura tiene la mayor parte de su crecimiento durante la fase G_2 del ciclo celular y es su entrada en mitosis la que está cuidadosamente regulada en respuesta al tamaño celular. Recuerde que la entrada en mitosis está regulada por la proteínasa Wee1, que inhibe la CDK1 al fosforilar la tirosina 15. Cuando hay limitación de nutrientes, la Wee1 fosforila la CDK1 y así las células permanecen en G_2 hasta que alcanzan el tamaño crítico para el ingreso en la mitosis. Este control de tamaño es llevado a cabo por la localización regulada de proteínas. La proteínasa Pom1 forma un gradiente desde cada polo hacia la zona media de la célula. El inhibidor de la CDK Wee1 y su inhibidor Cdr2 se localizan en regiones en la corteza celular en el medio de la célula (Fig. 19-32). La Pom1 evita que Cdr2 inhiba a Wee1. Cuando las células son pequeñas, Pom1 inhibe a Cdr2. Wee1 es activo y evita el ingreso en la mitosis. A medida que las células crecen, la concentración local de Pom1 en el medio de la célula declina y Cdr2 se vuelve activo e inhibe a Wee1. Ahora las células pueden entrar en mitosis. Así, en este organismo la longitud celular es medida por un gradiente proteico.

En general, los nutrientes no son limitantes en los organismos multicelulares. En lugar de ello, el crecimiento celular está controlado por vías de señalización de factores de crecimiento, como las vías Ras, AMPK y TOR (véanse los Caps. 8 y 16). Estas vías también parecen ser importantes para coordinar el crecimiento y la división celular. Las mutaciones en componentes claves de las vías de señalización de los factores de crecimiento, como Myc, provocan cambios notables en el tamaño celular de *Drosophila*. Myc regula la transcripción de muchos

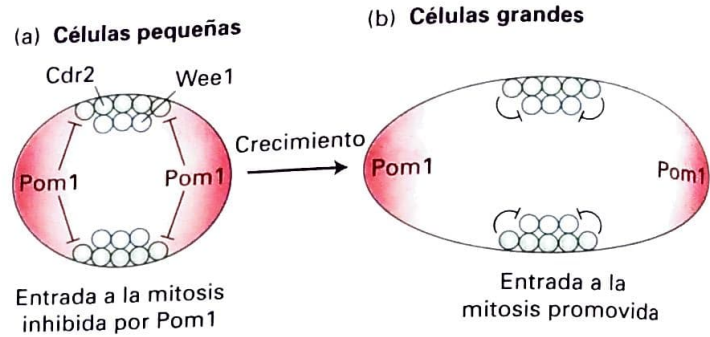


FIGURA 19-32 Un gradiente proteico mide la longitud celular en *S. pombe*. La proteínasa Pom1 forma un gradiente desde cada polo hacia el medio de la célula. Wee1 y su inhibidor Cdr2 se localizan en regiones de la corteza celular en el medio de la célula. Pom1 inhibe Cdr2, y así, la vía que inhibe Wee1. (a) En células pequeñas, la concentración de Pom1 en el medio de la célula es más elevada. Cdr2 está inhibida, lo que permite que Wee1 permanezca activa y prohíba la entrada en mitosis. (b) A medida que las células crecen de longitud, la concentración de Pom1 en el medio de las células declina. La inhibición de Cdr2 por Pom1 disminuye y la vía de señalización de Cdr2 ahora es capaz de inhibir Wee1 y promover la entrada en mitosis. (Adaptado de Moseley y cols., 2009, *Nature*, 459:857-860.)

genes importantes para la biosíntesis de las macromoléculas y, además, de modo más indirecto, las CDK de G_1 . Así, este factor de transcripción parece integrar el crecimiento y la división celulares. Sin embargo, los detalles de esta coordinación aún no han sido esclarecidos.

La respuesta al daño al DNA detiene el avance del ciclo celular cuando el DNA está comprometido

La duplicación completa y precisa del material genético es esencial para la división celular. Si las células entran en mitosis cuando el DNA no se ha replicado por completo o se encuentra dañado de algún otro modo, ocurren cambios genéticos. En muchos casos, estos cambios conducirán a la muerte celular, pero como veremos en el Capítulo 24 también pueden conducir a alteraciones genéticas que resultan en la pérdida del control del crecimiento y de la división y, finalmente, en cáncer. Esto está subrayado por el hecho de que muchas proteínas implicadas en la detección del daño al DNA y su reparación con frecuencia están mutadas en los cánceres humanos.

Las enzimas que replican el DNA son muy precisas, pero su exactitud no es suficiente para asegurar la precisión completa durante la síntesis del DNA. Más aún, las agresiones ambientales, como los rayos X y la luz ultravioleta, pueden provocar daños al DNA, y este daño puede ser reparado antes del ingreso de la célula a la mitosis. Las células tienen un **sistema de respuesta del daño al DNA** que detecta muchos tipos diferentes de daño y responde activando vías de reparación y deteniendo el avance del ciclo celular hasta que el daño se haya reparado. La detención del ciclo celular puede producirse en la fase G_1 , en la fase S o en la fase G_2 , dependiendo de si el daño al DNA ocurrió antes de la entrada al ciclo celular o durante la replicación del DNA. En los organismos multicelulares, la estrategia con la cual se maneja el daño grave al DNA es distinta. En lugar de intentar la reparación del daño, las células sufren **muerte celular programada** o **apoptosis**, un mecanismo que analizaremos con detalle en el Capítulo 21.

El daño al DNA existe en muchas formas y espectros diferentes en cuanto a la gravedad. Una rotura en la hélice del DNA, conocida

como **dobles roturas**, quizás es la forma más grave de daño, dado que una lesión de este tipo casi siempre llevará a la pérdida de DNA si hay mitosis en su presencia. Defectos más sutiles incluyen cortes en una hebra única, cambios estructurales en los nucleótidos o apareamientos erróneos del DNA. Para nuestro debate aquí, es importante notar que las células tienen sensores para todos estos tipos de daños diferentes. Estos sensores hacen un barrido en el genoma y, cuando detectan una lesión, ensamblan factores de señalización y reparación en el sitio de la lesión.

Resultan centrales para la detección de diferentes lesiones un par de proteincinasas homólogas llamadas **ATM** y **ATR**. Estas proteincinasas se reclutan en los sitios de daño al DNA. Luego, inician el reclutamiento secuencial de proteínas adaptadoras y de otro conjunto de proteincinasas llamadas Chk1 y Chk2. Luego, estas cinasas activan mecanismos de reparación y provocan la detención del ciclo celular o la apoptosis en los animales (Fig. 19-33). Las ATR y las ATM reconocen diferentes tipos de daño al DNA. La ATM es muy especializada, dado que solo responde a dobles roturas. La ATR es capaz de reconocer tipos más diversos de daño al DNA, tales como horquillas de replicación detenidas, nucleótidos dañados y rotura de la doble hebra. La ATR reconoce estos tipos diversos de daño porque todos ellos contienen cierta cantidad de *DNA de hebra simple*, ya sea como parte del propio daño o porque las enzimas de reparación crean DNA de hebra simple como parte del proceso reparador. Las horquillas de replicación detenidas, por ejemplo, son reconocidas por la ATR. Se cree que la asociación de ATR con horquillas detenidas activa su actividad

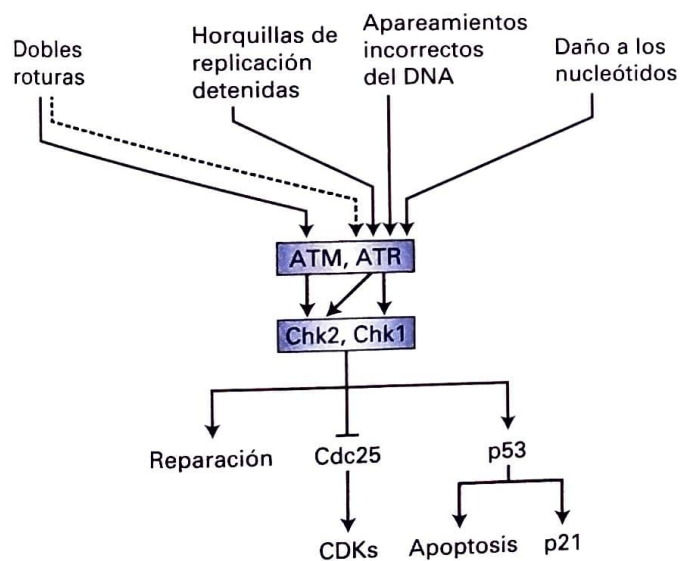


FIGURA 19-33 Sistema de respuesta al daño del DNA. Las proteincinasas ATM y ATR son activadas por el daño al DNA. La ATR responde a una diversidad de daños al DNA –principalmente, el DNA de hebra simple que existe como resultado del propio daño o como resultado de la reparación–. La ATM se activa específicamente por dobles roturas. Dado que las roturas de la doble hebra se convierten a DNA de hebra simple como resultado de la reparación, también, aunque de modo indirecto, y así dibujadas como una línea punteada, activan la ATR. La ATM y la ATR una vez activadas por el daño al DNA activan otro par de proteincinasas relacionadas, la Chk1 y la Chk2. Estas cinasas inducen luego la maquinaria de reparación del DNA y provocan detención del ciclo celular al inhibir la Cdc25. En las células de los metazoarios, cuando el daño al DNA es grave, la Chk1 y Chk2 activan también el factor de transcripción p53. El p53 induce el detenimiento del ciclo celular al inducir la transcripción de la CKI p21 y la apoptosis.

de proteincinasas, y esto conduce al reclutamiento de proteínas adaptadoras cuya función consiste en reclutar y ayudar a activar las cinasas Chk1. La Chk1 activa induce entonces vías de reparación e inhibe la progresión del ciclo celular.

La Chk1 y Chk2 detienen el ciclo celular. Las proteincinasas fosforilan la Cdc25; por lo tanto, la inactivan (véase la Fig. 19-33). Cuando ocurre daño al DNA durante la G_1 , la inhibición de la Cdc25A resulta en la inhibición de las CDK de la fase G_1/S y las CDK de la fase S (Fig. 19-34). Como resultado de ello, estas cinasas no pueden iniciar la replicación del DNA. Cuando ocurre el daño al DNA durante la fase S o en la G_2 , la inhibición de la Cdc25C por la Chk1/2 resulta en la inhibición de las CDK mitóticas y, así, la detención en la G_2 . La replicación activa del DNA inhibe también la entrada en la mitosis. La ATR continúa inhibiendo la Cdc25C vía la Chk1 hasta que todas las horquillas de replicación completan la replicación del DNA y se desensamblan. Este mecanismo hace la iniciación de la mitosis *dependiente* de la terminación de la replicación cromosómica. Finalmente, las células también detectan el estrés de la replicación del DNA que resulta en la detención o el enlentecimiento de la horquilla de replicación. Esto desencadena la activación de la vía del punto de control de ATR-Chk1 y resulta en la represión de la actividad de CDK de la fase S, con lo cual se evita el inicio de los orígenes tardíos de replicación.

La inhibición de la familia de fosfatasa Cdc25 mediada por Chk1 no es el único mecanismo por el cual el daño o la replicación incompleta del DNA inhiben el avance del ciclo celular. Como veremos luego, el daño al DNA conduce a la activación del factor de transcripción p53, que transcribe el inhibidor de la CDK p21. El p21 se une a todos los complejos ciclina-CDK de los metazoarios y los inhibe. Como resultado, las células se detienen en las fases G_1 y G_2 (véase la Fig. 19-34).

La ATM reconoce las dobles roturas (véase la Fig. 19-33). La proteincinasa se recluta directamente a los extremos del DNA mediante un complejo conocido como el complejo MRN, que se une a los extremos rotos y los mantiene unidos. La ATM activada luego fosforila a la Chk2 y la activa, y recluta proteínas de reparación. Estas proteínas de reparación inician la **recombinación homóloga**, como se analizó en el Capítulo 4. Este proceso involucra la creación de salientes de cadena simple que, a su vez, reclutan y activan ATR y sus efectores, lo cual adicionalmente incrementa la respuesta de daño al DNA. La ATM también puede reclutar una vía de reparación alternativa en la que dos dobles roturas se fusionan directamente entre sí, en un proceso de reparación conocido como **unión de extremos no homólogos**. Al igual que la activación de la ATR, la de ATM también detiene el avance del ciclo celular por la inhibición de Cdc25 mediada por Chk2, y de este modo evita la activación de las CDK. Esta inhibición puede ocurrir en la G_1 o en la G_2 .

Un efecto clave de la respuesta de daño al DNA en las células de los metazoos es el factor de transcripción **p53** (véase la Fig. 19-33). Es conocido como supresor tumoral porque su función normal consiste en limitar la proliferación celular en vistas al daño al DNA. La proteína es notablemente inestable y, en general, no se acumula en niveles lo suficientemente elevados como para estimular la transcripción en condiciones normales. La inestabilidad de la p53 resulta de su ubiquitinación por una ligasa de ubiquitina-proteína llamada *Mdm2* y la degradación proteasómica ulterior. La rápida degradación de la p53 es inhibida por la ATM y la ATR, que fosforilan la p53 en un sitio que interfiere con la unión de la Mdm2. Esta y otras modificaciones de la p53 en respuesta al daño del DNA incrementan notablemente su capacidad de activar la transcripción de genes es-

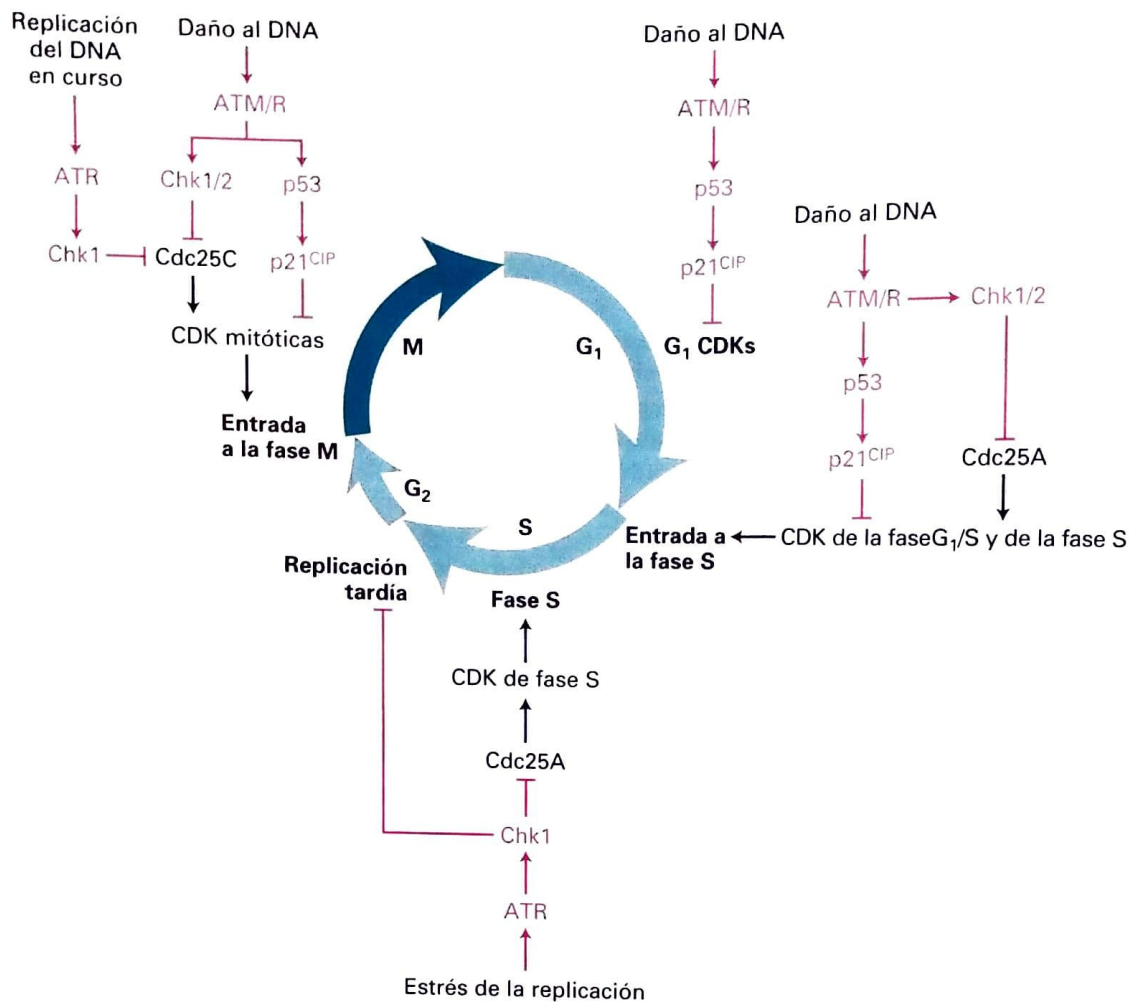


FIGURA 19-34 Panorama general de los controles del punto de control de daño al DNA en el ciclo celular. Durante G₁, la vía de p53-p21^{CIP} inhibe las CDK de G₁. Durante la replicación en curso del DNA y en respuesta al estrés de la replicación (un movimiento lento de la horquilla de replicación de este), la cascada de la proteína ATR-Chk1 fosforila e inactiva la Cdc25C, evitando de este modo la activación de las CDK mitóticas e inhibiendo la entrada a la mitosis. En respuesta al

daño al DNA, la ATM o las proteincinasas ATR (ATM/R) inhiben la Cdc25C vía las proteincinasas Chk1/2. También activan la p53, que induce la producción de la CKI p21. Durante G₁, la vía de puntos de control del daño al DNA inhibe la Cdc25A, inhibiendo las CDK de la fase G₁/S y las CDK de la fase S, bloqueando por lo tanto el ingreso o el paso a través de la fase S. Durante G₂, la ATM/R-Chk1/2 inhibe la Cdc25C. La vía de p53-p21^{CIP} también se activa. Los símbolos rojos indican vías que inhiben la progresión a través del ciclo celular.

pecíficos que ayudan a la célula a lidiar con el daño al DNA. Uno de estos genes codifica la CKI p21 (véase la Fig. 19-34).

En ciertas circunstancias, tales como cuando el daño al DNA es extenso, la p53 también activa la expresión de genes que conducen a la apoptosis, el proceso de la muerte celular programada que normalmente ocurre en células específicas durante el desarrollo de animales multicelulares. En los metazoos, la respuesta de la p53 evolucionó para inducir apoptosis en vistas al daño extenso al DNA, presumiblemente para prevenir la acumulación de múltiples mutaciones que podrían convertir una línea celular normal en células cancerosas. El doble papel de la p53 tanto en la detención del ciclo celular como en la inducción de la apoptosis podría dar cuenta de la observación de que casi todas las células cancerosas tienen mutaciones en ambos alelos del gen *p53*, o en las vías que estabilizan la p53 en respuesta al daño al DNA (véase el Cap. 24). Las consecuencias de las mutaciones en *p53*, *ATM* y *Chk2* proporcionan ejemplos notables de la importancia de la vía del punto de control del ciclo celular para la salud de un organismo multicelular.

La vía del punto de control del ensamblaje del huso evita la segregación de los cromosomas hasta que estos se unen con precisión al huso mitótico

La vía del punto de control del ensamblaje del huso evita la entrada a la anafase hasta que cada cinetocoro de cada cromátida esté adecuadamente unido a los microtúbulos del huso. Aunque un solo cinetocoro esté desprendido o no esté en tensión, la anafase se inhibe. Inicialmente, pistas acerca de cómo opera este punto de control provinieron del aislamiento de mutantes de levaduras, con una respuesta defectuosa a las concentraciones de benomilo despolimerizante de los microtúbulos. Bajas concentraciones de benomilo incrementan el tiempo requerido para que las levaduras ensamblen el huso mitótico y unan los cinetocoros a los microtúbulos. Las células silvestres expuestas al benomilo no inician la anafase hasta que estos procesos se hayan completado; luego, el contrario, las mutantes defectuosas en la vía del punto de control del ensamblaje del huso proceden a través de la anafase antes de que el

proceso se haya completado y de que se complete la unión a los cinetocoros; en consecuencia, segregan inadecuadamente sus cromosomas y producen células hijas anormales que mueren.

Sabemos que las células albergan un mecanismo de vigilancia que evita la entrada en anafase en presencia de cinetocoros no unidos. Los componentes del punto de control de ensamblaje del huso reconocen y unen sitios de unión no ocupados por microtúbulos en los cinetocoros y crean una señal inhibitoria de la anafase (Fig. 19-35a). Una proteína conocida como Mad2 (*mitotic arrest defective 2*, o defectuosa en la detención de la mitosis) es central para la reacción de esta señal inhibitoria. La Mad2 regula la Cdc40, el factor de especificidad requerido para dirigir la CPA/C a la securina. Recuerde que la ubiquitinación de la securina mediada por CPA/C^{Cdc20} y su degradación ulterior son necesarias para la activación de la separasa y la entrada en la anafase (véase la Fig. 19-27). La Mad2 es reclutada a los cinetocoros que no están unidos

a los microtúbulos. La Mad1 parece crítica para este proceso. La Mad2 unida al cinetocoro rápidamente se intercambia con una forma soluble de Mad2, que inhibe todas las Cdc20 de la célula (Fig. 19-35a). Cuando los microtúbulos se unen a los cinetocoros, estos liberan la Mad2 unida y cesan el proceso por el cual se produce la forma inhibitoria, soluble, de la Mad2 (Fig. 19-35b). Sin embargo, cuando incluso un único cinetocoro está desprendido de los microtúbulos, desde el polo opuesto del huso con respecto al de su hermano, se produce suficiente Mad2 inhibitoria soluble en el cinetocoro desprendido como para inhibir toda la Cdc20 de la célula. Este elegante modelo para la vía del punto de control del ensamblaje del huso puede dar cuenta de la capacidad de un cinetocoro individual no unido para inhibir la Cdc20 celular hasta que el cinetocoro se asocie adecuadamente con los microtúbulos del huso.

La entrada a la anafase también se inhibe cuando la unión a los microtúbulos por los cinetocoros es defectuosa. Como vimos en la

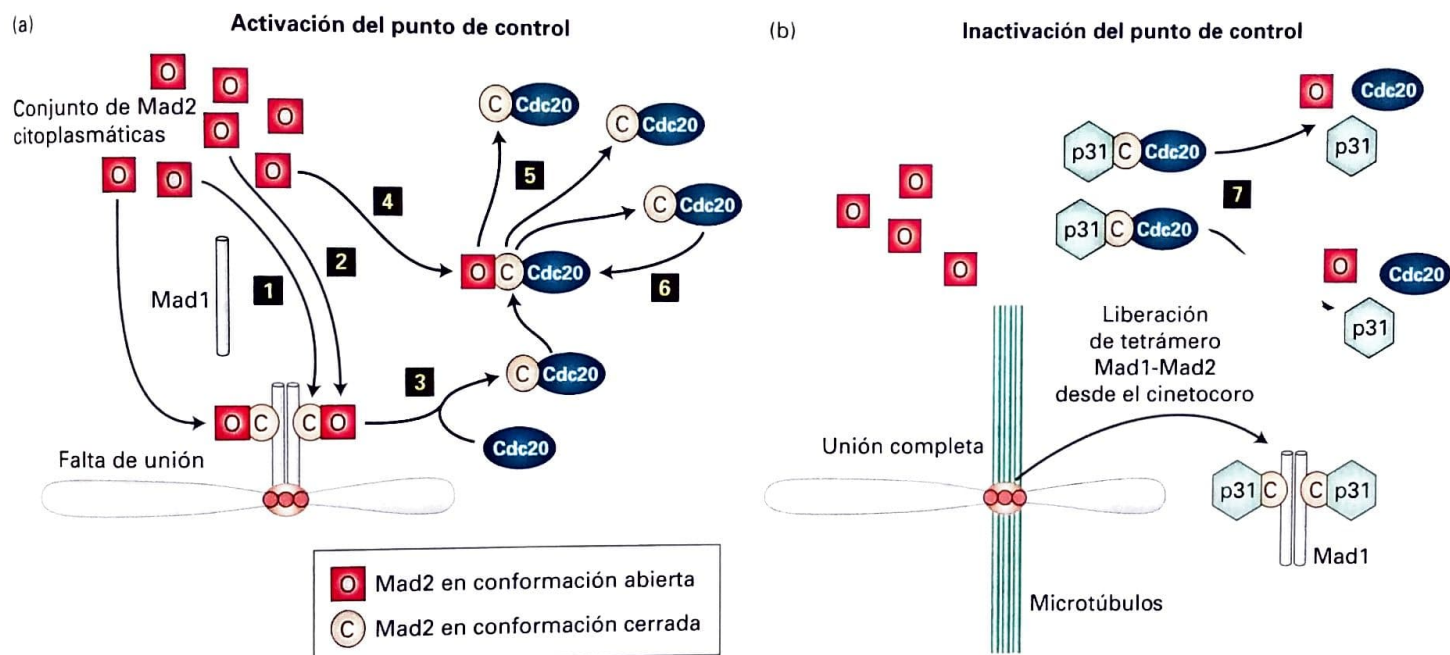


FIGURA 19-35 Vía de puntos de control del ensamblaje del huso. La vía de puntos de control del ensamblaje del huso está activa hasta que cada cinetocoro individual se haya unido adecuadamente a los microtúbulos del huso. (a) La proteína Mad2 existe en dos conformaciones, una "abierta" (cuadrados rojos) y la otra "cerrada" (círculos anaranjados). De acuerdo con el modelo actual, Mad1 y la forma Mad2 cerrada forman un tetrámero que se une a los cinetocoros no unidos a través de la subunidad Mad1 (paso 1). La Mad2 abierta puede unirse transitoriamente a la Mad2 cerrada, unida a Mad1 en el cinetocoro (paso 2). Esta interacción con la Mad2 cerrada estimula a la Mad2 abierta a unirse a Cdc20. La Mad2 abierta puede unirse a la Cdc20 solo mientras esté interactuando con una Mad2 cerrada. Esto convierte a la Mad2 abierta a su conformación cerrada, lo cual provoca que se disocie de la Mad2 cerrada del cinetocoro (paso 3). La interacción estable de la Mad2 cerrada con la Cdc20 evita que la Cdc20 se una al CPA/C. Adicionalmente, la Mad2 cerrada, unida a la Cdc20, puede interactuar transitoriamente con otra Mad2 cerrada, unida a la Cdc20, y provocar que esta se una a otra molécula de Cdc20. Esto convierte a la Mad2 abierta a la conformación cerrada unida a Cdc20. Esta forma recién cerrada de complejo Mad2-Cdc20 se disocia del cinetocoro y genera dos complejos Mad2-Cdc20 (paso 5). Así, primer par Mad2-Cdc20 y genera dos complejos Mad2-Cdc20 (paso 6). La fuente cerrada, unida a Cdc20 a medida que este ciclo se repite (paso 6). La fuente

de la Mad2 cerrada que inicia esta reacción en cadena es la Mad2 cerrada unida a la Mad1 asociada con un cinetocoro, lo cual explica de qué modo el cinetocoro no unido puede provocar la inactivación de toda la Cdc20 de la célula a través de la formación de complejos Mad2-Cdc20 cerrados. ¿De qué manera los cinetocoros no unidos que reclutan complejos Mad1-Mad2 se generan? Ya sea que los microtúbulos fracasen en unirse o la Aurora B corte uniones cinetocoro-microtúbulo que no están en tensión (Fig. 19-25). (b) Silenciamiento de la vía de puntos de control del ensamblaje del huso: la unión de los microtúbulos (verde) a los cinetocoros provoca el desplazamiento del tetrámero Mad1-Mad2. Mad2 en el tetrámero desplazado no puede interactuar con Mad2 abierta, pero en lugar de ello se une a p31^{comet}. La p31^{comet} siempre está activa, desensambla los complejos Mad2-Cdc20 y libera Cdc20 activa (paso 7). Sin embargo, una pequeña cantidad de tetrámeros Mad1-Mad2 unida a cinetocoros puede generar suficientes complejos Mad2-Cdc20 por el mecanismo que se muestra en (a) para superar la actividad de p31. Una vez que todos los cinetocoros se han unido a los microtúbulos, provocando la liberación de todos los tetrámeros Mad1-Mad2, la actividad de p31 predomina y libera Cdc20 activa que se une al CPA/C, lo cual da como resultado la ubiquitinación y la degradación proteasómica de la securina y el inicio de la anafase. (Modificado de A. De Antoni y cols., 2005, *Curr. Biol.* 15:214.)

Según 19.5, los cinetocoros de las cromátidas hermanas con frecuencia se unen a los microtúbulos que emanan del mismo polo (unión sintética), o un único cinetocoro se une a microtúbulos que se originan de dos polos distintos (unión merotética). Estas uniones defectuosas resultan en una tensión insuficiente o en ausencia de tensión en cinetocoros hermanos, y estas interacciones microtúbulo-cinetocoro se desestabilizan rápidamente por la fosforilación de Aurora B, de las proteínas que unen microtúbulos en el cinetocoro. Esto conduce a la generación de cinetocoros no unidos, que son reconocidos en el punto del control del ensamblaje del huso. De este modo, la Aurora B y el punto del control del ensamblaje del huso colaboran durante cada ciclo celular para la unión precisa de cada par individual de cromátidas hermanas sobre el huso mitótico de modo correcto, biorientado.

La vía de puntos de control del ensamblaje del huso es esencial para la viabilidad en ratones, lo que subraya la importancia de esta vía de control de calidad durante cada división celular. Si la anafase se inicia antes de que ambos cinetocoros de un cromosoma replicado se unan a los microtúbulos de polos del huso opuesto, se producen células hijas que tienen cromosomas ausentes o adicionales, un resultado llamado *no disyunción*. Cuando ocurre la no disyunción en las células mitóticas, esto puede conducir a la regulación alterada de los genes y contribuir al desarrollo del cáncer. Cuando se produce no disyunción durante la división meiótica que genera un óvulo o un espermatozoide humano, puede producirse la trisomía de cualquier cromosoma. El síndrome de Down es generado por la trisomía del cromosoma 21, lo que da como resultado anomalías del desarrollo y retardo mental. Cualquier otra trisomía resulta en letalidad embrionaria o muerte poco después del nacimiento.

La vía del punto de control de la posición del huso asegura que el núcleo se reparta adecuadamente entre las dos células hijas

La coordinación del sitio de la división nuclear con el de la citocinesis es esencial para la producción de dos células hijas idénticas. Si la citocinesis ocurriera de modo tal que cada célula hija fallara en recibir un complemento genético completo, ocurriría la pérdida o ganancia de cromosomas. En muchos sistemas, se han descrito los mecanismos de vigilancia que aseguran que la citocinesis no ocurra cuando el huso mitótico no se ubica correctamente en la célula. Este mecanismo de vigilancia, conocido como la **vía del punto de control de la posición del huso**, se comprende mejor en la levadura en gemación. En esta levadura, el sitio de formación del brote, y por lo tanto el sitio de la citocinesis, se determina durante la G_1 . Así, el eje de la división queda definido antes de la mitosis y el huso mitótico debe alinearse a lo largo de este eje madre-brote en cada división celular (Fig. 19-36, paso 1). Cuando este proceso falla, el punto del control de la posición del huso evita la inactivación de las CDK mitóticas, lo que da a la célula una oportunidad de reubicar el huso antes del desensamblaje de este y de la citocinesis (Fig. 17-36, paso 2). Si el punto del control de la posición del huso falla, las células que ubican inadecuadamente sus husos dan origen a productos mitóticos con demasiados núcleos o con muy pocos (Fig. 17-36, paso 3).

Recuérdese que, en la levadura en gemación, un conjunto de ciclinas mitóticas están protegidas de la degradación por la CPA/ C^{dc20} para facilitar el en ocasiones difícil proceso de alineación del huso

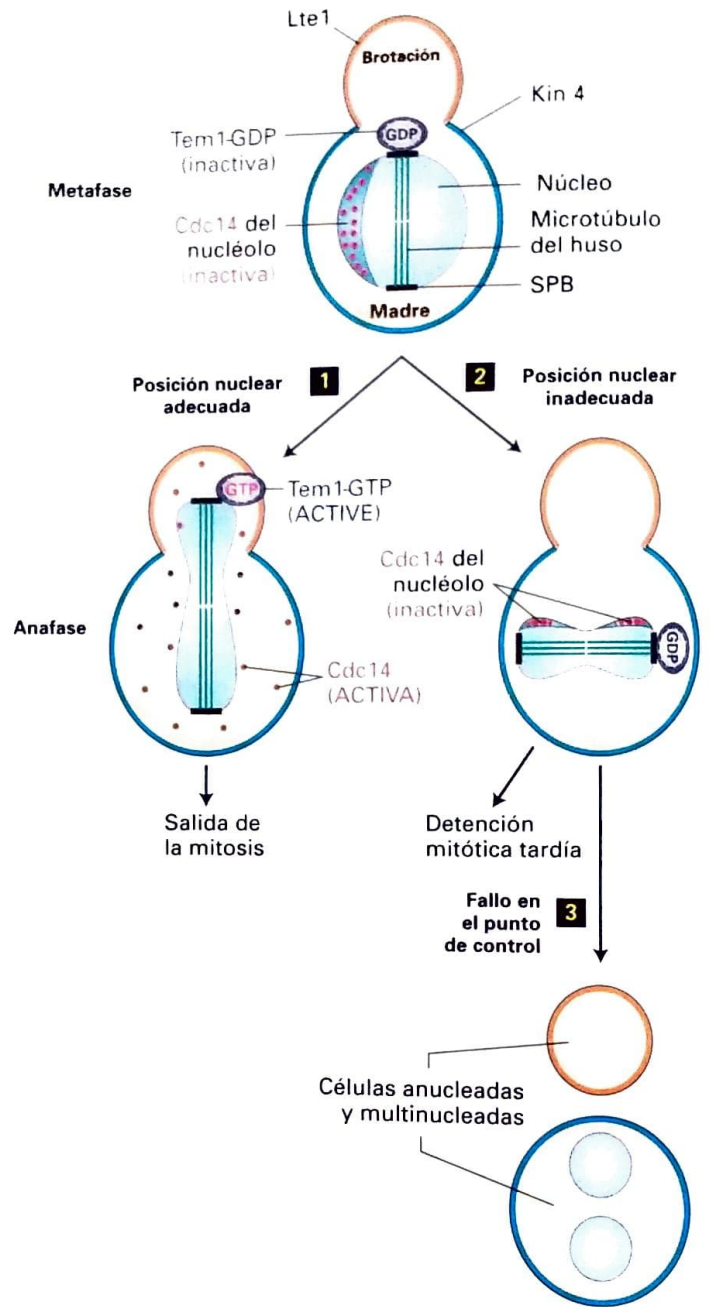


FIGURA 19-36 Puntos de control de la posición de huso en la levadura en gemación. Actividad de la fosfatasa Cdc14 necesaria para la salida de la mitosis. Arriba: en *S. cerevisiae*, durante la interfase y la mitosis temprana, Cdc14 (puntos rojos) es secuestrada e inactivada en el nucleólo. El Tem1-GDP (inactivo) se asocia con el cuerpo polar del huso (SPB) más cercano al brote tan pronto como se forma el huso mitótico. Si la segregación de los cromosomas ocurre de modo adecuado (paso 1), la extensión de los microtúbulos del huso inserta el SPB hijo en el brote, lo que hace que el Tem1 se active por un mecanismo desconocido. El Tem1-GTP activa una cascada de proteincinasas que, a su vez, promueve la liberación de la Cdc14 activa desde el nucleólo y la salida de la mitosis. Si el aparato mitótico fracasa en ubicar el SPB hijo en el brote (paso 2), la Kin4 (azul), un inhibidor de la Tem1, se recluta desde la corteza de la célula madre al SPB localizado en la célula madre y mantiene la Tem1 en el GDP unido y la salida mitótica no se produce. La Lte1 (naranja) es un inhibidor de la Kin4 y está localizada en el punto de control falla (paso 3), las células que se va al brote inhiba la Tem1. Si salen de modo inadecuado de la mitosis y producen células anucleadas y multinucleadas.

mitótico, de modo tal que la mitad del núcleo queda estrangulado a través de un delgado cuello durante la elongación del huso en la anafase. Recuerde además que la inactivación de este conjunto de complejos ciclinas-CDK durante la mitosis es desencadenada por la proteinofosfatasa Cdc14, que a su vez es activada por una vía de transducción de las señales conocida como *red de salida de mitosis* (véase la Fig. 19-28). La red de salida de mitosis está controlada por una pequeña GTPasa (monomérica) llamada *Tem1*. Este miembro de la **superfamilia de las GTPasas** de proteínas interruptoras controla la actividad de una cascada de proteincinasas, de modo semejante a la manera en que la Ras controla las vías de las MAP cinasas (véase Cap. 16). La *Tem1* se asocia con los cuerpos polares del huso (CPH) a medida que se forman. Un inhibidor de la GTPasa llamado Kin4 se localiza en la célula madre, pero está ausente en el brote (véase la Fig. 19-36). Un inhibidor de la Kin4 llamado Lte1 se localiza en el brote pero está ausente en la célula madre e inhibe cualquier Kin4 residual que se marche al brote. Cuando la elongación de los microtúbulos del huso hacia el final de anafase ha ubicado correctamente los cromosomas hijos segregados en el brote, la inhibición de *Tem1* por Kin4 se libera. En consecuencia, *Tem1* se convierte a su estado activo unido a GTP y activa la cascada de señalización de proteincinasa. La cinasa terminal en la cascada fosforila entonces al ancla nucleolar que une e inhibe a la Cdc14, liberando la **fosfatasa Cdc14** al citoplasma y al nucleoplasma, tanto en el brote como en la célula madre (véase la Fig. 19-36, paso 1). Una vez que está disponible la Cdc14 activa, las CDK mitóticas se inactivan y las células salen de mitosis. Cuando el huso falla en ubicarse correctamente, el cuerpo polar del huso que lleva al *Tem1* no entra al brote y la red de salida de mitosis no se activa. Las células se detienen en la anafase. Así, los inhibidores de la restricción espacial y los activadores de una vía de transducción de la señal permiten a la célula detectar una señal espacial, la posición del huso, y la traducen a su regulación de una vía de transducción de la señal.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 19.7

Mecanismos de vigilancia en la regulación del ciclo celular

- Los mecanismos de vigilancia, conocidos como vías del punto de control, establecen dependencias entre los eventos del ciclo celular y aseguran que la progresión del ciclo no ocurra antes de la terminación de un evento precedente.
- Las vías del punto de control consisten en sensores que detectan un evento celular particular o un defecto, una vía de señalización y un efector que detiene la progresión del ciclo celular y activa las vías de reparación cuando sea necesario.
- El crecimiento y la división celular se integran durante G₁ en la mayoría de los sistemas. La biosíntesis de macromoléculas disminuida retarda la entrada en el ciclo celular.
- Las células son capaces de detectar y responder a una amplia variedad de daño al DNA, y la respuesta difiere dependiendo de la etapa del ciclo celular en el que las células se encuentren.
- En respuesta al daño al DNA, dos proteincinasas relacionadas, la ATM y la ATR, son reclutadas al sitio del daño, donde activan vías de

señalización que conducen a la detención del ciclo celular, la reparación y, en algunas circunstancias, la apoptosis.

- Las vías del punto de control del ensamblaje, que evitan la iniciación prematura de anafase, emplean la Mad2 y otras proteínas para regular el factor de especificidad de CPA/C^{Cdc20} que se direcciona a la securina y las ciclinas mitóticas para la ubiquitinación.
- La vía de puntos de control de la posición del huso evita la inactivación por CDK mitótica cuando el huso está mal ubicado. En esta vía, activadores localizados e inhibidores y un sensor se disparan entre ellas, lo cual permite que las células detecten la posición del huso.

19.8 Meiosis: un tipo especial de división celular

En casi todos los eucariontes diploides, la **meiosis** genera células terminales haploides (óvulos y espermatozoides) que luego pueden fusionarse con una célula germinal de otro individuo para generar un cigoto diploide que desarrolla un nuevo individuo. La meiosis es un aspecto fundamental de la biología y la evolución de todos los eucariontes, porque da como resultado la reasignación de los conjuntos cromosómicos que recibe un individuo de sus dos padres. Ambos, la combinación de los cromosomas y la **recombinación homóloga** entre las moléculas parentales de DNA durante la meiosis, garantizan que cada célula germinal haploide generada recibirá una combinación única de genes alelos que es diferente de la de cada padre, así como también de toda otra célula germinal haploide formada.

Los mecanismos de la meiosis son análogos a los de la mitosis. Sin embargo, varias diferencias clave de la meiosis permiten que este proceso genere células haploides con diversidad genética (véase la Fig. 5-3). En la mitosis, cada fase S es seguida por la segregación cromosómica y la división celular. Por el contrario, durante la meiosis una ronda de replicación del DNA es seguida por *dos fases de segregación cromosómica consecutivas*. Esto conduce a la formación de células hijas haploides en lugar de células hijas diploides. Durante las dos divisiones, los cromosomas maternos y paternos se mezclan y se dividen de modo tal que las células hijas son diferentes en su constitución genética de la célula parental. En esta sección, analizaremos las similitudes entre la mitosis y la meiosis, como así los mecanismos específicos de esta última que transforman la maquinaria del ciclo celular mitótico, de modo tal que provoca una división celular inusual que conduce a la formación de células hijas haploides.

Pistas intracelulares y extracelulares regulan la entrada a la meiosis

Las señales que desencadenan la entrada a las divisiones meióticas en los metazoos son un área muy activa de investigación y aún se desconocen muchos aspectos. Sin embargo, los mismos principios básicos gobiernan la decisión de entrar al programa meiótico en todos los organismos donde esto se ha estudiado. Hay señales extracelulares que inducen un programa de transcripción que produce factores específicos del ciclo celular relacionados con la meiosis, los cuales provocan las inusuales divisiones celulares meióticas. Esta modificación del ciclo celular va mano a mano con un programa de

desarrollo que induce las características de los gametos, tales como el desarrollo de un flagelo en el espermatozoide o la producción de una pared celular resistente al estrés durante la formación de esporas en los hongos. Al menos una de las señales extracelulares que inducen la entrada a las divisiones meióticas en los mamíferos es el ácido retinoico, una hormona esteroide que opera en diferentes procesos del desarrollo. Las dianas celulares de esta hormona y el modo en que opera para especificar el destino meiótico aún no se han descubierto.

Los mecanismos moleculares subyacentes a la decisión de entrar en las divisiones meióticas son bien conocidos en *S. cerevisiae*. Esta decisión se realiza en la G_1 . La carencia de fuentes de nitrógeno y carbono induce a las células diploides a ingresar a la meiosis en lu-

gar de a la mitosis, lo que da lugar a esporas haploides (véase la Fig. 1-17). Durante las divisiones meióticas, la gemación es reprimida y la fase S premeiótica y las dos divisiones meióticas ocurren dentro de los confines de la célula madre. Luego, se producen las paredes de las esporas alrededor de los cuatro productos meióticos. Recuerde que la gemación y el inicio de la replicación del DNA son inducidos por las CDK de la fase G_1/S . Se requiere inhibir su expresión para evitar la gemación. La privación de nutrientes reprime la expresión de las ciclinas en la fase de la G_1/S , inhibiendo la gemación. Sin embargo, la replicación del DNA también depende de las CDK de la fase G_1/S . ¿De qué manera puede ocurrir la replicación premeiótica del DNA en ausencia de las CDK de la fase G_1/S ? La esporulación-proteína *Ime2* específica asume el papel de las CDK de fase G_1/S en tanto la

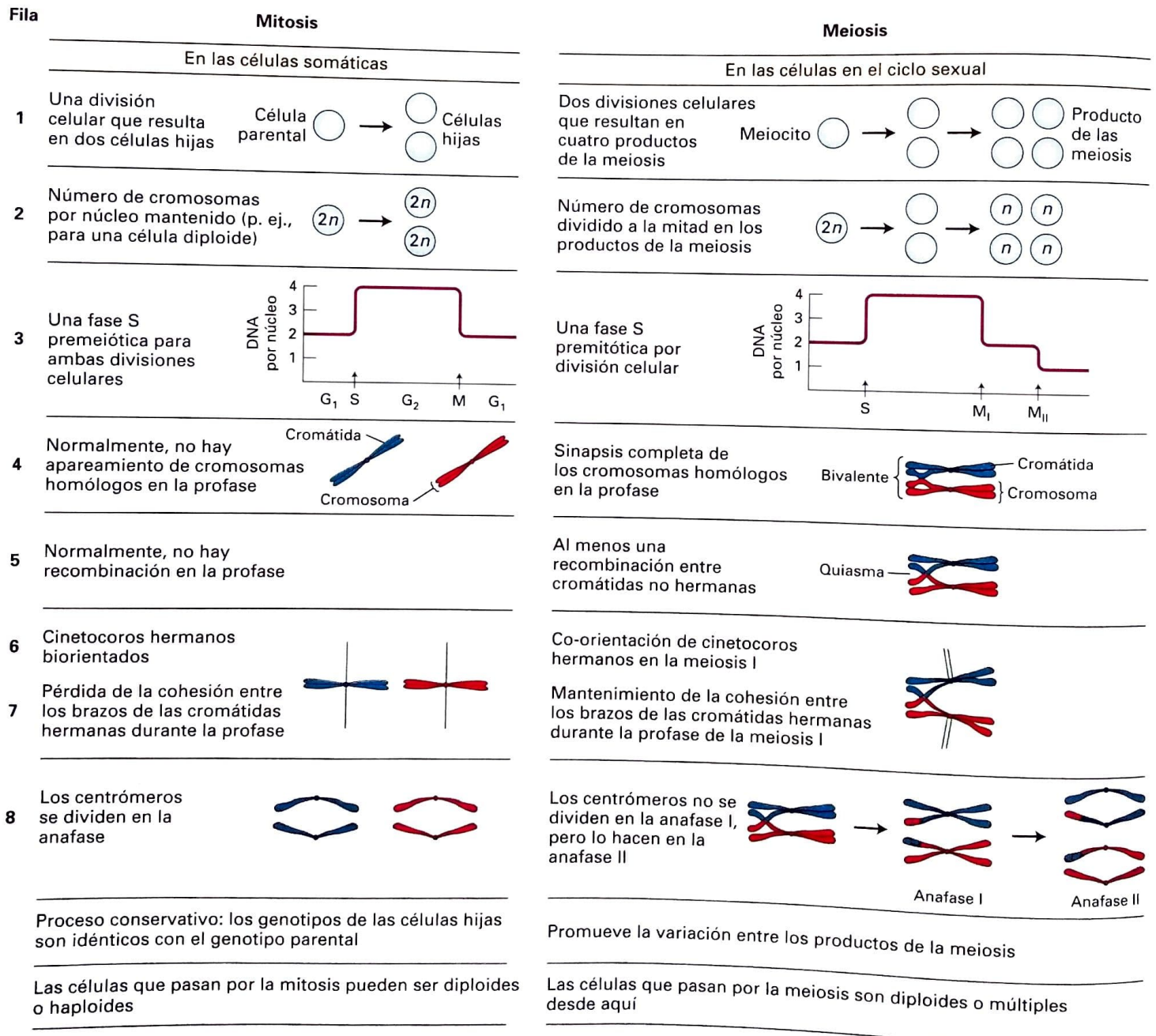


FIGURA 19-37 Comparación de los principales tipos de mitosis y meiosis. (Adaptado de A. J. F. Griffiths y cols., 1999, *Modern Genetic Analysis*, W. H. Freeman y compañía.)

promoción de la replicación del DNA. La Ime2 promueve 1) la fosforilación del factor de especificidad Cdh1 del CPA/C y lo inactiva de modo tal que puedan acumularse las ciclinas de la fase S y la fase M; 2) la fosforilación de factores de transcripción para inducir los genes requeridos para la fase S, incluyendo las DNA polimerasas y las ciclinas de la fase S; y 3) la fosforilación del inhibidor Sic1 de la CDK de la fase S, lo cual conduce a la liberación de las CDK activas de la fase S y al inicio de la replicación premeiótica del DNA.

Varios factores clave distinguen la meiosis de la mitosis

Las divisiones meióticas difieren de las mitóticas en varios aspectos fundamentales. Estos se resumen en la Figura 19-37. Durante la meiosis, un único ciclo de replicación del DNA es seguido por dos ciclos de división celular, llamados *meiosis I* y *meiosis II* (Fig. 19-38). La meiosis II se asemeja a la mitosis en que las cromátidas hermanas se segregan. Sin embargo, la meiosis I es muy diferente. Durante esta división, los cromosomas homólogos (los cromosomas heredados de la madre y el mismo cromosoma heredado del padre) se segregan. Esta segregación inusual requiere tres modificaciones específicas de la meiosis a la maquinaria de segregación de cromosomas. A continuación analizaremos esto y explicaremos por qué son necesarias.

El mecanismo de detección basado en la tensión, responsable de unir con precisión los cromosomas al huso durante la mitosis, también es responsable de segregar los cromosomas durante la meiosis I. Así, los cromosomas homólogos deben estar unidos de modo tal que pueda operar el mecanismo basado en la tensión de la unión precisa al huso. La **recombinación homóloga** entre los cromosomas homólogos crea estas uniones (véase la Fig. 19-38). Los mecanismos moleculares de recombinación homóloga se analizan en detalle en el Capítulo 4. Aquí restringiremos nuestro debate a la importancia de la recombinación homóloga para las divisiones meióticas exitosas.

En la G_2 y en la profase de la meiosis I, las dos cromátidas hermanas replicadas de cada cromosoma se asocian entre sí por complejos de cohesina a lo largo de toda la extensión de los brazos de los cromosomas, al igual que lo hacen después de la replicación del DNA en el ciclo celular mitótico (véase la Fig. 19-38). En la profase de la meiosis I, los cromosomas homólogos (es decir, el cromosoma materno y paterno 1, el cromosoma materno y paterno 2, etc.) se aparean entre sí y sufren recombinación homóloga. Significativamente, al menos un evento de recombinación ocurre entre un cromosoma materno y uno paterno. El **entrecruzamiento** de cromátidas producido por recombinación puede observarse al microscopio en la primera profase meiótica y en la metafase, en estructuras denominadas *quiasmas*. Por el contrario, no hay apareamiento entre cromosomas homólogos durante la mitosis, y la recombinación entre cromátidas no hermanas es rara. Concomitante con la recombinación homóloga, los cromosomas homólogos se asocian entre sí en un proceso llamado *sinapsis*. En la mayoría de los organismos, esta sinapsis está mediada por un complejo proteináceo conocido como **complejo sinaptonémico (SC)**. Los cromosomas homólogos vinculados a través del quiasma son llamados bivalentes (véase la Fig. 19-38). Ahora el quiasma proporciona resistencia a la fuerza de tracción ejercida por los microtúbulos sobre el huso de metafase I (Fig. 19-39).

La recombinación entre cromátidas no hermanas que ocurre en la profase de la meiosis I tiene al menos dos consecuencias funciona-

les: en primer lugar, mantiene a los cromosomas homólogos juntos durante la metafase de la meiosis I. En segundo lugar, contribuye a la diversidad genética entre los individuos de una especie, lo que asegura que haya nuevas combinaciones de genes alelos en diferentes individuos. (Nota: la diversidad genética surge primariamente de la combinación independiente de homólogos maternos y paternos durante las divisiones meióticas). Los homólogos conectados a través de al menos un quiasma que se formó durante la profase de la meiosis I ahora deben alinearse en el huso de la meiosis I, de modo tal que los cromosomas maternos y paternos se segreguen durante la anafase de la meiosis I. Esto requiere que los cinetocoros de las cromátidas hermanas se unan a fibras del huso que emanen del *mismo* polo del huso y no de polos del huso opuestos, como ocurre en la mitosis (véase la Fig. 19-39). Se dice que las cromátidas hermanas están **co-orientadas**. Sin embargo, los cinetocoros de los cromosomas maternos y paternos de cada unión bivalente a los microtúbulos del huso de polos del huso opuestos; ellos están **biorientados**.

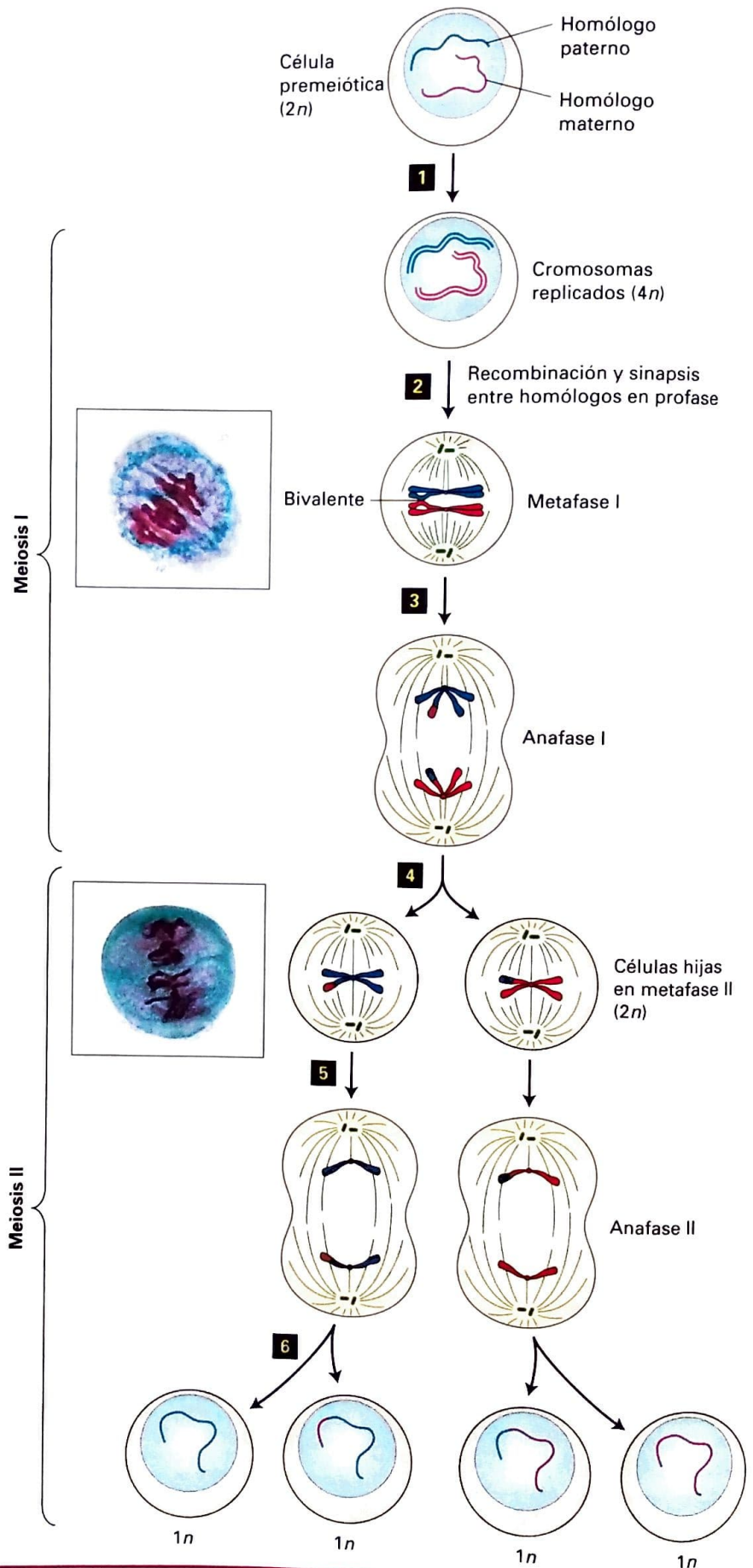
Finalmente, para facilitar dos fases de segregación consecutiva de los cromosomas, las cohesinas tienen que desaparecer de los cromosomas de modo gradual. Recuerde que durante la mitosis todas las cohesinas se pierden al inicio de la anafase (Fig. 19-40a). Por el contrario, durante la meiosis, las cohesinas se pierden de los brazos de los cromosomas hacia el final de la meiosis I, pero un grupo de cohesinas alrededor de los cinetocoros están protegidas de la eliminación (Fig. 19-40b). Este conjunto de cohesinas permanece durante toda la meiosis I, pero es eliminado al inicio de la anafase II. Como veremos luego, la pérdida de las cohesinas desde los brazos de los cromosomas es necesaria para que los cromosomas homólogos se segreguen unos de otros durante la meiosis I.

Los mecanismos que remueven las cohesinas durante la meiosis son los mismos que durante la mitosis. La degradación de la securina libera la separasa, que luego escinde las cohesinas que mantienen los brazos de los cromosomas juntos. Esto permite que los cromosomas recombinados materno y paterno se separen, pero cada par de cromátidas permanece asociada en el centrosoma. Durante la metafase II, las cromátidas hermanas se alinean sobre el huso de metafase II, y la separasa se activa nuevamente y escinde la cohesina residual que se encuentra alrededor de los centrosomas, con lo cual se facilita la anafase II (véase la Fig. 19-40b).

La recombinación y una subunidad de cohesina específica de la meiosis son necesarias para la segregación especializada de cromosomas en la meiosis I

Como se analizó previamente, en la metafase de la meiosis I ambas cromátidas hermanas en un cromosoma (replicado) se asocian con los microtúbulos que surgen del *mismo* polo del huso en lugar de hacerlo con las que surgen de polos opuestos, como ocurre en la mitosis (véase la Fig. 19-39). Dos enlaces físicos entre cromosomas homólogos resisten la fuerza de tracción en el huso hasta la anafase: (a) el entrecruzamiento entre las cromátidas, una de cada par de cromosomas homólogos, y (b) las cohesinas distales al punto de entrecruzamiento (véase la Fig. 19-40b, *arriba*). La evidencia para la función de la recombinación durante la meiosis proviene de la observación de que cuando la recombinación está bloqueada por mutaciones en proteínas esenciales para el proceso, los cromosomas se segregan al

FIGURA 19-38 Meiosis. Las células premeióticas tienen dos copias de cada cromosoma ($2n$), una derivada del padre y otra de la madre. Por simplicidad, los homólogos materno y paterno de un solo cromosoma aparecen en el diagrama. Paso 1: todos los cromosomas se replican durante la fase S antes de la primera división meiótica y dan un complemento cromosómico $4n$. Los complejos de cohesina (que no se muestran) vinculan las cromátidas hermanas que componen cada cromosoma replicado a lo largo de su longitud completa. Paso 2: a medida que los cromosomas se condensan durante la primera profase meiótica, los homólogos replicados se aparean y sufren recombinación homóloga, lo que lleva al menos a un evento de entrecruzamiento. En la metafase que se muestra aquí, ambas cromátidas de un cromosoma se asocian con los microtúbulos que emanan de un polo del huso, pero cada miembro de un par de cromosomas homólogos se asocia con los microtúbulos que emanan de polos opuestos. Paso 3: durante la anafase de la meiosis I, los cromosomas homólogos, cada uno formado por dos cromátidas, son traccionados a los polos opuestos del huso. Paso 4: la citocinesis da dos células hijas (ahora $2n$) que ingresan a la meiosis II sin replicación del DNA. En la metafase de la meiosis II que se muestra aquí, las cromátidas hermanas se asocian con microtúbulos del huso de polos opuestos del huso, como ocurre en la mitosis. Pasos 5 y 6: la segregación de las cromátidas hermanas a polos opuestos del huso durante la segunda anafase meiótica seguida de la citocinesis genera gametos haploides ($1n$) que contienen una copia de cada cromosoma. Las fotomicrografías de la izquierda muestran la metafase I y la metafase II en gametos en desarrollo de óvulos de *Lilium* (lirio). Los cromosomas están alineados en la placa metafásica. (Fotos cortesía de Ed RESchke/Peter Arnold, Inc.)



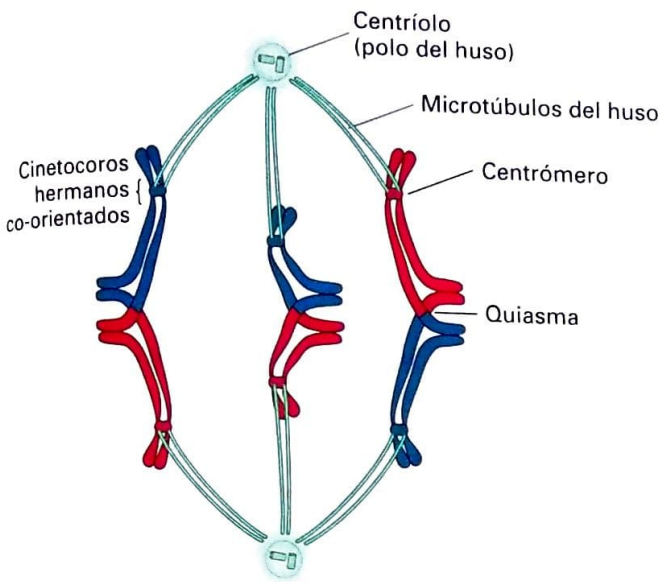


FIGURA 19-39 Quiasma y cohesinas distales a él vinculan cromosomas homólogos en metafase de meiosis I. Las conexiones entre los cromosomas durante meiosis I se ven con más facilidad en los organismos con centrómeros acrocéntricos como el saltamontes. Los cinetocoros en los centrómeros de las cromátidas hermanas se unen a los microtúbulos del huso, que emanan del mismo polo del huso, con los cinetocoros de los cromosomas materno (rojo) y paterno (azul) unidos a los microtúbulos del huso de polos opuestos de este. Los cromosomas maternos y paternos están unidos en el quiasma, formado por recombinación y cohesión entre los brazos de las cromátidas hermanas que persisten a través de metafase de meiosis I. Nótese que la eliminación de la cohesión entre los brazos de las cromátidas hermanas es todo lo que se requiere para que los cromosomas homólogos se separen en la anafase. (Adaptado de L. V. Palulis y R. B. Nicklas, 2000, *J. Cell Biol.* 150:1223.)

azar durante la meiosis I; esto es, los cromosomas homólogos no necesariamente se segregan a polos opuestos del huso.

Al inicio de la anafase meiótica I, las cohesinas entre los brazos de los cromosomas son escindidas por la separasa. Esta escisión es necesaria para que los cromosomas homólogos se segreguen. Si las cohesinas no se perdieran de los brazos de los cromosomas, las cromátidas hermanas recombinadas se romperían durante la anafase I. El mantenimiento de la cohesión centromérica durante meiosis I es necesario para la segregación adecuada de las cromátidas hermanas durante meiosis II.

Estudios hechos en muchos organismos han mostrado que una subunidad especial de las cohesinas, la *Rec8*, es necesaria para la pérdida gradual de las cohesinas desde los cromosomas durante meiosis. Expresada solo durante meiosis, la *Rec8* es homóloga a la *Scc1*, la subunidad de la cohesina que cierra el anillo de las cohesinas en el complejo de esta proteína de las células en mitosis. Experimentos de inmunolocalización revelaron que durante la anafase temprana de meiosis I, la *Rec8* se pierde de los brazos cromosómicos pero se retiene en los centrómeros. Sin embargo, durante la anafase temprana de meiosis II, la *Rec8* centromérica es escindida por la separasa, de modo tal que las cromátidas hermanas pueden segregarse, como lo hacen en mitosis (véase la Fig. 19-40, abajo). En consecuencia, comprender la regulación de la escisión del complejo *Rec8*-cohesina es central para entender la segregación cromosómica en la meiosis I.

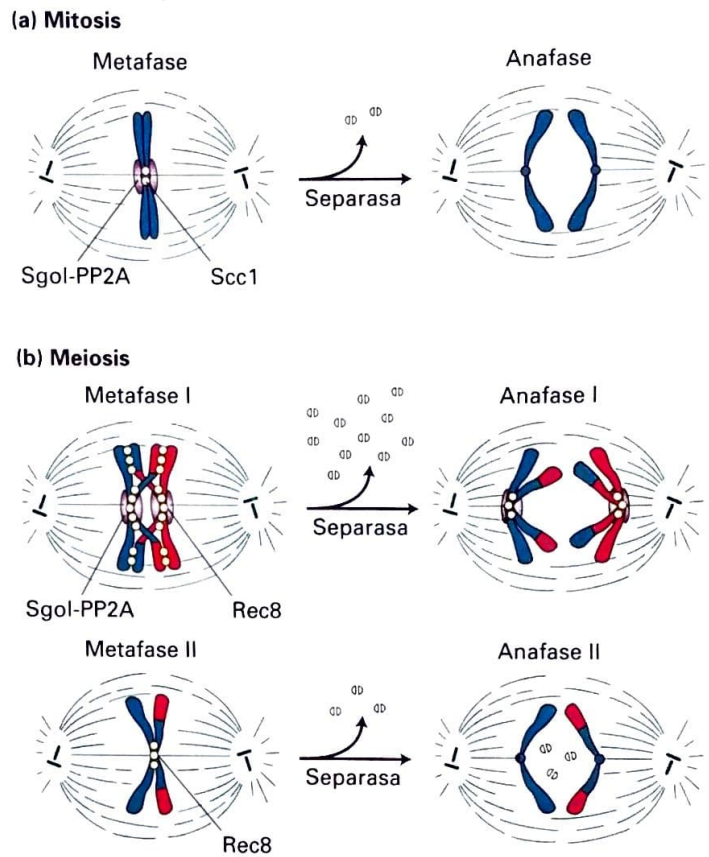


FIGURA 19-40 Función de la cohesina durante la mitosis y la meiosis.

(a) Durante la mitosis, las cromátidas hermanas generadas por la replicación de DNA en la fase S están inicialmente vinculadas por complejos de cohesina a lo largo de la longitud de las cromátidas. Durante la condensación de los cromosomas, los complejos de cohesina (amarillo) quedan restringidos a la región del centrómero en metafase. Mei-S332/Sgo1 (púrpura) recluta PP2A a los centrómeros, donde antagonizan la cinasa Polo y la Aurora B y evitan la disociación de las cohesinas desde la región centromérica. La disociación de Mei-S332/Sgo1 desde los centrómeros y la activación de la separasa conducen a la eliminación de las cohesinas en el centrómero. Las cromátidas hermanas ahora se separan, lo que marca el inicio de la anafase. (b) En la profase de la meiosis I, las cromátidas materna y paterna establecen vínculos entre sí por recombinación homóloga. Hacia la metafase I, las cromátidas de cada cromosoma replicado se entrecruzan por complejos de cohesina a lo largo de su extensión completa. La *Rec8*, un homólogo específico de meiosis de la *Scc1*, se escinde a lo largo de los brazos de los cromosomas pero no alrededor del centrómero, lo cual permite que los pares de cromosomas homólogos se segreguen a las células hijas. La *Rec8* centromérica está protegida de escisión por la PP2A reclutada a las regiones centroméricas por el regulador de la PP2A Mei-S332/Sgo1 (que se muestra en púrpura). Hacia metafase II, el complejo Mei-S332/Sgo1-PP2A se disocia desde los cromosomas. Las cohesinas ahora pueden escindirse durante la meiosis II y permitir así que las cromátidas hermanas se segreguen. (Modificado de F. Uhlmann, 2001, *Curr. Opin. Cell Biol.* 13:75A.)

El mecanismo que protege la *Rec8* de la escisión en los centrómeros durante meiosis I es semejante al mecanismo que protege la *Scc1* en los centrómeros durante mitosis. Recuerde que durante la profase mitótica las proteincinasas, entre las cuales resulta clave la Polo cinasa, fosforilan las cohesinas de los brazos de las cromátidas, hacen que se disocien y eliminan la cohesión en los brazos de las cromátidas hacia la metafase. Sin embargo, la cohesión en los centrómeros se mantiene por una isoforma específica de la proteinfosfatasa

2A (PP2A) localizada en la cromatina centromérica por miembros de una familia de proteínas conocidas como las Mei-S332/Shugoshina. La PP2A mantiene a la cohesina en estado fosforilado que no se disocia de la cromatina (véase la Fig. 19-40a). Durante la metafase II, la Mei-S332/Sgo1 se disocia de los cromosomas. Además, cuando el último cinetocoro se asocia adecuadamente con los microtúbulos del huso, la Cdc20 se desreprime y se asocia con la CPA/C, lo que provoca la ubiquitinación de la securina. Esto libera la actividad de la separasa, que escinde la Scc1, se fosforile o no, elimina así la cohesión en el centrómero y permite la separación de las cromátidas en la anafase (véase la Fig. 19-40a).

La eliminación de la cohesina difiere de meiosis I porque cuando la Rec8 reemplaza a Scc1 en el complejo de la cohesina, este no se disocia en la profase cuando se fosforila. El complejo de cohesina meiótica solo puede ser retirado de la cromatina por acción de la separasa. El Rec8 también difiere de la Scc1 en que debe fosforilarse, por acción de varias proteincinasas, para ser escindido por la separasa. Durante la meiosis I, la isoforma de la PP2A, específica del centrómero, dirigida a la cromatina centromérica por la Mei-S332/Shugoshina, evita su fosforilación. El factor de direccionamiento PP2A y el PP2A luego se disocian de los cromosomas hacia la metafase II, lo cual permite que la separasa se escinda de Rec8.

La co-orientación de los cinetocoros hermanos es crítica para la segregación de los cromosomas en la meiosis I

Como analizamos previamente en mitosis y meiosis II, los cinetocoros hermanos se unen a los microtúbulos del huso que emanan de polos del huso *opuestos*; se dice que los cinetocoros están *biorientados*. Esto es esencial para la segregación de las cromátidas hermanas a diferentes células hijas. Por el contrario, en la metafase de meiosis I, los cinetocoros hermanos se unen a microtúbulos del huso que emanan del *mismo* polo del huso; se dice que los cinetocoros hermanos están *co-orientados* (véase la Fig. 19-39). Obviamente, la unión de los cinetocoros hermanos a los microtúbulos adecuados en meiosis I y II es crítica para la segregación meiótica correcta de los cromosomas.

Las proteínas necesarias para la co-orientación de los cinetocoros hermanos en meiosis I fueron descritas inicialmente para *S. cerevisiae*. Sabemos ahora que un complejo conocido como **complejo de la monopolina** se asocia con los cinetocoros durante meiosis I y vincula a los cinetocoros hermanos para favorecer la unión a los microtúbulos que emanan del mismo polo del huso. En organismos en los cuales los cinetocoros se unen a múltiples microtúbulos, las cohesinas que contienen Rec8 son esenciales para la co-orientación de los cinetocoros hermanos. Estas cohesinas específicas de meiosis imponen una estructura de cinetocoro rígida, que restringe el movimiento de los cinetocoros hermanos y favorece, por lo tanto, la unión a los microtúbulos provenientes del mismo polo del huso.

Al igual que ocurre con mitosis y meiosis II, la adecuada unión a los cromosomas en meiosis I está mediada por un mecanismo que se basa en la tensión. Durante la metafase I meiótica, los microtúbulos asociados al cinetocoro también se encuentran en tensión (aunque los cinetocoros co-orientados de cromátidas hermanas se unen a los microtúbulos que provienen del mismo polo del huso) porque los quiasmas generados por recombinación entre cromosomas homólogos y las cohesinas distales al quiasma evitan que sean traccionados

a los polos (véase la Fig. 19-39). Dado que las uniones cinetocoro-microtúbulo son inestables en ausencia de tensión (debido a la fosforilación mediada por la Aurora B), los cinetocoros que se unen a las fibras del huso erróneas liberan los microtúbulos incorrectos y les permiten unirse a los microtúbulos nuevamente hasta que se formen uniones que generen tensión. Como en la mitosis, una vez que se ha generado tensión, la unión de los microtúbulos a los cinetocoros se estabiliza.

La replicación del DNA se inhibe entre las dos divisiones meióticas

El mecanismo por el cual la replicación del DNA se suprime entre la meiosis I y II es en la actualidad un área de investigación activa, pero se cree que un cambio en la regulación de la actividad de las CDK es al menos responsable parcialmente de esta supresión. Las mismas CDK de la fase S que promueven la replicación del DNA previa a la mitosis se requieren para la replicación premeiótica del DNA. Las mismas CDK mitóticas que promueven la mitosis también promueven las divisiones meióticas, excepto que ahora llamamos a las CDK mitóticas CDK meióticas, dado que promueven las divisiones meióticas y no la mitosis.

Entonces, ¿de qué manera se evita la replicación del DNA entre las dos divisiones meióticas? Después de la anafase de meiosis I, la actividad CDK meiótica no cae tan bajo como lo hace después de anafase mitótica. Se piensa que esta caída parcial en la actividad de las CDK es suficiente para promover el desensamblaje del huso de la meiosis I, pero insuficiente para promover la carga de la helicasa MCM (recuerde el estado de ninguna o baja actividad de CDK necesario para cargar las helicasas MCM). Durante la profase de meiosis II, la actividad de las CDK meióticas se eleva nuevamente y se forma el huso de meiosis II. Después de que todos los cinetocoros hermanos se han unido a los microtúbulos de polos opuestos del huso, se activa la separasa y las células proceden a través de anafase, telofase y citocinesis de meiosis II para generar las células germinales haploides.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 19.8

Meiosis: un tipo especial de división celular

- La meiosis es una división especializada en la cual productos génicos específicos de meiosis modulan el programa de la división celular de mitosis (véase la Fig. 19-38).
- La división meiótica comprende un ciclo de replicación cromosómica seguido de dos ciclos de división celular para producir células germinales haploides a partir de una célula premeiótica diploide. Durante meiosis I, los cromosomas homólogos se segregan; durante meiosis II, las cromátidas hermanas se separan.
- Condiciones ambientales especializadas inducen un programa de desarrollo que conduce a las divisiones meióticas.
- Durante la profase de meiosis I, los cromosomas homólogos sufren recombinación. Al menos un evento de recombinación ocurre entre

las cromátidas de los cromosomas homólogos, y vincula a los cromosomas homólogos.

- Las cohesinas distales al quiasma son responsables de mantener a los cromosomas homólogos juntos durante la profase y metafase de meiosis I.

- Al inicio de la anafase de meiosis I, las cohesinas de los brazos de los cromosomas se fosforilan y, como resultado, son escindidas por la separasa, pero las cohesinas en la región del centrómero están protegidas de la fosforilación y la escisión. Esta protección es llevada a cabo por una subunidad de la cohesina específica de meiosis y una proteinfosfatasa que se asocia con los centrómeros. Como resultado, las cromátidas de los cromosomas homólogos permanecen asociadas durante la segregación en meiosis I.

- La escisión de las cohesinas centroméricas durante la anafase de meiosis II permite que las cromátidas individuales se segreguen en las células germinales.

- Un complejo de proteínas del cinetocoro específicas de la meiosis, conocido como complejo monopolina, promueve la co-orientación de las cromátidas hermanas durante la meiosis I. Ambas cromátidas hermanas se unen a los microtúbulos que emanan del mismo polo del huso.

- La inactivación incompleta de las CDK entre las dos divisiones meióticas inhibe la replicación del DNA.

Perspectivas para el futuro

El notable ritmo de investigaciones sobre el ciclo celular durante los pasados 25 años ha conducido a un modelo detallado del control del ciclo celular eucarionte. Estos controles moleculares tienen una bella lógica subyacente. Cada evento regulador tiene dos funciones importantes: activar un paso del ciclo celular siguiente y preparar a la célula para el próximo evento del ciclo. Esta estrategia asegura que las fases del ciclo ocurran en el orden adecuado.

Aunque la lógica general de la regulación del ciclo celular parece ahora bien establecida, quedan muchos detalles críticos por ser descubiertos. Por ejemplo, de qué manera el crecimiento y la división celulares están coordinados y de qué modo el estado metabólico de una célula se alimenta en su ciclo celular son aspectos que todavía deben ser dilucidados. Se ha identificado un número de nutrientes clave y de vías para detectar factores de crecimiento tales como AMPK, Ras y TOR, y su operación interna ha sido revelada recientemente. La comprensión de cómo impactan en la maquinaria del ciclo celular será una pregunta clave para ser respondida en los años venideros. Recientemente se ha hecho un progreso sustancial en la identificación de los sustratos fosforilados por diferentes CDK, pero queda mucho trabajo pendiente por hacer respecto del modo en que la modificación de estas proteínas conduce a los múltiples eventos que desencadenan estas CDK.

Recientemente se ha descubierto mucho acerca de la operación de las vías del punto de control del ciclo celular, pero se comprende

poco acerca de los mecanismos que activan ATM y ATR en los puntos de control del daño al DNA. De modo similar, aún resta mucho por aprender acerca del control y los mecanismos de regulación de Mad2 en los puntos del control del ensamblaje del huso. Quedan muchas preguntas acerca de cómo están determinados el plano de la citocinesis y la localización de los cromosomas hijos en las células que se dividen simétrica y asimétricamente, como se ve con frecuencia como parte del desarrollo de tejidos complejos y estructuras de órganos. También es área de intensa investigación el modo en que la maquinaria del ciclo celular está modulada por claves del desarrollo para llevar a cabo divisiones especializadas.

La comprensión de estos aspectos detallados del control del ciclo celular tendrá consecuencias significativas, en particular para el tratamiento de cánceres. Con frecuencia, las células cancerosas tienen defectos en los puntos del control del ciclo celular que conducen a la acumulación de múltiples mutaciones y reordenaciones del DNA que resultan en el fenotipo del cáncer. Sin embargo, la ausencia de estos puntos de control puede hacer tipos específicos de cáncer, en particular vulnerables para el daño extensivo al DNA inducido con la terapia radiante o la quimioterapia. Las células normales activan puntos del control del ciclo celular que lo detienen hasta que se repare el daño al DNA. Pero estas células cancerosas no los tienen y, en consecuencia, sufren daño genético suficiente como para inducir la apoptosis. Si se comprendiese más acerca de los controles del ciclo celular y las vías del punto de control, sería posible diseñar incluso estrategias terapéuticas más efectivas, en especial contra los tipos de cánceres que son en gran medida resistentes a las terapias convencionales actuales. Parece muy probable que una mejor comprensión de los procesos celulares implicados permitiría diseñar tratamientos más efectivos en el futuro.

Palabras clave

complejo promotor de anafase/ciclosoma (CPA/C)	888	factor promotor de la maduración (MPF)	880
factor de especificidad CPA/C	888	meiosis	913
ATM/ATR	909	mitógeno	892
cinasa Aurora B	901	mitosis	875
fosfatasa Cdc14	913	CDK mitóticas	883
fosfatasa Cdc25	898	complejo monopolina	918
cinasas activadoras-CDK (CAK)	888	proteína p53	909
inhibidores de CDK (CKI)	888	cinasas Polo	898
vía del punto de control	874	proteína Rb	891
cohesina	896	SCF proteínas (Sklp1, Cullina, caja F)	888
condensina	902	CDK de fase S	883
tamaño celular crítico	892	START	875
entrecruzamiento	915	securina	903
ciclina	874	sensor	906
cinasa dependiente de ciclina (CDK)	874	separasa	903
factor de transcripción E2F	887	cromátidas hermanas	875
CDK G ₁	883	complejo sinaptonémico	915
		tirosina cinasa-proteína Wee1	898

Revisión de los conceptos

1. ¿Qué mecanismos celulares aseguran que el paso a través del ciclo celular sea unidireccional e irreversible? ¿Qué maquinaria molecular subyace a estos mecanismos?
2. ¿Qué tipos de estrategias experimentales emplean los investigadores para estudiar el avance del ciclo celular? ¿De qué manera estas estrategias difieren sobre la base de los enfoques genéticos versus los bioquímicos?
3. Tim Hunt compartió el Nobel de Fisiología o Medicina por su trabajo sobre el descubrimiento y caracterización de las proteínas ciclinas en óvulos y embriones. Describa los pasos experimentales que lo llevaron al descubrimiento de las ciclinas.
4. ¿Qué evidencia experimental indica que la ciclina B es necesaria para que una célula entre en mitosis? ¿Qué evidencia indica que la ciclina B debe ser destruida para que una célula salga de mitosis?
5. ¿Qué diferencias fisiológicas entre *S. pombe* y *S. cerevisiae* las hacen herramientas útiles y complementarias para el estudio de los mecanismos moleculares implicados en la regulación y control del ciclo celular?
6. En *Xenopus*, uno de los sustratos de las CDK mitóticas es la fosfatasa Cdc25. Cuando es fosforilada por las CDK mitóticas, la Cdc25 se activa. ¿Cuál es el sustrato de la Cdc25? ¿De qué manera esta información ayuda a explicar el rápido incremento en la actividad de la CDK mitótica cuando las células entran en mitosis?
7. Explique de qué manera la actividad de las CDK es modulada por las siguientes proteínas: (a) ciclina, (b) CAK, (c) Wee1, (d) p21.
8. Explique el papel de los inhibidores de CDK. Si los complejos ciclina-CDK son necesarios para permitir el avance regulado a través del ciclo celular eucarionte, ¿cuál sería la base fisiológica racional para los inhibidores CDK?
9. ¿Cuál es la definición funcional de START? Típicamente, las células cancerosas pierden el control START. Explique de qué manera las siguientes mutaciones, que se encuentran en algunas células cancerosas, llevan a la evitación de los controles START: (a) la sobreexpresión de la ciclina D, (b) la pérdida de la función Rb, (c) la pérdida de la función p16, (d) la E2F hiperactiva.
10. La proteína Rb ha sido llamada el “freno maestro” del ciclo celular. Describa de qué manera la proteína Rb actúa como un freno del ciclo celular. ¿De qué manera este freno se libera en la fase G₁ media a tardía para permitir que la célula avance a la fase S?
11. Una característica común de la regulación del ciclo celular es que los eventos de una fase aseguran el avance a la fase siguiente. En *S. cerevisiae*, las CDK de G₁ y fase G₁/S promueven el ingreso a la fase S. Nombre dos maneras en las cuales promueven la activación en la fase S.
12. Para que la fase S se complete en tiempo adecuado, la replicación del DNA se inicia desde múltiples orígenes en los eucariontes. En *S. cerevisiae*, ¿qué papel juegan las CDK y los complejos DDK de la fase S para asegurar que el genoma completo se replique una vez y solo una vez por cada ciclo celular?
13. En 2001, el Nobel en Fisiología o Medicina fue entregado a tres científicos dedicados al ciclo celular. Paul Nurse fue galardonado por sus estudios sobre la fisión de la levadura *S. pombe*, en particular por el descubrimiento y caracterización del gen *wee1*⁺. ¿Qué nos dice la caracterización del gen *wee1*⁺ acerca del control del ciclo celular?

14. Describa de qué manera las células saben si los cinetocoros hermanos están adecuadamente unidos al huso mitótico.

15. Describa la serie de eventos mediante los cuales la CPA/C promueve la separación de las cromátidas hermanas en anafase.

16. La meiosis y mitosis son procesos globalmente análogos, que implican a muchas de las mismas proteínas. Sin embargo, algunas proteínas funcionan de modo único en cada uno de estos eventos de la división celular. Explique las funciones específicas de meiosis de las siguientes: (a) Ime2, (b) Rec8, (c) monopolina.

17. Leland Hartwell, el tercer galardonado con el Nobel en Fisiología o Medicina en 2001, fue distinguido por su caracterización de las vías del punto de control del ciclo celular en la levadura en gemación *S. cerevisiae*. ¿Qué es la vía del punto de control del ciclo celular? ¿Cuándo funcionan las vías del punto de control del ciclo celular? ¿De qué manera las vías del punto de control del ciclo celular ayudan a preservar el genoma?

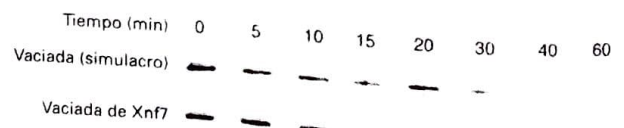
18. ¿Qué papel juegan los supresores tumorales, incluyendo el p53, en la mediación de la detención del ciclo celular en las células con daño al DNA?

19. Los individuos con la enfermedad hereditaria ataxia telangiectasia sufren neurodegeneración, inmunodeficiencia e incidencia aumentada de cáncer. La base genética de la ataxia telangiectasia es una mutación con pérdida de la función en el gen ATM (*ATM* 5; del inglés: *ataxia telangiectasia mutated* o *mutado para ataxia telangiectasia*). Además de p53, ¿qué otro sustrato es fosforilado por ATM? ¿De qué manera la fosforilación de este sustrato llevó a la inactivación de las CDK para forzar la detención del ciclo celular?

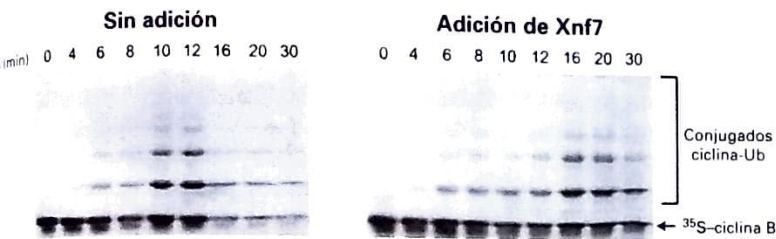
Análisis de los datos

1. Se han caracterizado muchas de las proteínas que regulan el tránsito a través del ciclo celular. La Xnf7, identificada en extracto de huevos de *Xenopus*, se une al complejo promotor de la anafase/ciclosoma (CPA/C). Para comprender la función de esta proteína, se han llevado a cabo estudios en los cuales Xnf7 ha sido eliminada de los extractos empleando un anticuerpo generado contra ella, o bien ha sido incrementada en los extractos a través de la adición de Xnf7 adicional. Las consecuencias sobre el tránsito a través de la mitosis fueron analizadas luego (véase J. B. Casaletto y cols., 2005, *J. Cell Biol.* 169:61-71).

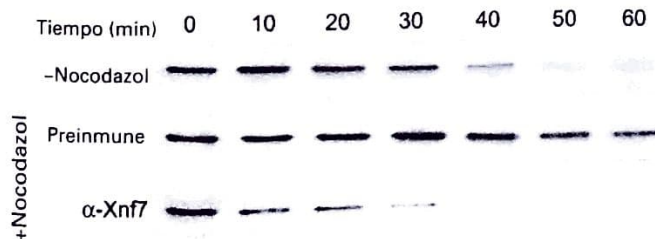
a. Extractos de huevos de *Xenopus*, detenidos en metafase, fueron o bien vaciados de Xnf7 o bien simuladamente vaciados (es decir, sometidos al mismo tratamiento que en la primera muestra pero sin el anticuerpo anti-Xnf7) y luego liberados de la detención en metafase por la adición de Ca²⁺. Luego, se tomaron alícuotas del extracto a diferentes tiempos después de añadir Ca²⁺ y se determinaron las cantidades de ciclina mitótica, como se muestra en el Western blot que aparece más abajo. ¿Qué información proporcionan estos datos acerca de una posible función de la Xnf7?



b. En estudios adicionales, se añadió Xnf7 exógena a los extractos de huevos de *Xenopus* detenidos en anafase, de modo que la cantidad total de esta proteína en los extractos fuera más alta que lo normal. Los extractos, liberados de la detención por la adición del Ca^{2+} , luego fueron evaluados en distintos momentos después de la liberación de la ubiquitinación de la ciclina mitótica (conjugados ciclina-Ub). ¿Cuál es la base racional para examinar la ubiquitinación? Empleando la siguiente figura, determine qué información añaden estos estudios más allá de la obtenida de la parte (a).



c. La vía del punto de control del huso evita que las células con cinetocoros no unidos avancen a la anafase. Así, las células en las cuales este punto de control ha sido activado no entran en la anafase y no degradan la ciclina mitótica. El nocodazol, un fármaco que evita el ensamblaje de los microtúbulos, puede ser usado para activar el punto de control del huso. Las células con nocodazol se detienen a inicios de la mitosis porque no pueden formar el huso, y así todos los cinetocoros permanecen sin unirse. Para determinar si la Xnf7 es necesaria para un punto del control del huso funcional, extractos de huevos de *Xenopus*, detenidos en metafase, fueron sometidos a varios protocolos (véase la figura siguiente): no tratados (sin nocodazol) o tratados con nocodazol y con simulacro de vaciamiento (preinmunizados) o inmunovaciados de Xnf7 (con anti-Xnf7). Los extractos fueron luego tratados con Ca^{2+} para superar la detención, y se evaluaron alícuotas de los extractos en diferentes momentos para detectar ciclina mitótica, como se muestra en el Western blot que aparece debajo. ¿Qué puede concluir acerca de la Xnf7 a partir de estos datos?



2. En este capítulo, hemos analizado que las ciclinas son un componente necesario de los complejos ciclina-CDK para el avance regulado a través del ciclo celular eucarionte. La mayoría de las ciclinas son sintetizadas progresivamente y luego degradadas sistemáticamente en forma temporal en diferentes puntos del ciclo celular. Como hemos analizado en el Capítulo 7, la expresión de las proteínas celulares puede estar regulada en diferentes puntos, comenzando con el inicio de la transcripción de los genes.

a. ¿Qué tipo de ensayos podrían emplearse para determinar si la expresión de la ciclina B está regulada en el nivel de la transcripción o de la traducción, si fuese en alguno de ellos?

b. Sobre la base de lo que ha aprendido en el Capítulo 19, ¿es posible que la actividad de la ciclina B estuviese regulada a nivel post-traduccional? Describa un mecanismo celular a través del cual podría ocurrir esto.

c. ¿Cómo podría ser posible para la expresión o la actividad de la ciclina B que ocurriera una regulación parcial por eventos en el ambiente externo de la célula?

Referencias

Generalidades del ciclo celular y su control

Morgan, D. O. 2006. *The Cell Cycle: Principles of Control*. New Science Press.

Regulación de la actividad de la cinasa dependiente de ciclina (CDK)

Doree, M., and T. Hunt. 2002. From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner? *J. Cell Sci.* 115:2461-2464.

Masui, Y. 2001. From oocyte maturation to the in vitro cell cycle: the history of discoveries of Maturation-Promoting Factor (MPF) and Cytostatic Factor (CSF). *Differentiation* 69:1-17.

Nurse, P. 2002. Cyclin dependent kinases and cell cycle control (Nobel lecture). *ChemBiochem.* 3:596-603.

Compromiso con el ciclo celular y replicación del DNA

Blow, J. J., and A. Dutta. 2005. Preventing re-replication of chromosomal DNA. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6(6):476-486.

Cardozo, T., and Pagano, M. 2004. The SCF ubiquitin ligase: insights into a molecular machine. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9:739-751.

Chen, H. Z., S. Y. Tsai, and G. Leone. 2009. Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nat. Rev. Cancer* 9(11):785-797.

Hirano, T. 2006. At the heart of the chromosome: SMC proteins in action. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7(5):311-322.

Nasmyth, K., and C. H. Haering. 2009. Cohesin: its roles and mechanisms. *Ann. Rev. Genet.* 43:525-558.

Remus, D., and J. F. Diffley. 2009. Eukaryotic DNA replication control: lock and load, then fire. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21(6):771-777.

Sears, R. C., and J. R. Nevins. 2002. Signaling networks that link cell proliferation and cell fate. *J. Biol. Chem.* 277:11617-11620.

Sherr, C. J., and J. M. Roberts. 2004. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. *Genes & Dev.* 18(22):2699-2711.

Entrada en mitosis

Barr, F. A. 2004. Golgi inheritance: shaken but not stirred. *J. Cell Biol.* 164:955-958.

Ferrell, J. E., Jr., et al. 2009. Simple, realistic models of complex biological processes: positive feedback and bistability in a cell fate switch and a cell cycle oscillator. *FEBS Lett.* 583(24):3999-4005.

Nigg, E. A. 2001. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2:21-32.

Roux, K. J., and B. Burke. 2006. From pore to kinetochore and back: regulating envelope assembly. *Dev. Cell* 11:276-278.

Santaguida, S., and A. Musacchio. 2009. The life and miracles of kinetochores. *EMBO J.* 28(17):2511-2531.

Fin de la mitosis: segregación de cromosomas y la salida de mitosis

Pesin, J. A., and T. L. Orr-Weaver. 2008. Regulation of APC/C activators in mitosis and meiosis. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* **24**:475-199.

Stegmeier, F., and A. Amon. 2004. Closing mitosis: the functions of the Cdc14 phosphatase and its regulation. *Ann. Rev. Genet.* **38**:203-232.

Uhlmann, F. 2003. Separase regulation during mitosis. *Biochem. Soc. Symp.* **70**:243-251.

Wirth, K. G., et al. 2006. Separase: a universal trigger for sister chromatid disjunction but not chromosome cycle progression. *J. Cell Biol.* **172**:847-860.

Mecanismos de vigilancia en la regulación del ciclo celular

Jorgensen, P., and M. Tyers. 2004. How cells coordinate growth and division. *Curr. Biol.* **14**(23):R1014-1027.

Bartek, J., and J. Lukas. 2007. DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **19**(2):238-245.

Burke, D. J. 2009. Interpreting spatial information and regulating mitosis in response to spindle orientation. *Genes Dev.* **23**(14):1613-1618.

Harrison, J. C., and J. E. Haber. 2006. Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint. *Ann. Rev. Genet.* **40**:209-235.

Kastan, M. B., and J. Bartek. 2004. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* **432**:316-323.

Musacchio, A., and E. D. Salmon. 2007. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**(5):379-393.

Meiosis: un tipo especial de división celular

Ishiguro, K., and Y. Watanabe. 2007. Chromosome cohesion in mitosis and meiosis. *J. Cell Sci.* **120**(Pt. 3):367-369.

Marston, A. L., and A. Amon. 2004. Meiosis: cell-cycle controls shuffle and deal. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **5**:983-997.

Zickler, D., and N. Kleckner. 1999. Meiotic chromosomes: integrating structure and function. *Ann. Rev. Genet.* **33**:603-754.

Biología celular emergente del mar: el descubrimiento de las ciclinas

T. Evans et al., 1983, *Cell* 33:391

Desde las primeras divisiones celulares después de la fecundación hasta las divisiones aberrantes que ocurren en los cánceres, los biólogos han estado interesados durante mucho tiempo en el modo en que las células controlan la forma en que se dividen. Los procesos de la división celular han sido separados en etapas conocidas colectivamente como *ciclo celular*. Mientras estudiaban el desarrollo inicial de los invertebrados marinos a inicio de 1980, Joan Ruderman y Tim Hunt descubrieron las ciclinas, reguladores claves del ciclo celular.

Antecedentes

La pregunta acerca de cómo se desarrolla un organismo a partir de un huevo fecundado continúa impulsando una gran cantidad de investigación científica. Mientras que tal investigación fue clásicamente la preocupación de los embriólogos, la comprensión en desarrollo de la expresión génica en la década de 1980 generó nuevos enfoques para responder esta pregunta. Uno de tales enfoques consistió en examinar el patrón de expresión génica tanto en el ovocito como en el huevo recién fertilizado. Ruderman y Hunt fueron algunos de los biólogos que tomaron este enfoque para estudiar el desarrollo temprano.

Los biólogos habían caracterizado bien el desarrollo inicial de un número de sistemas invertebrados marinos. Sus huevos se fecundan externamente, permitiendo a los investigadores estudiar su desarrollo en una caja de plástico. Durante las etapas iniciales del desarrollo, las células embrionarias se dividen sincrónicamente, lo cual posibilita que una población entera de células sea estudiada en la misma etapa del ciclo celular. Los investigadores habían establecido que una gran parte del mRNA del huevo fecundado no se traducía. En la fecundación, este mRNA materno se traducía rápidamente. Estudios previos habían demostrado que cuando los huevos fertilizados se tratan con fármacos que inhiben la síntesis proteica la división celular no

ocurría. Esto sugirió que el estallido inicial de síntesis proteica a partir del mRNA materno se requiere en las etapas más tempranas del desarrollo. Ruderman y Hunt, enseñando un curso de Fisiología en el laboratorio de Biología Marina de Woods Hole, en Massachusetts, iniciaron un conjunto de experimentos diseñados para poner en evidencia los genes expresados en este momento, como así el mecanismo por el cual se controlaba este estallido de síntesis proteica.

El experimento

En un proyecto en colaboración, Ruderman y Hunt buscaban la regulación de la expresión génica en el huevo fecundado de la almeja *Spisula solidissima*. Mientras que se sabía que la síntesis proteica global aumentaba rápidamente en el momento de la fecundación, querían descubrir si las proteínas se expresaban en la etapa más temprana del desarrollo, el embrión de dos células, eran diferentes de las que se expresaban en el huevo no fecundado. Cuando los huevos o los embriones de la almeja de dos células se trataban con aminoácidos marcados radioactivamente, la célula captaba los aminoácidos que luego se incorporaban a las proteínas recién sintetizadas. Empleando esta técnica, Ruderman y Hunt siguieron el patrón de la síntesis proteica rompiendo las células, separando las proteínas empleando electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) y luego visualizando las proteínas marcadas radiactivamente por autorradiografía. Cuando compararon el patrón de síntesis proteica en el huevo con el del embrión de dos células, vieron que tres proteínas diferentes no se expresaban o lo hacían a niveles muy bajos en el huevo y en elevada cantidad en el embrión. En un estudio posterior, Ruderman examinó el patrón de expresión proteica en los ovocitos de la estrella de mar *Asterias forbesi* a medida que maduraban. Nuevamente observó la expresión aumentada de tres proteínas de tamaño similar a las que ella y Hunt había visto en los embriones de la almeja.

Poco después, en un tercer estudio, Hunt examinó los cambios en la expresión proteica durante la maduración y fecundación de los ovocitos del erizo de mar. En esta ocasión, llevó a cabo el experimento de un modo ligeramente distinto. En lugar de tratar los ovocitos y el embrión con aminoácidos radiactivamente marcados durante un período prefijado, marcó las células de modo continuo durante más de dos horas, sacando las muestras para su análisis a intervalos de 10 minutos. En esta ocasión, pudo hacer un seguimiento de los cambios en la expresión de las proteínas a lo largo de las etapas tempranas del desarrollo. Como había visto en otros organismos, el patrón de síntesis proteica se vio alterado cuando el ovocito del erizo de mar se fertilizaba. Tres proteínas –representadas por tres bandas prominentes en la autorradiografía– se expresaban en los embriones pero no en los ovocitos. Resultó interesante que la intensidad de una de estas bandas cambiaba en el tiempo: la banda era intensa en los puntos temporales iniciales, luego era escasamente visible después de 85 minutos. Incrementaba en intensidad nuevamente entre los 95 y 105 minutos. La intensidad de la banda, que representaba la cantidad de proteína en la célula, parecía oscilar con el tiempo (Fig. 1a). Esto sugería que la proteína había sido rápidamente degradada y luego vuelta a sintetizar.

Dado que el marco temporal del experimento coincidió con las divisiones celulares iniciales del embrión, Hunt luego se preguntó si la síntesis y destrucción de la proteína se correlacionaba con el avance del ciclo celular. Examinó una porción de las células desde cada punto temporal bajo el microscopio, contando el número de células que se dividían en cada punto temporal en que habían sido tomadas las muestras para el análisis de proteínas. Luego, correlacionó la cantidad de proteína presente en la célula con la proporción de células que se dividían en cada punto temporal. Notó que el nivel de expresión de una de las proteínas era máximo antes de que la célula se dividiera y mínimo en el momento de la división temporal (Fig. 1b), lo cual

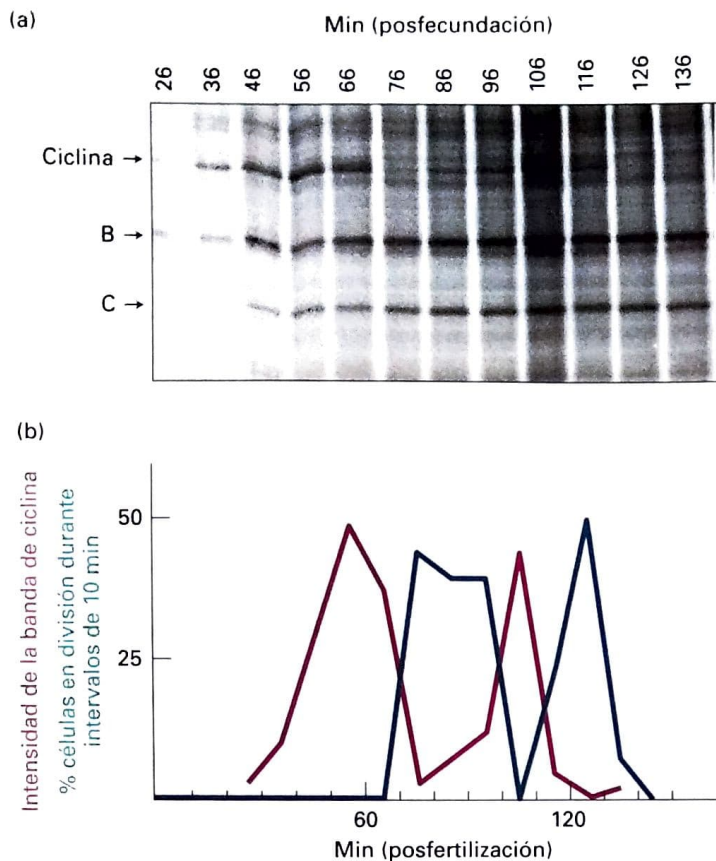


FIGURA 1 Autorradiografía que permite la detección de la síntesis y destrucción cíclica de la ciclina mitótica en los embriones de erizo de mar. Una suspensión de huevos de erizo de mar fue sincrónicamente fecundada por la adición de espermatozoides de erizo de mar y se añadió ^{35}S -metionina. A intervalos de 10 minutos, que comenzaron 26 minutos después de la fecundación, se tomaron muestras para análisis de proteína en un gel de poliacrilamida-SDS y para la detección de la escisión celular por autorradiografía del gel de SDS que exhibe muestras tomadas en diferentes momentos. La mayor parte de las proteínas, como se exhibe en B y C, incrementaron su intensidad en forma continuada. Por el contrario, la ciclina repentinamente disminuyó en intensidad a los 76 minutos después de la fertilización y luego comenzaron a incrementar nuevamente a los 86 minutos. La banda de ciclina alcanzó un pico nuevamente a los 106 minutos y disminuyó otra vez a los 126 minutos. (b) Gráfico de la intensidad de la banda de ciclina (línea roja) y de la fracción de células que habían sido escindidas a intervalos de 10 minutos anteriores (línea azul). Nótese que la cantidad de ciclina cayó precipitadamente justo antes de la escisión celular. (Tomado de T. Evans y cols., 1983, *Cell* **33**:389; cortesía de R. Timothy Hunt, Imperial Cancer Research Fund.)

sugería una correlación con la etapa del ciclo celular. Cuando llevó a cabo el mismo experimento en la almeja, vio que ambas proteínas que él y Ruderman habían descrito previamente exhibían el mismo patrón de síntesis y destrucción. Hunt llamó a estas proteínas *ciclinas* para reflejar su expresión cambiante a través del ciclo celular.

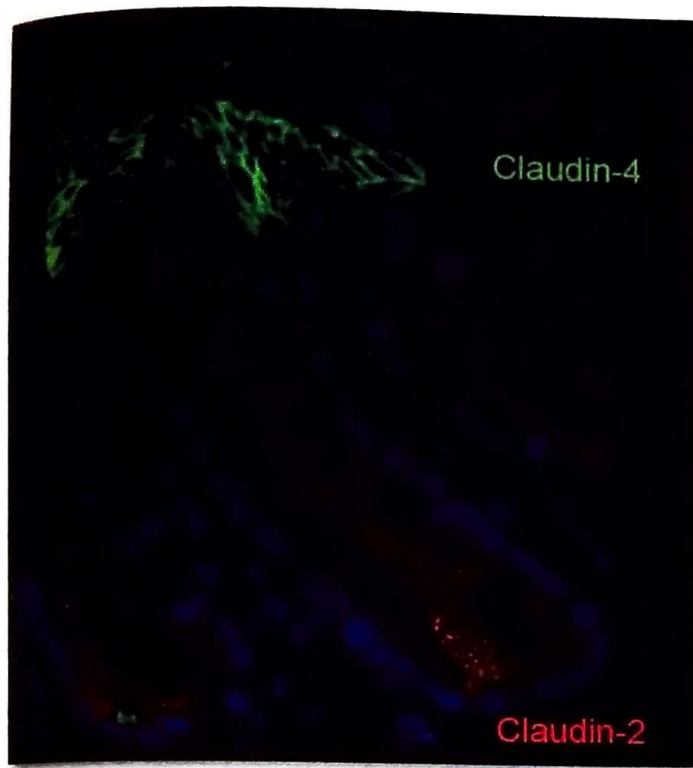
Análisis

El descubrimiento de las ciclinas marcó una explosión investigadora en el ciclo celular. Se sabe ahora que estas proteínas regulan el ciclo celular al asociarse con cinasas depen-

dientes de las ciclinas, que a su vez regulan las actividades de una variedad de factores de transcripción y replicación, como así de otras proteínas implicadas en las alteraciones complejas en la arquitectura celular y la estructura de los cromosomas que ocurren durante la mitosis. En resumen, los complejos ciclinas-CDK dirigen y regulan la progresión a través del ciclo celular. Como ocurre con muchos reguladores clave de las funciones celulares, pronto se demostró que las ciclinas descubiertas en los erizos de mar y las almejas están conservadas en los eucariontes de las levaduras hasta los humanos. Desde la identificación de las primeras ciclinas, los científicos

han identificado al menos otras 15 ciclinas que regulan todas las fases del ciclo celular.

Además del interés básico en estas proteínas, el papel central de las ciclinas en la división celular las ha transformado en un punto focal en la investigación en el cáncer. Las ciclinas están implicadas en la regulación de varios genes que se sabe desempeñan papeles prominentes en el desarrollo de los tumores. Los científicos han demostrado que al menos una ciclina, la D1, está sobreexpresada en un número de tumores. El papel de estas proteínas en la división celular normal y aberrante continúa siendo un área activa y excitante de investigación hoy en día.



Microfotografía inmunofluorescente de una sección a través del intestino delgado de un ratón en el cual las proteínas de adhesión Claudina-2 y Claudina-4 son teñidas de rojo y verde, respectivamente, y los núcleos de las células están teñidos de azul. Las claudinas son una familia de proteínas de adhesión de las uniones estrechas que también difieren en la permeabilidad selectiva de los poros a través de los cuales se mueven iones y moléculas pequeñas entre las células de un epitelio. La Claudina-2 se expresa en las criptas (partes inferiores) del epitelio intestinal y se cree que está involucrada en el transporte de cationes como el calcio. La Claudina 4 se expresa solo en las vellosidades superiores/región de la superficie y se cree que actúa como una barrera para el transporte de cationes. (Imagen de Christoph Rahner, Yale School of Medicine, y J. M. Anderson, University of North Carolina.)

Integración de células en tejidos

En el desarrollo de los organismos multicelulares complejos como plantas y animales, las células progenitoras se diferencian en distintos “tipos” que tienen composiciones, estructura y funciones características. Las células de un tipo dado suelen agruparse y formar un *tejido* para llevar a cabo cooperativamente una función común: las contracciones musculares; el tejido nervioso conduce impulsos nerviosos; el tejido del xilema en las plantas transporta agua. Diferentes tejidos pueden organizarse en un *órgano*, nuevamente para realizar una o más funciones específicas. Por ejemplo, los músculos, las válvulas y

los vasos sanguíneos de un corazón trabajan juntos para bombear sangre. El funcionamiento coordinado de muchos tipos de células y tejidos permite a los organismos moverse, metabolizar, reproducirse y llevar a cabo otras actividades esenciales. En efecto, las morfologías complejas y diversas de las plantas y los animales son ejemplos de que el todo es mayor que la suma de las partes individuales, descritas de manera más técnica como las propiedades emergentes de un sistema complejo.

Los vertebrados tienen cientos de tipos diferentes de células, incluyendo leucocitos (glóbulos blancos) y eritrocitos (glóbulos rojos),

CONTENIDO

20.1	Adhesión entre células y entre célula y matriz: panorama general	927	20.4	La matriz extracelular II: tejido conectivo	951
20.2	Uniones entre células y entre célula y MEC y sus moléculas de adhesión	933	20.5	Interacciones adhesivas en células móviles y no móviles	961
20.3	La matriz extracelular I: la lámina basal	945	20.6	Tejidos vegetales	967

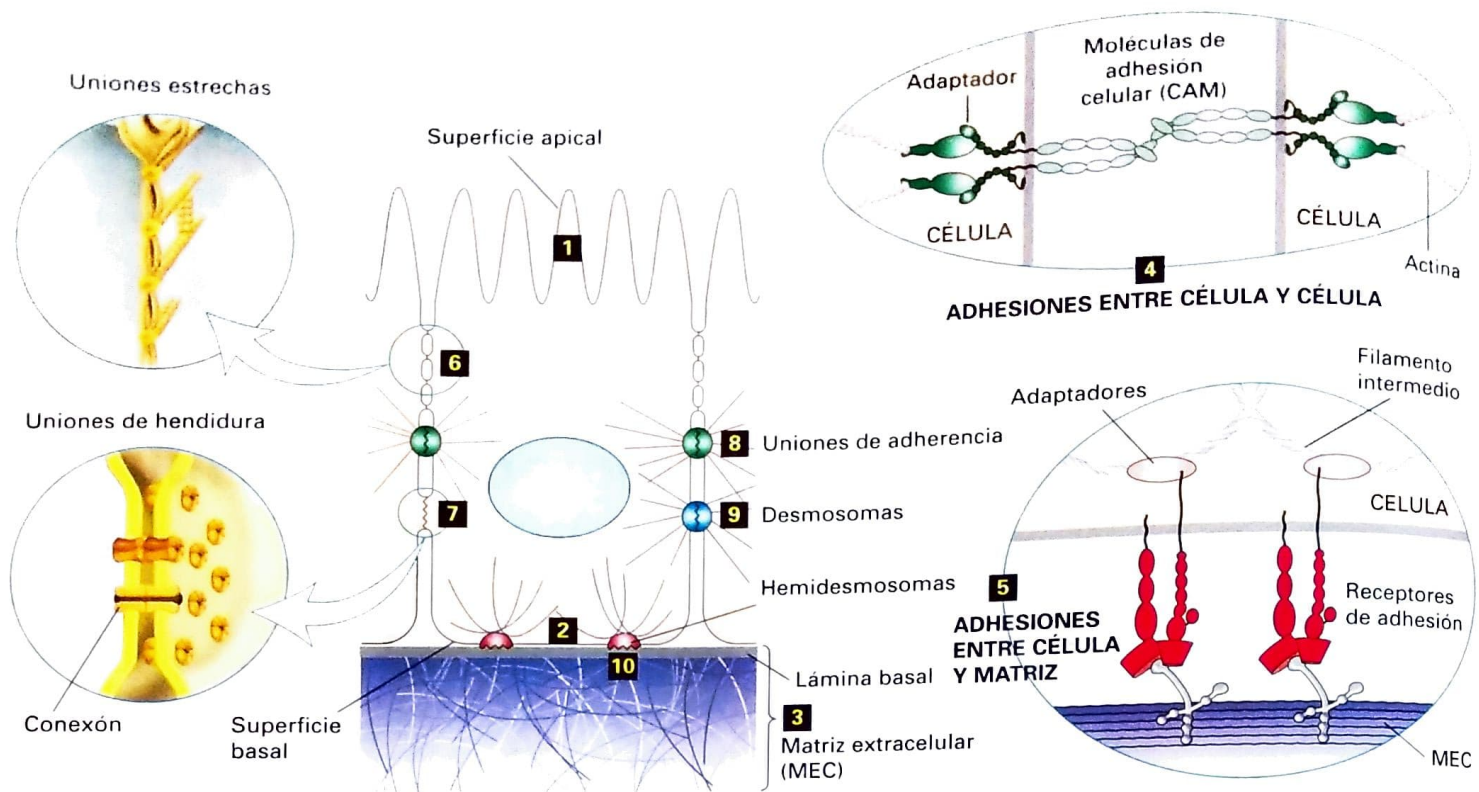


FIGURA 20-1 Panorama general de las interacciones adhesivas entre célula y célula y entre célula y matriz. Dibujo de un corte esquemático de un tejido epitelial típico, como el de los intestinos. La superficie apical (superior) de estas tres células está empaquetada con microvellosidades digitiformes (1) que se proyectan hacia el interior del lumen intestinal, y la superficie basal (inferior) (2) descansa sobre la matriz extracelular (MEC). La MEC asociada con las células epiteliales suele estar organizada en diversas capas interconectadas (p. ej., la lámina basal, fibras conectoras, tejido conectivo) en las cuales las macromoléculas grandes e interdigitantes de la MEC se unen unas con otras y con las células (3). Las moléculas de adhesión celular (CAM) se unen a las CAM de otras células, median adhesiones entre célula y célula (4), y los receptores de adhesión que se unen a varios componentes de la MEC median adhesiones entre célula y matriz (5). Ambos tipos de moléculas de adhesión a la superficie celular suelen ser proteínas integrales de membrana cuyos dominios citosólicos suelen unirse a múltiples proteínas adaptadoras. Estos adaptadores, directa o indirectamente,

conectan la CAM al citoesqueleto (filamentos de actina o intermedios) y a las vías de señalización intracelular. Como consecuencia, la información puede ser transferida por las CAM y las macromoléculas a las cuales se unen desde el exterior de la célula al ambiente intracelular y viceversa. En ambos casos, se ensambla un agregado complejo de CAM, adaptadores y proteínas asociadas. Los agregados de CAM o de receptores de adhesión localizados específicamente forman varios tipos de uniones celulares que cumplen funciones importantes en los tejidos de sostén juntos y facilitan la comunicación entre las células y sus ambientes. Las uniones estrechas (6) se encuentran justo por debajo de las microvellosidades, lo que evita la difusión de muchas sustancias a través de los espacios extracelulares entre las células. Las uniones de hendidura (7) permiten, a través de los canales conexón, el movimiento de moléculas pequeñas e iones entre los citosoles de células adyacentes. Los restantes tres tipos de uniones, las uniones de adherencia (8), los desmosomas puntuales (9) y los hemidesmosomas (10), unen el citoesqueleto de una célula a otra o a la MEC. (Vaseva V Vasioukhin and E Fuchs, 2001, *Curr. Opin. Cell Biol* 13: 76.)

los fotorreceptores en la retina, los adipocitos que almacenan grasa, los fibroblastos en el tejido conectivo y cientos de diferentes subtipos de neuronas en el cerebro humano. Incluso los animales simples presentan una organización tisular compleja. La forma adulta del nematodo *Caenorhabditis elegans* contiene solo 959 células, a pesar de lo cual estas células se encuentran en 12 diferentes tipos generales de células y muchos subtipos distintos. Pese a sus formas y funciones diversas, todas las células animales pueden clasificarse como componentes de solo cinco clases de tejido: el tejido epitelial, el tejido conectivo, el tejido muscular, el tejido nervioso y la sangre. Los diversos tipos de células están organizados en patrones precisos de asombrosa complejidad para generar diferentes tejidos y órganos. Los costos de tal complejidad incluyen requerimientos crecientes de información, material, energía y tiempo durante el desarrollo de un organismo individual. Aunque los costos

fisiológicos de los tejidos y órganos complejos son altos, confieren la capacidad de proliferar en una variedad de ambientes cambiantes (una ventaja evolutiva fundamental).

Una de las características que definen a los animales con tejidos y órganos complejos como nosotros mismos es que las superficies externas e internas de la mayoría de sus tejidos y órganos, y de hecho el exterior del organismo completo, están formadas a partir del empaquetamiento estrecho de las capas tipo láminas conocidas como epitelio. La formación de un epitelio y su posterior modelación en conjuntos de tejidos epiteliales y no epiteliales más complejos es una característica del desarrollo de los metazoos. Las láminas de células epiteliales estrechamente empaquetadas actúan como barreras de permeabilidad selectiva, regulables, que permiten la generación de compartimientos química y funcionalmente distintos en un organismo, como el estoma-

go y la circulación sanguínea. Como resultado, las funciones distintivas y a veces opuestas (p. ej., digestión y síntesis) pueden ser procesadas de manera eficiente en forma simultánea dentro de un organismo. Tal compartimentalización también permite una regulación más sofisticada de diversas funciones biológicas. De muchas maneras, las funciones de tejidos y órganos complejos en un organismo son análogas a las de los orgánulos y membranas en células individuales.

El ensamblaje de diferentes tejidos y sus organizaciones para formar órganos están determinados por sus interacciones moleculares a nivel celular (Fig. 20-1) y no podrían ser posibles sin la expresión funcional, temporal y espacialmente regulada de una amplia variedad de moléculas adhesivas. Las células en los tejidos pueden adherirse directamente entre sí (*adhesión célula y célula*) a través de proteínas de membrana especializadas llamadas **moléculas de adhesión celular (CAM)** que suelen agruparse y formar uniones celulares especializadas. En la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, se estima que al menos 500 genes (4% del total) están involucrados en la adhesión celular. Las células en los tejidos animales también se adhieren indirectamente (*adhesión entre célula y matriz*) a través de la unión de los receptores de adhesión en la membrana plasmática a los componentes de la **matriz extracelular (MEC)** circundante, una compleja red de proteínas y polisacáridos interdigitados secretada por las células a los espacios entre ellas. Algunos de los receptores de adhesión también pueden funcionar como CAM y mediar la interacción directa entre las células.

Las adhesiones entre células y entre célula y matriz no solo permiten a las células agruparse y formar tejidos diferentes, sino que también proporcionan un medio para la transferencia bidireccional de información entre el exterior y el interior de las células. Como se verá, ambos tipos de adhesiones están intrínsecamente asociados con el citoesqueleto y las vías de señalización. Como resultado, el entorno de una célula influye en su forma y propiedades funcionales (efectos “de afuera hacia adentro”); de igual manera, la forma y la función celulares influyen en el entorno de la célula (efectos “de adentro hacia afuera”). Por ende, la *conectividad* y la *comunicación* están íntimamente ligadas a las propiedades de las células en los tejidos. Tal transferencia de información es importante para muchos procesos biológicos, que incluyen supervivencia celular, proliferación, diferenciación y migración. Por lo tanto, no es sorprendente que los defectos que interfieren en las interacciones adhesivas y el flujo asociado de información puedan causar o contribuir a enfermedades que incluyen una amplia variedad de trastornos neuromusculares y esqueléticos y cáncer.

En este capítulo, analizaremos varios tipos de moléculas de adhesión encontradas en las superficies de células y en la matriz extracelular circundante. Las interacciones entre estas moléculas permiten la organización de las células en tejidos y tienen impactos profundos en el desarrollo, la función y la patología tisulares. Muchas moléculas de adhesión son miembros de familias o superfamilias de proteínas relativas. Mientras que cada molécula de adhesión individual lleva a cabo una función distinta, nos centraremos en las características comunes que comparten los miembros de algunas de estas familias para ilustrar los principios generales que subyacen a sus estructuras y funciones. Debido a la naturaleza particularmente bien comprendida de las moléculas de adhesión en los tejidos que forman el epitelio, como así también sus desarrollos evolutivos muy tempranos, inicialmente nos fijaremos en los tejidos epiteliales, como las paredes del tracto intestinal y aquellas que forman la piel. Las células epiteliales normalmente son no móviles (sésiles); sin embargo, durante el desarrollo, la cicatrización de heridas y ciertos estados patológicos (p. ej., cáncer), las células epiteliales

pueden transformarse en más móviles. Los cambios en la expresión y la función de las moléculas de adhesión tienen competencia en esta transformación, como lo hacen en los procesos biológicos normales que involucran el movimiento celular, como la migración de los glóbulos blancos hacia los sitios de infección. Por ende, continuaremos con la descripción de los tejidos epiteliales con un análisis de adhesión en tejidos no epiteliales, en desarrollo y móviles.

La evolución de las plantas y los animales divergió antes de que surgieran los organismos multicelulares. Por lo tanto, la multicelularidad y los medios moleculares para el ensamblaje de los tejidos y órganos deben haber surgido independientemente de los linajes de animales y plantas. Así, no es sorprendente que los animales y las plantas exhiban muchas diferencias en la organización y el desarrollo de tejidos. Por esta razón, se considerará primero la organización de los tejidos en los animales y luego se tratará en forma separada la de las plantas.

20.1 Adhesión entre células y entre célula y matriz: panorama general

Existen muchos tipos diferentes de células en el cuerpo que interactúan dinámicamente entre sí en una gran variedad de formas. Estas interacciones, logradas a través de las moléculas, deben estar precisa y cuidadosamente controladas en tiempo y espacio para determinar correctamente las estructuras y funciones de los tejidos en un organismo complejo. Por ende, no es sorprendente que las moléculas de adhesión entre células y entre célula y matriz exhiban diversas estructuras y sus niveles de expresión varíen en diferentes células y tejidos. En consecuencia, ellas median tanto las interacciones muy específicas y distintivas entre células y entre célula y matriz que las mantienen juntas como también la comunicación esencial entre células y sus ambientes. Comenzamos este panorama general con una orientación breve de los varios tipos de moléculas de adhesión presentes en las células y dentro de la matriz extracelular, sus principales funciones en los organismos y sus orígenes evolutivos. En secciones subsiguientes, analizaremos en detalle las estructuras únicas y las propiedades de los diversos participantes en las interacciones entre células y entre célula y matriz.

Las moléculas de adhesión celular se unen entre sí y a las proteínas intracelulares

La adhesión entre célula y célula está mediada por proteínas de membrana llamadas **moléculas de adhesión celular (CAM)**. La mayoría de las CAM se encuentran dentro de cuatro familias principales: las cadherinas, la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig), las integrinas y las selectinas. Como lo ilustran las estructuras esquemáticas en la Figura 20-2, las CAM suelen ser mosaicos de múltiples dominios diferentes, muchos de los cuales pueden encontrarse en más de una clase de proteína. Alguno de estos dominios confiere la especificidad de unión que caracteriza a una proteína particular. Otras proteínas de membrana, cuyas estructuras no pertenecen a cualquiera de las principales clases de CAM, también participan en la adhesión entre célula y célula en varios tejidos. Como se verá más adelante, las integrinas pueden funcionar como CAM y como receptores de adhesión que se unen a los componentes de la MEC (descripción en la Fig. 20-2). Algunas CAM de la superfamilia de las Ig también pueden cumplir un papel dual.

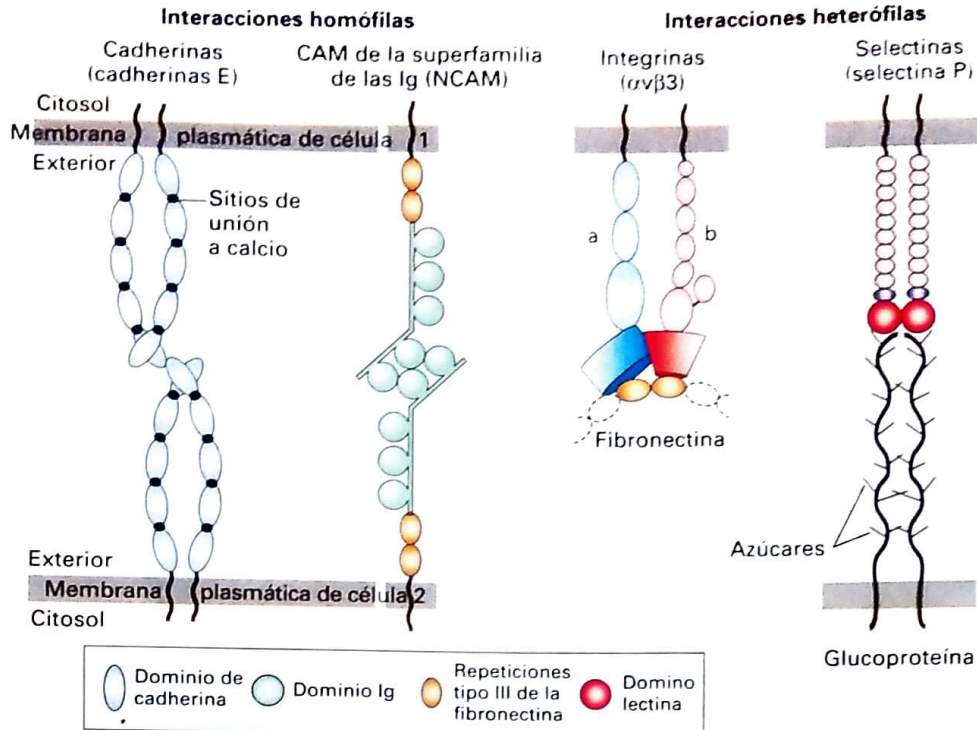


FIGURA 20-2 Principales familias de moléculas de adhesión celular (CAM) y receptores de adhesión.

Las cadherinas E diméricas suelen formar puentes cruzados homófilos (entre sí) con las cadherinas E de células adyacentes. Miembros de la CAM de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig) pueden funcionar como receptores de adhesión o como CAM que forman ambas uniones homófilas (aquí mostradas) y uniones heterófilas (no entre sí). Las integrinas heterodiméricas (por ejemplo, cadenas α y β) funcionan como CAM o como receptores de adhesión (aquí mostradas) que se unen a proteínas multiadhesivas de la matriz muy grandes, como la fibronectina, de las cuales aquí solo se muestra una pequeña parte. Las selectinas, mostradas

como dímeros, contienen un dominio lectina de unión a hidrato de carbono que reconoce estructuras de azúcares especializados sobre glucoproteínas (aquí mostradas) o glucolípidos sobre células adyacentes. Nótese que las CAM suelen formar oligómeros de orden superior dentro del plano de la membrana plasmática. Muchas moléculas adhesivas contienen múltiples dominios distintos, algunos de los cuales se encuentran en más de una clase de CAM. Los dominios citoplasmáticos de estas proteínas suelen estar asociados con proteínas adaptadoras que los conectan al citoesqueleto o a vías de señalización. (Véase R. O. Hynes, 1999, *Trends Cell Biol.* 9, 121-133; y R. O. Hynes, 2002, *Cel.* 110: 673-687.)

Las CAM median, a través de sus dominios extracelulares, las interacciones adhesivas entre las células del mismo tipo (adhesión *homotípica*) o entre células de tipos diferentes (adhesión *heterotípica*). Sobre una célula, una CAM puede unirse directamente a la misma clase de CAM sobre una célula adyacente (unión *homófila*) o a una clase distinta de CAM (unión *heterófila*). Las CAM pueden distribuirse ampliamente a lo largo de las regiones de las membranas plasmáticas que contactan otras células o agruparse en parches o puntos denominados **uniones celulares**. Las adhesiones entre célula y célula pueden ser estrechas y de larga duración o relativamente débiles y transitorias. Por ejemplo, las asociaciones entre las células nerviosas en la médula espinal o las células metabólicas en el hígado exhiben adhesión fuerte. Por ejemplo, las células del sistema inmunitario en la sangre suelen exhibir solo interacciones débiles, de corta duración, que les permiten rodar a lo largo y pasar a través de la pared de un vaso sanguíneo en camino a combatir una infección dentro de un tejido.

Los dominios de las CAM orientados al citosol reclutan grupos de **proteínas adaptadoras** multifuncionales (véase la Fig. 20-1). Estos adaptadores actúan como conectores que, directa o indirectamente, conectan las CAM con los elementos del citoesqueleto (véanse los Caps. 17 y 18); también pueden reclutar moléculas intracelulares que funcionan en las vías de señalización para controlar la expresión génica y la actividad de las CAM en sí misma o de otras

proteínas intracelulares (véanse los Caps. 15 y 16). En muchos casos, un agregado complejo de CAM, proteínas adaptadoras y otras proteínas asociadas se ensambla en la superficie interna de la membrana plasmática. Estos complejos funcionan en dos modos de comunicación, “de afuera hacia adentro” y “de adentro hacia afuera”, entre células y sus alrededores.

La formación de muchas adhesiones entre células implica dos tipos de interacciones moleculares (Fig. 20-3). Primero, los monómeros de CAM en una célula pueden unirse a la misma CAM o a distintas sobre una célula adyacente; estas interacciones se denominan interacciones *intracelulares*, *adhesivas* o *trans*. Segundo, las CAM monoméricas en una célula pueden reunirse en la membrana plasmática de la célula y formar heterodímeros u oligómeros a través de sus dominios extracelulares, los dominios citosólicos o ambos; estas interacciones se denominan *interacciones intracelulares*, *laterales* o *cis*. El agrupamiento de monómeros laterales en una célula puede incrementar la probabilidad de interacciones trans de monómero a monómero u oligómero a oligómero con las CAM agrupadas sobre una célula adyacente. Además, la formación de interacciones trans monómero a monómero puede inducir el agrupamiento lateral que fortalece las interacciones adhesivas. En muchos casos, aún no se ha establecido el tipo de interacción inicial –trans o cis– que conduce a la adhesión. En el caso de la CAM llamada cadherina E, estudios biofísicos sugieren que la forma-

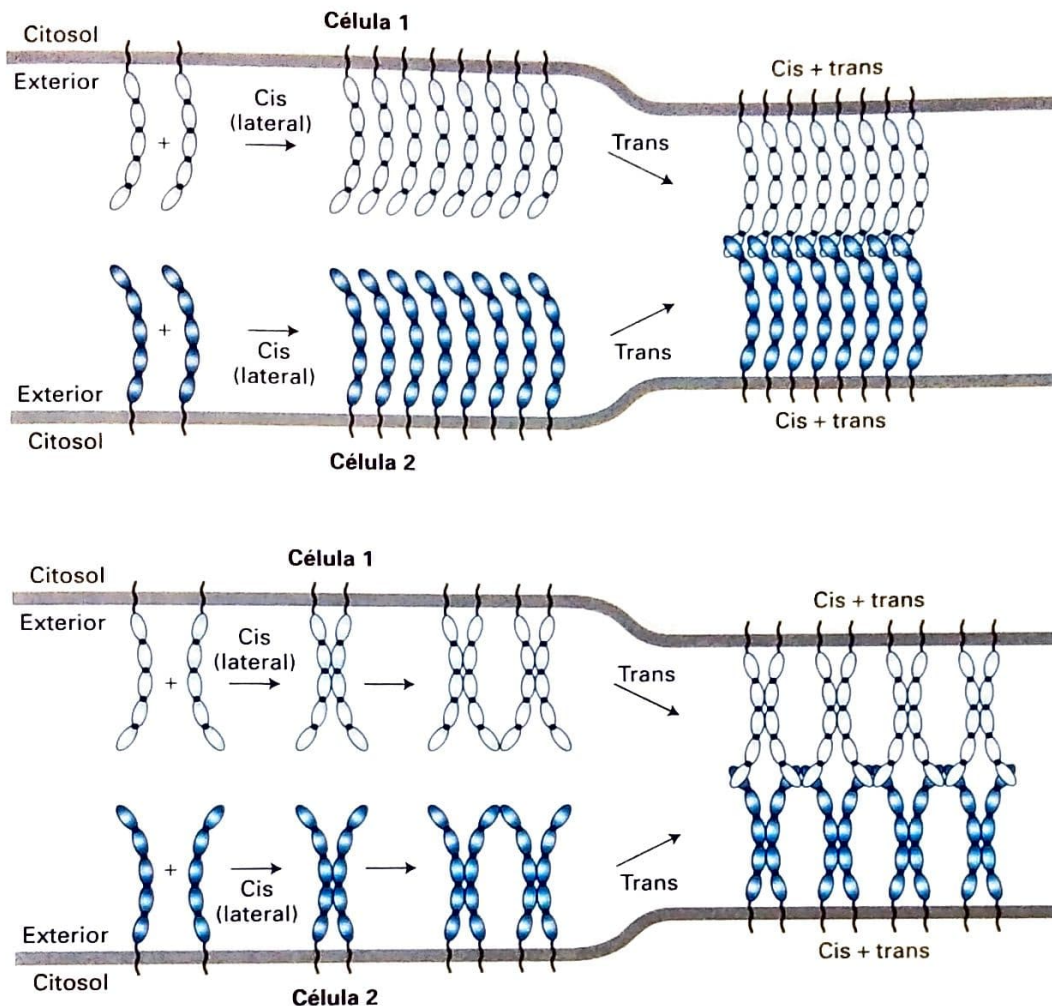


FIGURA 20-3 Modelo para la generación de adhesiones entre célula y célula. Las interacciones laterales entre las moléculas de adhesión celular (CAM) dentro de la membrana plasmática de una célula pueden formar grupos de monómeros (*arriba a la izquierda*) o unir directamente dímeros y oligómeros más grandes (*superior izquierda*). Las partes de las moléculas que participan en estas interacciones cis varían entre las diferentes CAM. Las subsecuentes

interacciones trans entre dominios distales de las CAM sobre células adyacentes, interacciones trans de monómero a monómero (*superior a la derecha*) o interacciones trans de oligómero a oligómero (*inferior a la derecha*), generan una adhesión fuerte, similar al Velcro®, entre las células. (zzAdaptado de M. S. Steinberg y P. M. McNutt, 1999, *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:554)

ción de interacciones débiles monómero a monómero puede preceder al agrupamiento lateral que fortalece la adhesión.

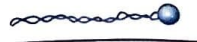
Las interacciones adhesivas entre las células varían considerablemente, dependiendo del tejido y las CAM particulares que participan. Al igual que el Velcro®, pueden generarse adhesiones muy estrechas cuando se combinan muchas interacciones débiles, y este es en especial el caso cuando las CAM se concentran en zonas pequeñas, bien definidas, como las uniones celulares. Algunas CAM requieren iones calcio para formar adhesiones efectivas; otras, no. Además, la asociación de las moléculas intracelulares con los dominios citosólicos de las CAM puede influir drásticamente las interacciones intermoleculares de las CAM al promover sus asociaciones cis (agrupamiento) o al alterar sus conformaciones. Entre las muchas variables que determinan la naturaleza de adhesión entre dos células, está la afinidad de unión de las moléculas interactuantes (propiedades termodinámicas), las velocidades generales “encendido” y “apagado” de asociación y disociación por cada molécula interactuante (propiedades cinéti-

cas), la distribución espacial o densidad de moléculas de adhesión (propiedades geométricas), los estados activo versus inactivo de las CAM respecto de la adhesión (propiedades bioquímicas) y las fuerzas externas, como el estiramiento o la tracción en el músculo o como el flujo laminar o turbulento de las células y líquidos que las rodean en el sistema circulatorio (propiedades mecánicas).

La matriz extracelular participa en la adhesión, la señalización y otras funciones

La matriz extracelular (MEC) es una combinación compleja de proteínas secretadas que está implicada en mantener juntas a las células y a los tejidos. La composición y las propiedades físicas de la MEC, que pueden variar dependiendo del tipo de tejido, su localización y su estado fisiológico pueden detectarse mediante receptores de adhesión a células que luego instruyen a las células a comportarse adecuadamente

Cuadro 20-1 Proteínas de la matriz extracelular

Proteoglucanos	Perlecano	
Colágenos	Formación de lámina (p. ej., tipo IV)	
	Colágenos fibulares (p. ej., tipos I, II y III)	
Proteínas multiadhesivas de la matriz	Laminina	
	Fibronectina	
	Nidógeno/entactina	

en respuesta al ambiente. Al igual que la expresión de moléculas de adhesión en la superficie celular está fuertemente regulada, la composición de la MEC está cuidadosamente controlada.

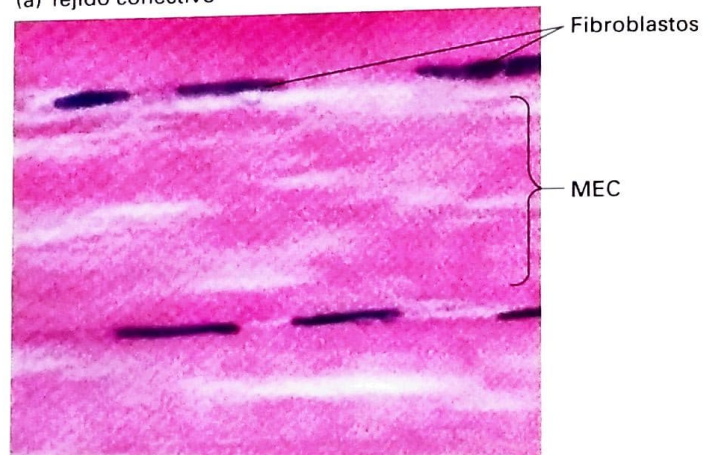
Los componentes de la matriz extracelular forman una red mediante la unión entre sí y la comunicación con células a través de la unión a receptores de adhesión sobre la superficie celular. Como una consecuencia de las interacciones de la MEC con los receptores sobre células adyacentes, la MEC media la adhesión indirecta de células. Los componentes de la MEC incluyen proteoglucanos, un tipo único de glucoproteína (una proteína con azúcares unidos covalentemente); colágenos, proteínas que suelen formar fibras; proteínas de la matriz solubles, multiadhesivas; y otras (Cuadro 20-1). Las proteínas multiadhesivas de la matriz, como la fibronectina y la laminina, son largas, flexibles y contienen múltiples dominios. Son responsables de la unión de varios tipos de colágeno, otras proteínas de la matriz, polisacáridos, receptores de adhesión de la superficie celular y moléculas de señalización extracelular. Estas proteínas son organizadores importantes de la matriz extracelular. A través de sus interacciones con receptores de adhesión, también regulan la adhesión célula-matriz y, por ende, la migración y la forma celulares.

Los volúmenes relativos de células y la matriz que las rodea varían enormemente entre los diferentes tipos de tejidos animales. Por ejemplo, algún tejido conectivo es mayormente matriz, mientras que muchos otros, como el epitelio, están compuestos de células densamente empaquetadas con relativamente poca matriz (Fig. 20-4). La densidad de empaquetamiento de las moléculas dentro de la MEC en sí misma puede variar mucho.

Los estudios clásicos de adhesión en células de esponjas marinas de H. V. Wilson demuestran en forma concluyente que una función

primaria de la MEC es la de literalmente mantener los tejidos juntos. Las Figuras 20-5a y 20-5b, las cuales recrean el trabajo clásico de Wilson, muestran que cuando se disocian las células mecánicamente y se mezclan las células individuales de dos especies diferentes, las células de una especie se adherirán entre sí pero no a las de la otra especie.

(a) Tejido conectivo



(b) Células epiteliales densamente empaquetadas

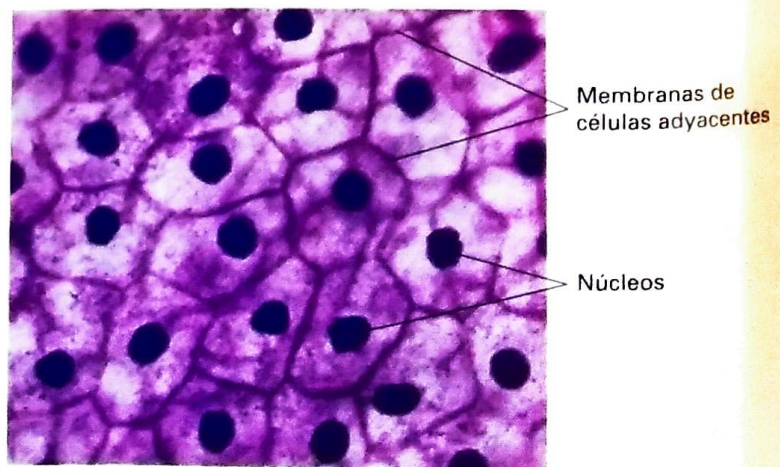


FIGURA 20-4 Variación en la densidad relativa de células y MEC en diferentes tejidos. (a) Tejido conectivo denso que contiene matriz de fibras de MEC densamente empaquetadas (rosa) intercaladas por hileras de fibroblastos dispersos, las células que sintetizan esta MEC (púrpura). (b) El epitelio escamoso visto desde arriba que muestra las células epiteliales fuertemente empaquetadas para formar un patrón tipo edredón con las membranas plasmáticas de las células adyacentes unas cerca de otras y poca MEC entre ellas (véase la Fig. 20-9b). ([a] de Biophoto Associates, [b] de Science Photo Library)

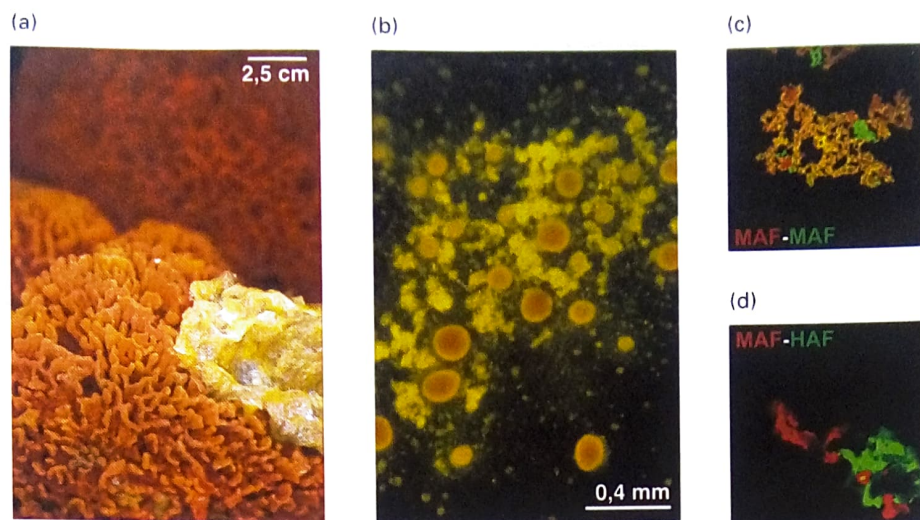


FIGURA EXPERIMENTAL 20-5 Las esponjas marinas separadas de forma mecánica vuelven a ensamblarse a través de la adhesión celular homotípica específica de especie. (a) Dos esponjas, *Microciona prolifera* (anaranjado) y *Halichondria panicea* (amarillo) creciendo en la naturaleza. (b) Después de la rotura mecánica y la mezcla de ambos tipos de esponjas mecánicas, se les permitió a las células individuales reasociarse durante ~30 minutos con agitación suave. Las células se agregan con adhesión homotípica específica de especie y forman microagrupamientos de las células *Microciona prolifera* (anaranjado) y células *Halichondria panicea* (amarillo). (c) y (d) Las esferas marcadas con fluorescencia roja y verde fueron cubiertas con el factor

de agregación de proteoglicano (AF) a partir de la MEC de *Microciona prolifera* (MAF) o de *Halichondria panicea* (HAF). El panel (c) muestra que cuando las esferas de ambos colores se cubrieron solo con MAF, ellas se agruparon juntas y formaron agregados amarillos (combinación de rojo y verde). El panel (d) muestra que las esferas cubiertas con MAF (rojo) y HAF (verde) no forman rápidamente agregados mixtos, sino que se ensamblan y forman agrupamientos distintivos sostenidos por adhesión homotípica. (amplificación, $\times 40$). (Adaptado de X. Fernandez-Busquets y M. M. Burger, 2003, *Cell Mol. Life Sci.* 60:88-112, y J. Jarchow y M. M. Burger, 1998, *Cell Adhes. Commun.* 6:405-414.)

En parte, la especificidad se debe a las diferentes proteínas en la MEC que se unen a las células a través de sus receptores de superficie. Estas proteínas adhesivas se pueden purificar y usar para cubrir esferas coloreadas que, cuando son mezcladas, se agregan unas a otras con una especificidad similar a la de las células de esponja intacta (Fig. 20-5c, d).

La MEC cumple una multitud de otras funciones además de facilitar la adhesión celular. Diferentes combinaciones de componentes de la MEC adaptan la matriz extracelular a propósitos específicos en diversos sitios anatómicos: la fuerza en un tendón, diente o hueso; amortiguación en el cartílago; adhesión en la mayoría de los tejidos. La composición de la matriz también proporciona información posicional para las células, ya que le permite saber dónde se encuentra y qué debe hacer. Los cambios en los componentes de la MEC, que constantemente están siendo remodelados, degradados y vueltos a sintetizar, pueden modular las interacciones de una célula con su ambiente. Además, la matriz sirve como un reservorio para muchas moléculas de señalización extracelular que controlan el crecimiento y la diferenciación celular. También, la matriz proporciona un entramado a través o sobre el cual se mueven las células, en particular en las etapas tempranas del ensamblaje del tejido. La morfogénesis—etapa del desarrollo embrionario en la cual se forman los tejidos, los órganos y partes del cuerpo mediante movimientos celulares—es extremadamente dependiente de la adhesión entre célula y matriz, como así también entre célula y célula. Por ejemplo, las interacciones entre célula y matriz son necesarias para la ramificación de la morfogénesis (formación de estructuras de ramificación) para formar vasos sanguíneos, los alvéolos en los pulmones, las glándulas mamarias y salivales, y otras estructuras (Fig. 20-6).

Las interrupciones en las interacciones entre célula y matriz y entre célula y célula pueden tener consecuencias devastadoras para el desarrollo tisular. La Figura 20-7 muestra los cambios drásticos en el sistema esquelético de ratones embrionarios cuando se inactivan los genes para dos moléculas clave de la MEC, el colágeno II o perlecano. Las interrupciones en la adhesión también son características de varias enfermedades, como el cáncer metastásico, en el cual las células cancerosas dejan sus localizaciones normales y se diseminan por todo el cuerpo.

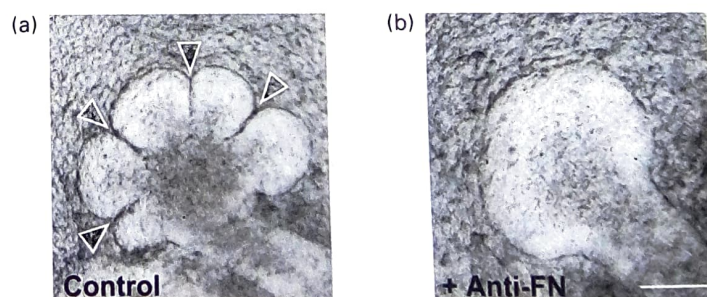


FIGURA EXPERIMENTAL 20-6 Anticuerpos contra la fibronectina bloquean la morfogénesis ramificante en tejidos murinos en desarrollo. Glándulas salivales inmaduras fueron aisladas a partir de embriones murinos y se les permitió atravesar la morfogénesis ramificante in vitro durante 10 horas en ausencia (a) o en presencia (b) de un anticuerpo que se une y bloquea la actividad de la molécula de fibronectina en la MEC. Anticuerpos antifibronectina (Anti-FN) bloquearon la formación de ramificación (punta de flecha). La inhibición del receptor de adhesión de la fibronectina (una integrina) también bloquea la formación de ramificación (no se muestra). (Takayoshi y col., 2003, *Nature* 422:876-881.)

De tipo silvestre Deficiencia de colágeno II Deficiencia de perlecano



FIGURA EXPERIMENTAL 20-7 La inactivación de genes para algunas proteínas de la MEC da como resultado el desarrollo esquelético defectuoso en ratones. Estas fotografías muestran esqueletos de embriones murinos normales (izquierda), deficiente en colágeno II (centro) o en perlecano (derecha) que fueron aislados y teñidos para visualizar el cartilago (azul) y hueso (rojo). La ausencia de estos componentes clave de la MEC produce enanismo, con muchos elementos esqueléticos acortados y desfigurados. (De E. Gustafsson y cols., 2003, *Ann. NY Acad. Sci.* 995:140-150.)

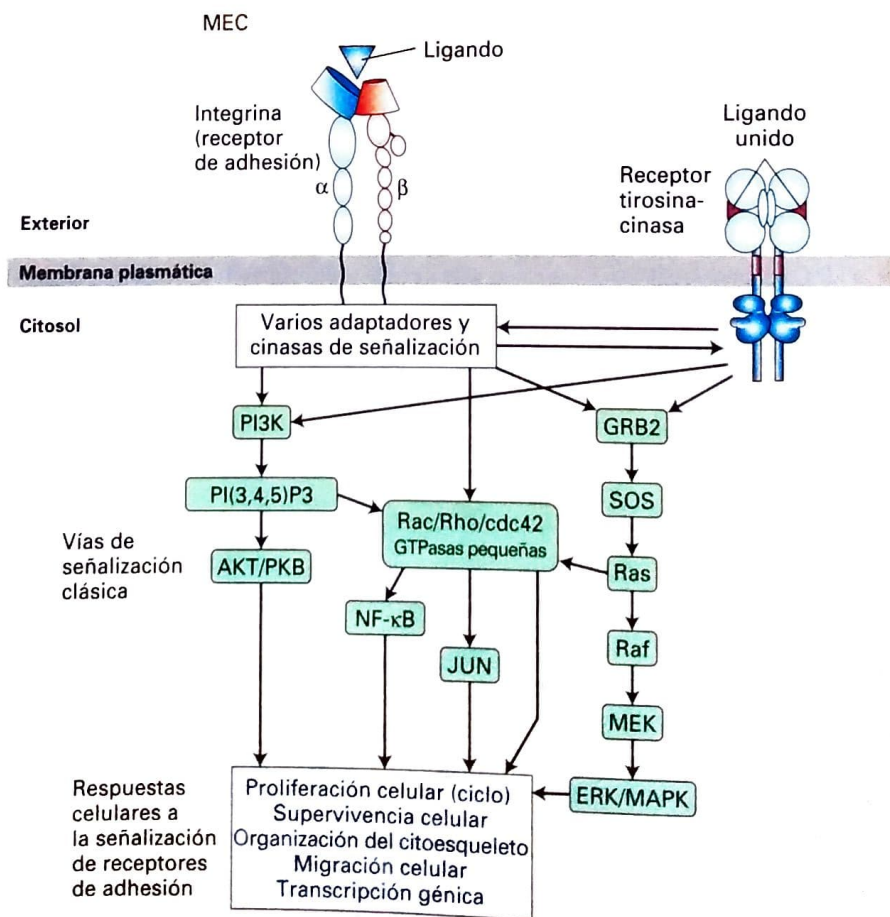
Aunque muchas CAM y receptores de adhesión fueron inicialmente identificados y caracterizados debido a sus propiedades de adhesión, también cumplen un papel importante en la señalización, usando muchas de las vías descritas en los Capítulos 15 y 16. La Figura 20-8 ilustra cómo un receptor de adhesión, la integrina, interactúa física y

funcionalmente a través de adaptadores y cinasas de señalización con un amplio grupo de vías de señalización intracelular para influenciar la supervivencia de la célula, la transcripción génica, la organización del citoesqueleto y la motilidad y la proliferación celulares. A la inversa, los cambios en las actividades de las vías de señalización dentro de las células pueden influir en las estructuras de las CAM y en la adhesión de los receptores y, por ende, modular sus capacidades para interactuar con otras células y con la MEC. De esta manera, la señalización de afuera hacia adentro y de adentro hacia fuera involucra numerosas vías interconectadas.

La evolución de moléculas de adhesión multifacéticas tornó posible la evolución de diversos tejidos animales

Las adhesiones entre célula y célula y entre célula y matriz son responsables de la formación, la composición, la arquitectura y la función de los tejidos animales. No es sorprendente que algunas moléculas de adhesión sean evolutivamente ancestrales y se encuentren entre la mayoría de las proteínas muy conservadas en los organismos multicelulares. Las esponjas, la mayoría de los organismos multicelulares primitivos, expresan ciertas CAM y moléculas multiadhesivas de la MEC cuyas estructuras son sorprendentemente similares a las proteínas humanas correspondientes. La evolución de los organismos con tejidos y órganos complejos (metazoos) ha dependido de la evolución de diversas moléculas de adhesión con propiedades y funciones nue-

FIGURA 20-8 Vías de señalización mediadas por receptor de adhesión a integrina que controlan diversas funciones celulares. La unión de las integrinas a sus ligandos (señalización desde afuera hacia adentro) induce cambios de conformación en sus dominios citoplasmáticos y altera directa o indirectamente sus interacciones con proteínas citoplasmáticas. Estas incluyen proteínas adaptadoras (p. ej., talinas, kindelinas, paxilina, vinculina) y cinasas de señalización (cinasas de la familia src, cinasas de adhesión focal [FAK], cinasa de unión a integrina [ILK]) que transmiten señales a través de diversas vías de señalización y de este modo influyen en la proliferación celular, la migración celular y la transcripción génica. En los recuadros verdes se muestran los componentes de diversas vías de señalización, algunas de las cuales están directamente asociadas con la membrana plasmática. Muchos de los componentes de las vías que aquí se muestran se comparten con otras vías de señalización activadas en la superficie celular (p. ej., receptor de tirosina-cinasa, mostrado a la derecha) y se analizan en los Capítulos 15 y 16. A su vez, las vías de señalización pueden, a través de proteínas adaptadoras, modificar la capacidad de las integrinas para unirse a sus ligandos extracelulares (señalización desde adentro hacia afuera). (Modificado de W. Guo y F. G. Giancotti, 2004, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5:816-826, y R. O. Hynes, 2002, *Cell* 110:673-6.)



vas, cuyos niveles de expresión difieren en distintos tipos de células. Algunas CAM y los receptores de adhesión (p. ej., cadherinas, integrinas y las CAM de la superfamilia de las inmunoglobulinas como la LICAM) y los componentes de la MEC (colágeno tipo I, laminina, nidógeno/entactina y proteoglicanos tipo perlecano) son altamente conservados debido a que cumplen funciones importantes en muchos organismos diferentes, mientras que otras moléculas de adhesión son menos conservadas. Por ejemplo, las moscas de la fruta no tienen ciertos tipos de colágeno o la proteína fibronectina de la MEC, que cumple funciones importantes en los mamíferos. Una característica común de las proteínas adhesivas es la repetición de los dominios que forman proteínas muy grandes. La longitud general de estas moléculas, combinado con sus capacidades para unir numerosos ligandos a través de dominios funcionales distintos, probablemente cumple una función en sus evoluciones.

La diversidad de las moléculas adhesivas surge en gran parte a partir de dos fenómenos que pueden generar numerosas proteínas estrechamente relacionadas, llamadas **isoformas**, que constituyen una familia de proteínas. En algunos casos, los diferentes miembros de una familia de proteínas están codificados por genes múltiples que surgen a partir de un ancestro común por duplicación génica y evolución divergente (véase el Cap. 6). En otros casos, un único gen produce un transcrito de RNA que puede sufrir corte y empalme alternativo para dar múltiples RNA, cada uno de los cuales codifica una isoforma de proteína diferente (véase el Cap. 8). Ambos fenómenos contribuyen a la diversidad de algunas familias de proteínas como las cadherinas. Las isoformas particulares de una proteína de adhesión suelen expresarse en algunos tipos de células y tejidos pero no en otros.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 20.1

Adhesión entre células y entre célula y matriz: panorama general

- Las interacciones entre célula y célula y entre célula y matriz extracelular (MEC) son vitales para el ensamblaje de células en tejidos, ya que controlan la forma y la función celular y determinan el destino del desarrollo de las células y los tejidos. Las enfermedades pueden ser el resultado de anomalías en las estructuras o la expresión de las moléculas de adhesión.
- Las moléculas de adhesión celular (CAM) median las adhesiones directas entre célula y célula (homotípicas y heterotípicas), y los receptores de adhesión superficie celular median las adhesiones entre célula y matriz (véase la Fig. 20-1). Estas interacciones unen las células, forman tejidos y facilitan la comunicación entre las células y sus ambientes.
- Los dominios citosólicos de las CAM y los receptores de adhesión unen proteínas adaptadoras que median la interacción con fibras del citoesqueleto y proteínas de señalización intracelular.
- Las principales familias de CAM son las cadherinas, las selectinas, las CAM de la superfamilia de las Ig y las integrinas (véase la Fig. 20-2). Miembros de la integrina y la superfamilia de las CAM-Ig también funcionan como receptores de adhesión.
- Las adhesiones estrechas entre célula y célula comprenden tanto la oligomerización cis (lateral o intracelular) de las CAM como las

interacciones trans (intracelular) de CAM similares (homófilas) o diferentes (heterófilas) (véase la Fig. 20-3). La combinación de las interacciones cis y trans produce una adhesión entre las células similar al Velcro®.

- La matriz extracelular (MEC) es una red compleja de proteínas y polisacáridos que contribuyen a la estructura y función de un tejido. La principal clase de moléculas de la MEC son los proteoglicanos, los colágenos y las proteínas multiadhesivas de la matriz (fibronectina, laminina).
- La evolución de las moléculas de adhesión con función y estructuras especializadas les permite a las células ensamblarse en diversas clases de tejidos con diferentes funciones.

20.2 Uniones entre células y entre célula y MEC y sus moléculas de adhesión

Las células en los tejidos epiteliales y no epiteliales utilizan muchas pero no todas las moléculas de adhesión célula y célula y entre célula y matriz. Debido a la organización relativamente simple del epitelio, como así también a su papel fundamental en la evolución y el desarrollo, comenzaremos la descripción detallada del epitelio. En esta sección nos centraremos en las regiones de la superficie celular que contienen grupos de moléculas de adhesión en zonas o puntos discretos denominados uniones de anclaje, uniones estrechas o uniones de hendidura. Las uniones de anclaje y las uniones estrechas cumplen funciones cruciales en mediar la adhesión entre célula y célula y entre célula y matriz extracelular, y los tres tipos de uniones median la comunicación intracelular y entre célula y MEC.

Las células epiteliales tienen superficies apicales, laterales y basales distintas

Se dice que las células que forman los tejidos epiteliales están **polarizadas** debido a que sus membranas plasmáticas están organizadas en regiones discretas. Típicamente, las diferentes superficies de una célula epitelial polarizada se denominan **apical** (arriba), **lateral** (de lado) y **basal** (base o abajo) (véanse las Figs. 20-1 y 20-9).

Los epitelios en diferentes localizaciones del cuerpo tienen morfologías y funciones características (véase la Fig. 20-9). En general, los epitelios estratificados sirven como barreras y superficies protectoras (p. ej., la piel), donde los epitelios de una única capa, simples, suelen mover iones y moléculas pequeñas de manera selectiva desde un lado de la capa hasta el otro. Por ejemplo, el epitelio cilíndrico simple que recubre el estómago secreta ácido clorhídrico hacia el lumen; un epitelio similar que recubre el intestino delgado transporta productos de digestión desde el lumen hasta el intestino a través de la superficie basolateral hacia la sangre (véase la Fig. 11-19).

En el epitelio cilíndrico simple, las interacciones adhesivas entre las superficies laterales mantienen las células juntas en dos capas bidimensionales, mientras que aquellas en la superficie basal conectan las células a una matriz extracelular subyacente especializada llamada **lámina basal**. A menudo, las superficies basal y lateral son similares en composición y, juntas, se denominan superficie **basolateral**. Por lo general, las superficies basolaterales de la mayoría de los epitelios simples se encuentran sobre el lateral de la célula, lo más cercano a los vasos san-



FIGURA 20-9 Tipos principales de epitelios. Las superficies apical, lateral y basal de las células epiteliales exhiben características distintivas. A menudo, los lados lateral y basal no se distinguen y colectivamente se denominan como superficie basolateral. (a) Los epitelios cilíndricos simples consisten en células alargadas, incluyendo células que secretan mucosidad (en el revestimiento del estómago y el tracto cervical) y las células absorbentes (en el revestimiento del intestino delgado). (b) Los epitelios cilíndricos simples, compuestos por células delgadas, revisten los vasos sanguíneos (células endoteliales/endotelio) y muchas cavidades del cuerpo. (c) Los epitelios transicionales, compuestos por varias capas de células con diferentes formas, revisten ciertas cavidades sujetas a expansión y contracción (p. ej., vejiga urinaria). (d) Los epitelios escamosos estratificados (no queratinizados) revisten superficies como la boca y la vagina; estos recubrimientos resisten la abrasión y no suelen participar en la absorción o secreción de materiales dentro o fuera de la cavidad. La lámina basal, una delgada red fibrosa de colágeno y otros componentes de la MEC, sostiene todo el epitelio y lo conecta al tejido conectivo subyacente.

guíneos, mientras que la superficie apical no está en contacto directo con otras células o la MEC. En los animales con sistemas circulatorios cerrados, la sangre fluye a través de los vasos cuyo revestimiento interno está compuesto de células epiteliales aplanadas llamadas células en-

doteliales. En general, las células epiteliales son inmóviles, sésiles, en las cuales las moléculas de adhesión se adhieren firme y establemente unas a otras y a sus MEC asociadas. Un mecanismo de especial importancia utilizado para generar adhesiones estables es concentrar subgrupos de estas moléculas en grupos llamados uniones celulares.

Tres tipos de uniones median las interacciones entre célula y célula y entre célula y MEC

Las células epiteliales en una lámina están conectadas unas con otras y a la matriz extracelular mediante uniones especializadas. Aunque cientos de interacciones mediadas por moléculas de adhesión dispersadas individualmente son suficientes para causar que las células se adhieran, los grupos de moléculas agrupadas de adhesión en las uniones celulares cumplen funciones especiales en impartir fuerza y rigidez a un tejido, transmitiendo información entre el espacio extracelular y el intracelular, controlar el paso de iones y moléculas a través del espacio celular y servir como conductos para el movimiento de iones y moléculas desde el citoplasma de una célula hasta el de su vecina inmediata. Para las láminas epiteliales, es de particular importancia la formación de uniones que contribuyen a formar cierres herméticos entre las células y, por lo tanto, permiten que la lámina sirva como una barrera para el flujo de moléculas desde un lado de la lámina al otro.

Tres clases principales de uniones celulares animales constituyen rasgos prominentes en el epitelio cilíndrico simple (Fig. 20-10 y Cuadro 20-2). Las **uniones de anclaje** y las **uniones estrechas** llevan a cabo la tarea clave de mantener el flujo de solutos a través de los espacios extracelulares entre las células que forman una lámina epitelial. Las uniones estrechas también controlan el flujo de solutos a través de los espacios extracelulares entre las células y forman una lámina epitelial. Las uniones estrechas se encuentran principalmente en las células epiteliales, mientras que las uniones de anclaje se pueden ver tanto en las células epiteliales como en las no epiteliales. Estas uniones están organizadas en tres partes: (1) las proteínas adhesivas en la membrana plasmática que conectan una célula a otra célula sobre las superficies laterales (CAM) o a la matriz extracelular sobre las superficie basal (receptores de adhesión); (2) las proteínas adaptadoras, que conectan las CAM o los receptores de adhesión a los filamentos del citoesqueleto y las moléculas de señalización; (3) los filamentos del citoesqueleto en sí mismos. La tercera clase de uniones, las **uniones de hendidura**, permiten la rápida difusión de moléculas pequeñas, solubles en agua, entre los citoplasmas de células adyacentes. Junto con las uniones de anclaje y las uniones estrechas, las de hendidura comparten la función de ayudar a una célula a comunicarse con su ambiente. Sin embargo, son estructuralmente muy distintas de las otras uniones y no cumplen una función en la fuerza de las adhesiones entre célula y célula y entre célula y MEC. Las uniones de hendidura, que se encuentran en ambas células epiteliales y no epiteliales, se asemejan a las uniones entre célula y célula en las plantas llamadas plasmodesmos, que se analizan en la Sección 20.6.

Tres tipos de uniones de anclaje están presentes en las células. Dos participan en la adhesión entre célula y célula, mientras que la tercera lo hace en la adhesión entre célula y matriz. Las **uniones de adherencia** suelen localizarse cerca de la superficie apical, inmediatamente por debajo de las uniones estrechas (Fig. 20-10). Un cinto circular de filamentos de actina y miosina que forma un complejo con las uniones

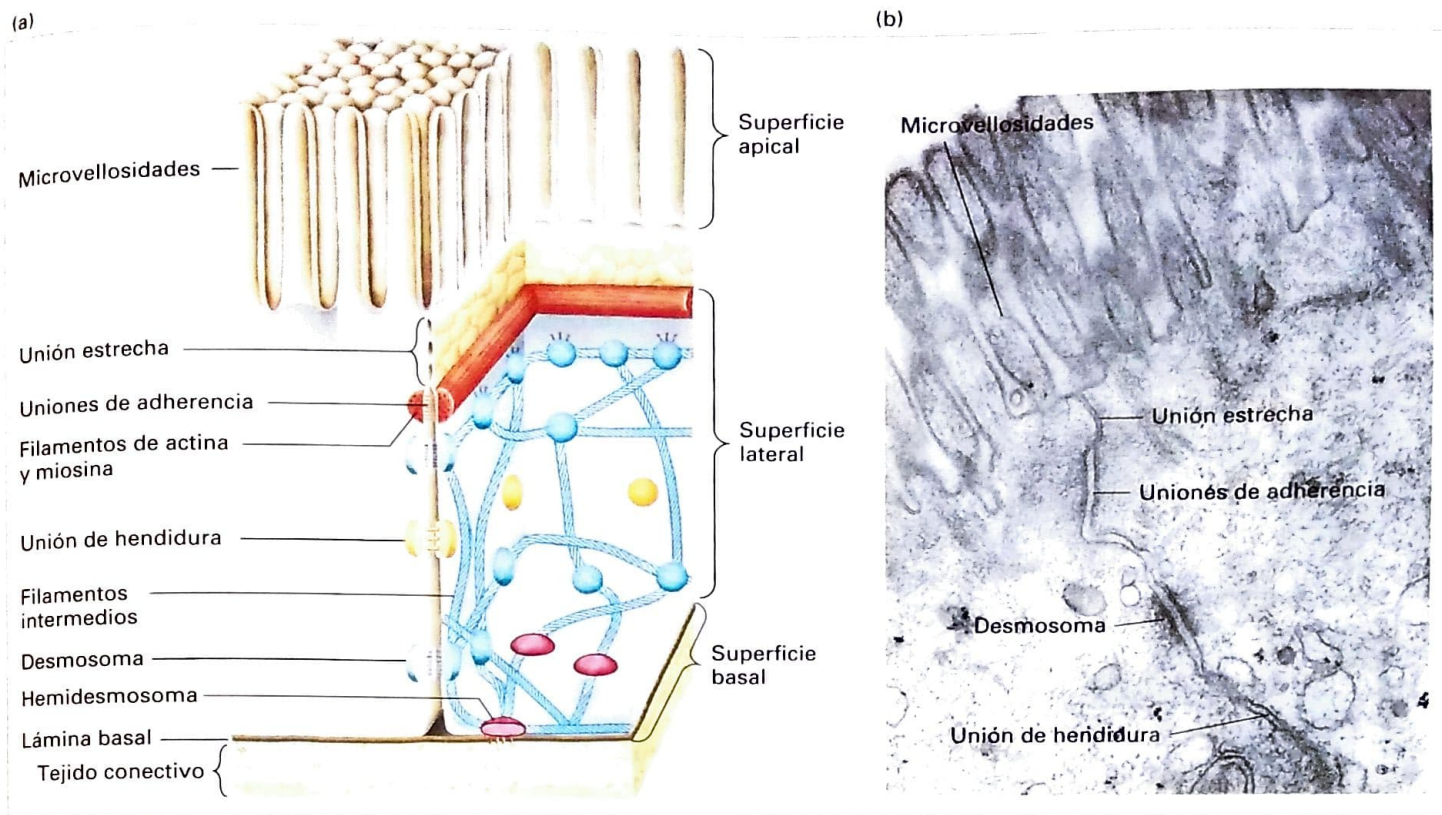


FIGURA 20-10 Tipos principales de uniones celulares que conectan las células epiteliales cilíndricas que recubren el intestino delgado. (a) Dibujo de un corte esquemático de células epiteliales intestinales. La superficie basal de las células descansa sobre una lámina basal, y la superficie apical está empaquetada con microvellosidades digitiformes que se proyectan hacia el lumen intestinal. Las uniones estrechas, que se encuentran justo por debajo de las microvellosidades, evitan la difusión de muchas sustancias entre el lumen intestinal y la sangre a través del espacio extracelular entre las células. Las

uniones de hendidura permiten el movimiento de moléculas pequeñas e iones entre los citosoles de células adyacentes. Los tres tipos restantes de uniones, las uniones de adherencia, los desmosomas puntuales y los hemidesmosomas, son cruciales para la adhesión entre célula y célula y entre célula y matriz y para la señalización. (b) Microfotografía electrónica de una sección delgada de células epiteliales intestinales que muestra las localizaciones relativas de las diferentes uniones. (Parte [b] C. Jacobson y col., 2001, *J. Cell Biol.* 152:435-450)

de adherencia funciona como un cable de tensión que internamente abraza la célula y, por lo tanto, controla su forma. Las células epiteliales y de otros tipos, como las células musculares y las cardíacas, también están fuertemente unidas entre sí por *desmosomas*, puntos de contacto similares a botones que a veces se denominan desmosomas puntuales. Los *hemidesmosomas*, que se encuentran en la superficie basal de las células epiteliales, anclan un epitelio a componentes de la matriz extracelular subyacente, similar a clavos que sostienen una alfombra. Las uniones de adherencia y los desmosomas se encuentran en muchos tipos diferentes de células; los hemidesmosomas parecen estar restringidos a las células epiteliales.

Los haces de filamentos intermedios corren paralelos a la superficie celular o a través de los desmosomas puntuales interconectados e imparten forma y rigidez a la célula. Esta interacción cercana entre estas uniones y el citoesqueleto ayuda a transmitir las fuerzas de fricción desde una región de una capa celular hasta la capa de células epiteliales entera. Los desmosomas y los hemidesmosomas son de especial importancia en el mantenimiento de la integridad del epitelio de la piel. Por ejemplo, mutaciones que interfieren con el anclaje de hemidesmosomas en la piel pueden llevar a la formación de ampollas en las cuales el epitelio se desprende de su matriz basal

y el líquido extracelular se acumula en la superficie basolateral, con distensión cutánea en forma de globo.

Las cadherinas median las adhesiones en las uniones de adherencia y los desmosomas

Las CAM primarias en las uniones de adherencia y los desmosomas pertenecen a la familia de las **cadherinas**. En los vertebrados, esta familia de proteínas de más de 100 miembros puede agruparse en al menos seis subfamilias, incluyendo las *cadherinas clásicas* y las *cadherinas desmosomas*, que se describirán a continuación. La diversidad de las cadherinas surge de la presencia de múltiples genes de cadherinas y del corte y empalme alternativo del RNA. No es sorprendente que existan muchos tipos diferentes de cadherinas en los vertebrados, debido a que muchos tipos distintos de células en tejidos ampliamente diversos utilizan estas CAM para mediar la adhesión y la comunicación. El cerebro expresa el mayor número de cadherinas diversas, presumiblemente debido a la necesidad de formar muchos contactos entre célula y célula para ayudar a establecer su patrón de cableado complejo. Sin embargo, los invertebrados son capaces de funcionar con menos de 20 cadherinas.

Cuadro 20-2 Uniones celulares

Unión	Tipos de adhesión	Principales CAM o receptores de adhesión	Adhesiones citoesqueléticas	Función
Uniones de anclaje				
1. Uniones de adherencia	Célula-célula	Cadherinas	Filamentos de actina	Forma, tensión, señalización Fuerza, durabilidad, señalización
2. Desmosomas	Célula-célula	Cadherinas desmosómicas	Filamentos intermedios	
3. Hemidesmosomas	Célula-matriz	Integrina ($\alpha 6 \beta 4$)	Filamentos intermedios	Forma, rigidez, señalización
Uniones estrechas	Célula-célula	Ocludina, claudina, JAM	Filamentos de actina	Control del flujo de soluto, señalización
Uniones de hendidura	Célula-célula	Conexinas, inexinas, panexinas	Posibles conexiones indirectas al citoesqueleto a través de adaptadores a otras uniones	Comunicación; transporte de moléculas pequeñas entre células
Plasmodesmos (sólo plantas)	Célula-célula	Indefinido	Filamentos de actina	Comunicación; transporte molecular entre células

Cadherinas clásicas Las cadherinas “clásicas” incluyen las E, N y P, nombradas por el tipo de tejido en el cual fueron inicialmente identificadas (epitelio, neural y placentario). Las cadherinas E y N son las más ampliamente expresadas, en particular durante la diferenciación. Las láminas de células epiteliales polarizadas, como aquellas que recubren el intestino delgado o los túbulos renales, contienen abundante cadherina E a lo largo de sus superficies laterales. Aunque la cadherina E está concentrada en las uniones de adherencia, se halla presente a través de toda la superficie lateral, donde se cree que conecta las membranas de células adyacentes. Los resultados de los experimentos con las células L, una línea de fibroblastos murinos cultivados, demostraron que las cadherinas E median preferentemente las interacciones homófilas. Las células L no expresan cadherinas y se adhieren pobremente a ellas mismas o a otras células. Cuando el gen cadherina E se introdujo en las células L, se encontró que las células L que expresan cadherina modificada genéticamente se adhieren de preferencia a otras células que expresan cadherinas E (Fig. 20-11). Estas células L que expresan la cadherina E formaron los agregados del tipo epitelial entre sí y con las células epiteliales aisladas a partir de los pulmones. Aunque la mayoría de las cadherinas E exhiben uniones homófilas, algunas median interacciones heterófilas.

La adhesividad de las cadherinas depende de la presencia de Ca^{2+} extracelular, propiedad que da origen a su nombre (adhesión al calcio). Por ejemplo, la adhesión de las células L que expresan cadherina E se evita cuando las células son bañadas con una solución que es baja en Ca^{2+} (véase la Fig. 20-11). Algunas moléculas de adhesión requieren cantidades mínimas de Ca^{2+} en el líquido extracelular para funcionar adecuadamente, mientras que otras moléculas como las IgCAM son independientes del Ca^{2+} .

El papel de la cadherina E en la adhesión también puede ser demostrado en experimentos con células epiteliales cultivadas llamadas *Madin-Darby canine kidney (MDCK)* (véase la Fig. 9-4).

Una forma de cadherina E marcada con proteína verde fluorescente se ha utilizado en estas células para demostrar que los grupos de cadherina E median la adhesión inicial y el subsecuente cierre tipo crema-

llera de las células para formar una lámina (Fig. 20-12). En este sistema experimental, la adición de un anticuerpo que se une a la cadherina E previene las interacciones homófilas, bloquea la adhesión dependiente de Ca^{2+} de las células MDCK entre sí y la subsiguiente formación de uniones de adherencia intracelular.

Cada cadherina clásica contiene un único dominio transmembrana, un dominio citosólico C-terminal y cinco dominios “cadherinas” extracelulares (véase la Fig. 20-2). Los dominios extracelulares son necesarios para la unión de Ca^{2+} y la adhesión entre célula y célula mediada por cadherina. La adhesión mediada por cadherina comprende las interacciones moleculares de agrupamiento lateral cis (intracelular) y adhesivas trans (intercelular) (véase la Fig. 20-3). Los sitios de unión a Ca^{2+} , localizados entre las repeticiones de cadherinas, pueden ayudar a estabilizar las interacciones cis o trans. Los gru-

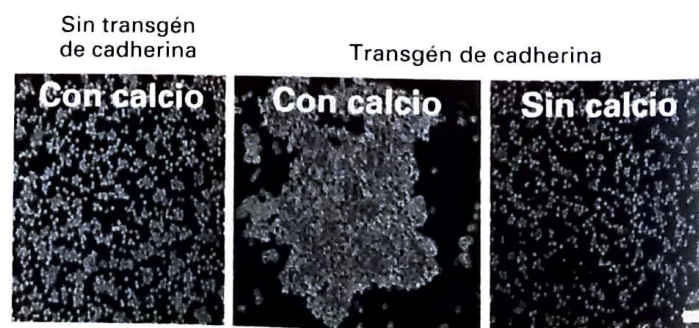
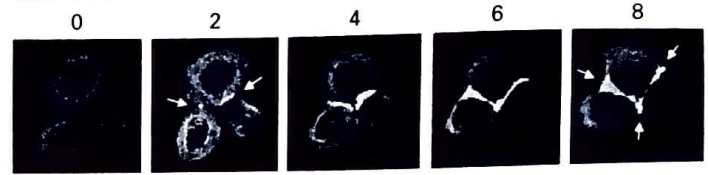


FIGURA EXPERIMENTAL 20-11 La cadherina E media la adhesión dependiente de Ca^{2+} de las células L. En condiciones estándares de cultivo de células en presencia de calcio en el líquido extracelular, las células L no se agregan para formar hojas (*izquierda*). La introducción de un gen que causa la expresión de cadherina E en estas células da como resultado sus agregaciones para formar agrupamientos similares al epitelio en la presencia de calcio (*centro*) pero no en su ausencia (*derecha*). Barra, 60 μm . (De Cynthia L. Adams y cols. 1998, *J. Cell Biol.* 142:4) 1105-1119.)

FIGURA EXPERIMENTAL 20-12 La cadherina E media las conexiones adhesivas en células epiteliales MDCK cultivadas. Un gen de cadherina E fusionado a la proteína verde fluorescente (GFP) se introdujo dentro de células MDCK cultivadas. Las células fueron luego mezcladas en un medio que contiene calcio y la distribución de cadherina E fluorescente se visualizó en el transcurso del tiempo (mostrada en horas). Agrupamientos de la cadherina E median la adhesión inicial y el posterior cierre del tipo cremallera de las células epiteliales y la formación de uniones (las uniones bicelulares se encuentran donde dos células se juntan y aparecen como líneas; las uniones tricelulares son los sitios de intersección de tres células.) (De Cynthia L. Adams y cols., 1998, *J. Cell Biol.* **142**: 1105-1119.)

Tiempo después de mezclar las células (h):



pos de cadherinas forman complejos intracelulares para generar adhesión célula-célula y luego los contactos laterales adicionales, lo que da como resultado un "cierre de cremallera" de las cadherinas para formar estructuras adhesivas. De esta forma, las interacciones de baja afinidad suman para producir una adhesión intercelular muy fuerte.

Los resultados de los experimentos de intercambio de dominios, en los cuales un dominio extracelular de una clase de cadherina es reemplazado con el dominio correspondiente de una cadherina diferente, indican la especificidad de residuos de unión, al menos en parte, en el dominio extracelular más distal (el más alejado de la membrana), el dominio N-terminal. Se cree que la adhesión transmediada por cadherina requiere solo interacciones entre los dominios N-terminales de oligómeros de cadherina sobre células adyacentes, como se describe en la Figura 20-13.

El dominio citosólico C-terminal de las cadherinas clásicas está conectado al citoesqueleto de actina mediante proteínas adaptadoras (véase la Fig. 20-13). Estas conexiones son esenciales para la adhesión fuerte, debido sobre todo a sus contribuciones para incrementar las

asociaciones laterales. Por ejemplo, la rotura de las interacciones entre las cadherinas clásicas y las cateninas α o β (dos proteínas adaptadoras comunes que conectan las cadherinas clásicas a los filamentos de actina) reducen en forma drástica las adhesiones entre célula y célula mediada por las cadherinas. Esta ruptura se produce espontáneamente en las células tumorales, que a veces fallan en expresar la catenina α , y pueden ser inducidas en forma experimental por disminución de las reservas citosólicas de catenina β accesible. Los dominios citosólicos de las cadherinas también interactúan con las moléculas de señalización intracelular como la catenina-p120. Es interesante destacar que la catenina β cumple una función dual: no solo media la adhesión del citoesqueleto, sino que también sirve como una molécula de señalización y puede translocarse al núcleo y alterar la transcripción génica en la vía de señalización Wnt (véase la Fig. 16-30).

Las cadherinas clásicas cumplen una función crucial durante la diferenciación tisular. Cada cadherina clásica tiene una distribución de tejido característica. En el curso de la diferenciación, la cantidad o la naturaleza de los cambios de las cadherina en la superficie celular

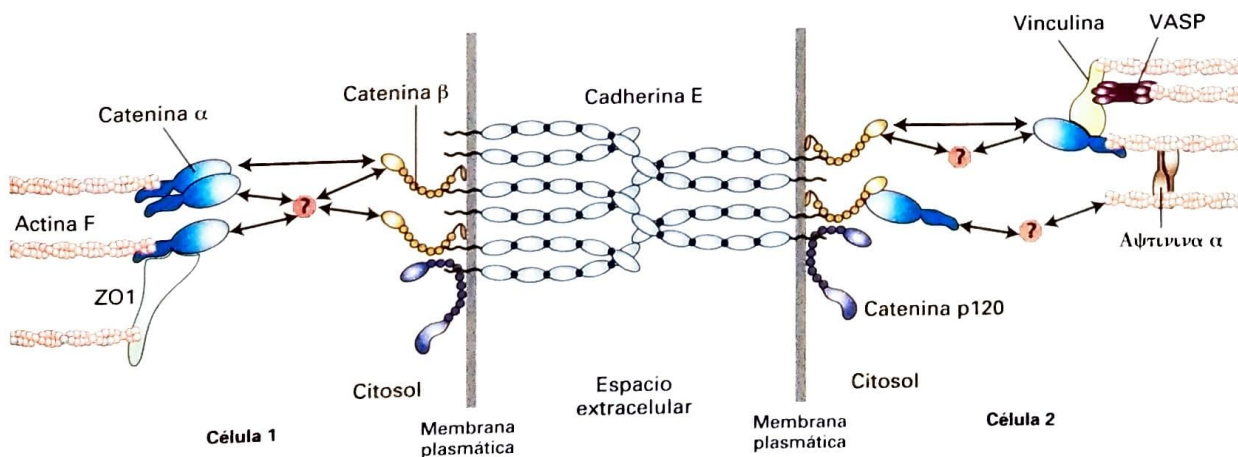


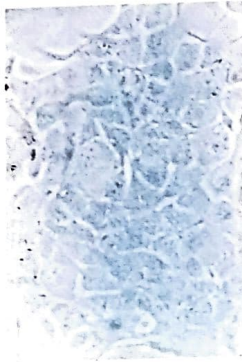
FIGURA 20-13 Constituyentes proteicos de las uniones de adherencias típicas. Los dominios exoplasmáticos de los dímeros de cadherina E agrupados en las uniones de adherencia sobre células adyacentes forman interacciones homófilas dependientes de Ca^{2+} . Los dominios citosólicos de las cadherinas E se unen directa o indirectamente a múltiples proteínas adaptadoras (p. ej., catenina β) que conectan las uniones a filamentos de actina (actina F) del citoesqueleto y participan en las vías de señalización intracelular. Grupos de proteínas adaptadoras algo distintas se ilustran en las dos células

para enfatizar que una variedad de adaptadores pueden interactuar con las uniones de adherencia. Algunos de estos adaptadores, como ZO1, pueden interactuar con varias CAM diferentes. Existe alguna controversia acerca de si la α -catenina media la interacción de cadherina/ β -catenina con la actina directamente, a través de proteínas de unión intermediarias (indicadas en la figura por signos de interrogación) o a través de mecanismos más complejos. (Adaptado de V. Vasioukhin y E. Fuchs, 2001, *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**: 76.)

afecta en muchos aspectos la adhesión entre célula y célula y la migración celular. Por ejemplo, la reorganización de los tejidos durante la morfogénesis suele estar acompañada por la conversión de células epiteliales inmóviles en células precursoras móviles para otros tejidos (células mesenquimales). Tales *transiciones epiteliales a mesenquimáticas* se asocian con una reducción en la expresión de cadherina E (Fig. 20-14a, b). La conversión de células epiteliales en células de carcinoma maligno, como en ciertos tumores de conductos mamarios o en cáncer gástrico difuso hereditario (Fig. 20-14c), también está marcada por una pérdida de actividad de cadherina E.

Las adhesiones firmes entre célula y célula epitelial mediada por las cadherinas en las uniones de adherencia permite la formación de una segunda clase de uniones intercelulares en los epitelios, las uniones estrechas, que trataremos en breve.

(a) Células epiteliales adherentes



(b) Células mesenquimáticas móviles



(c) Células cancerosas, sin cadherina

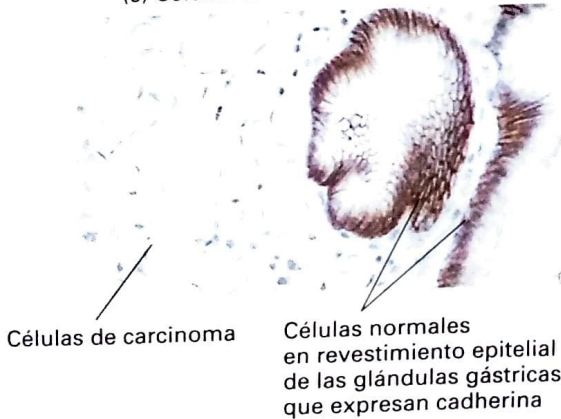


FIGURA EXPERIMENTAL 20-14 La actividad de cadherina E se pierde durante la transición epitelial-mesenquimática y la progresión del cáncer. Una proteína llamada Snail, que evita la expresión de la cadherina E, está asociada con las transiciones epitelial-mesenquimáticas. (a) Las células epiteliales normales MDCK crecen en cultivo. (b) La expresión del gen *snail* en las células MDCK provoca que estas atraviesen la transición epitelial-mesenquimática. (c) Distribución de la cadherina E detectada por tinción inmunohistoquímica (marrón oscuro) en secciones delgadas de tejido a partir de un paciente con cáncer gástrico difuso hereditario. La cadherina E se observa en los bordes intracelulares de las células epiteliales de la glándula gástrica estomacal (derecha); no se observa cadherina E en los bordes de las células de carcinoma invasivo subyacente. (Panales [a] y [b] de Alfonso Martínez Arias, 2001, *Cell* **105**:425-431; imágenes cortesía de M. A. Nieto; panel [c] de F. Carneiro y cols., 2004, *J. Pathol.* **203**:681-687.)

Cadherinas desmosómicas Los desmosomas (Fig. 20-15) contienen proteínas cadherinas especializadas, *desmogleína* y *desmocolina*, cuyos dominios citosólicos son distintos de los de las cadherinas clásicas. Los dominios citosólicos de las cadherinas desmosómicas interactúan con proteínas adaptadoras como la placoglobina (similar en estructura a la β -catenina), las placofilinas y un miembro de la familia de adaptadores llamado desmoplaquina. Estos adaptadores, a su vez interactúan con los filamentos intermedios.

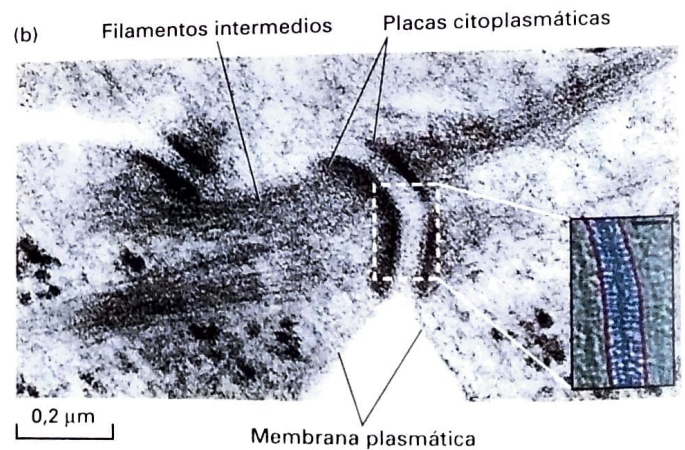
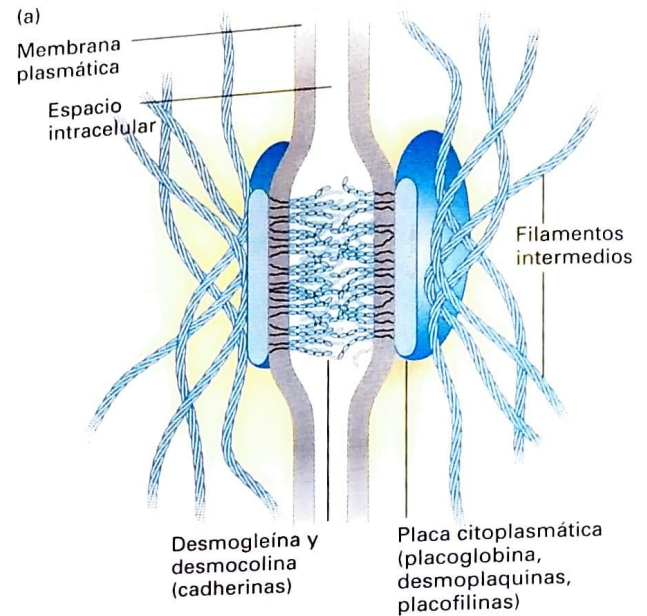


FIGURA 20-15 Desmosomas. (a) Modelo de un desmosoma entre células epiteliales con adhesiones a los lados de los filamentos intermedios. Las CAM transmembrana desmogleína y desmocolina pertenecen a la familia de las cadherinas. Las proteínas adaptadoras unidas a los dominios citosólicos de las CAM incluyen la placoglobina, la desmoplaquina y las placofilinas. (b) Micrografía electrónica de una sección delgada de un desmosoma que conecta dos queratinocitos humanos diferenciados cultivados. Los haces de filamentos intermedios se irradian desde las placas citoplasmáticas teñidas de oscuro que revisten la superficie interna de las membranas plasmáticas adyacentes. Recuadro: tomografía microscópica electrónica de un desmosoma que conecta dos células epidérmicas humanas (membranas plasmáticas, rosa; CAM, azul, barra, 35 nm). (Parte [a], véase B. M. Gumbiner, 1993, *Neuron* **11**:551, y D. P. Gertler, 1993, *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**:30. Parte [b] cortesía de R. van Buskirk. Recuadro de A. Al-Amoudi, D. F. Diez M. J. Betts, y A. S. Frangakis, 2007, *Nature* **450**:832-837.)



La cadherina desmogleína se identificó a través de estudios de una patología cutánea inusual pero reveladora llamada *pénfigo vulgar*, una enfermedad autoinmunitaria. Los pacientes con trastornos autoinmunitarios sintetizan anticuerpos que atacan al propio organismo, o “auto,” que se unen a proteínas normales del cuerpo. En el *pénfigo vulgar*, los autoanticuerpos interrumpen la adhesión entre las células epiteliales y causan la formación de ampollas en la piel y las membranas mucosas. El autoanticuerpo predominante demostró ser específico para la desmogleína; en efecto, la adición de tales anticuerpos a la piel normal induce la formación de ampollas y la interrupción de adhesiones celulares.■

Las integrinas median las adhesiones entre célula y MEC, incluyendo aquellas en los hemidesmosomas de las células epiteliales

Para estar ancladas a los tejidos sólidos y órganos, las láminas epiteliales cilíndricas deben estar firmemente adheridas a través de sus superficies basales a la matriz extracelular subyacente (lámina basal). Esta adhesión se produce mediante los receptores de adhesión llamados **integrinas** (véase la Fig. 20-2), que están localizados dentro y fuera de las uniones de anclaje llamadas *hemidesmosomas* (véase la Fig. 20-10a). Los hemidesmosomas comprenden diversas proteínas integrales de membrana conectadas a través de proteínas adaptadoras (p. ej., plaquinas) a filamentos intermedios basados en queratina. El principal receptor de adhesión a la MEC en los hemidesmosomas epiteliales es la integrina $\alpha 6 \beta 4$.

Las integrinas funcionan como receptores de adhesión y las CAM en una variedad de células epiteliales y no epiteliales, que median las in-

teracciones entre célula y célula y entre célula y matriz (Cuadro 20-3). En los vertebrados, se conocen al menos 24 heterodímeros de integrinas compuestos de 18 tipos de subunidades α y 8 tipos de subunidades β en varias combinaciones. Una única cadena β puede interactuar con cualquiera de las múltiples cadenas α y formar integrinas que unen diferentes ligandos. Este fenómeno de *diversidad combinatoria* permite que una cantidad relativamente pequeña de componentes sirva para un gran número de funciones distintas. Aunque la mayoría de las células expresan varias integrinas distintas que unen los mismos o diferentes ligandos, muchas integrinas se expresan de manera predominante en ciertos tipos de células. No solo muchas integrinas se unen a más de un ligando, sino que varios de sus ligandos se unen a múltiples integrinas.

Todas las integrinas parecen haber evolucionado a partir de dos subgrupos generales ancestrales: aquellos que unen proteínas que contienen la secuencia de tripéptido Arg-Gly-Asp, en general llamada *secuencia RGD* (la fibronectina es una de tales proteínas), y las que unen laminina. Varias subunidades α de las integrinas contienen un dominio distintivo insertado, el *dominio I*, que puede mediar la unión de ciertas integrinas a diversos colágenos en la MEC. Algunas integrinas con dominios I se expresan exclusivamente en leucocitos (glóbulos blancos) y células precursoras de glóbulos blancos y rojos (hematopoyéticas). Los dominios I también reconocen moléculas de adhesión celular sobre otras células, incluyendo miembros de la superfamilia de las Ig (p. ej., las ICAM, las VCAM), y así participan en la adhesión entre célula y célula.

Las integrinas suelen exhibir bajas afinidades por sus ligandos, con constantes de disociación K_d entre 10^{-6} y 10^{-7} mol/L. Sin embargo, las múltiples interacciones débiles generadas por la unión de cientos a miles de moléculas integrinas a sus ligandos sobre las células o en la

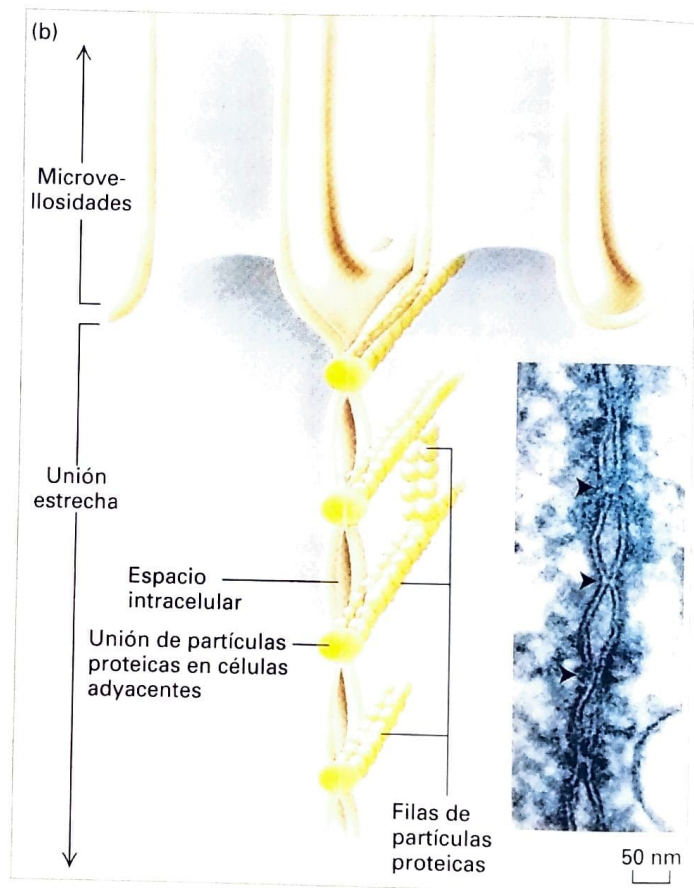
Cuadro 20-3 Integrinas de vertebrados seleccionadas*

Composición de subunidad	Distribución celular primaria	Ligandos
$\alpha 1 \beta 1$	Muchos tipos	Principalmente colágenos
$\alpha 2 \beta 1$	Muchos tipos	Principalmente colágenos; también lamininas
$\alpha 3 \beta 1$	Muchos tipos	Lamininas
$\alpha 4 \beta 1$	Células hematopoyéticas	Fibronectina; VCAM-1
$\alpha 5 \beta 1$	Fibroblastos	Fibronectina
$\alpha 6 \beta 1$	Muchos tipos	Lamininas
$\alpha L \beta 2$	Linfocitos T	ICAM-1, ICAM-2
$\alpha M \beta 2$	Monocitos	Proteínas del suero (p. ej., C3b, fibrinógeno, factor X); ICAM-1
$\alpha IIb \beta 3$	Plaquetas	Proteínas del suero (p. ej., fibrinógeno, factor de von Willebrand, vitronectina); fibronectina
$\alpha 6 \beta 4$	Células epiteliales	Laminina

*Las integrinas están agrupadas en subfamilias que tienen una subunidad β común. Los ligandos mostrados en rojo son CAM, los demás son proteínas séricas o de la MEC. Algunas subunidades pueden tener múltiples isoformas procesadas con dominios citosólicos diferentes.

FUENTE: R. O. Hynes, 1992, *Cell* 69:119.

FIGURA 20-16 Uniones estrechas. (a) Preparación por criofractura de la zona de uniones estrechas entre dos células epiteliales intestinales. El plano de fractura pasa a través de la membrana plasmática de una de las dos células adyacentes. Una red de surcos y crestas similar a un panal de abejas debajo de las microvellosidades constituye la zona de uniones estrechas. (b) Dibujo esquemático que muestra cómo podría formarse una unión estrecha mediante la unión de dos filas de partículas proteicas en células adyacentes. En la microfotografía del recuadro de una sección ultradelgada de una unión estrecha, las células adyacentes se pueden ver en estrecho contacto donde las filas de proteínas interactúan. (Parte [a] cortesía de L. A. Staehelin. Dibujo en parte [b] adaptado de L. A. Staehelin y B. E. Hull, 1978, *Sci Am* **238**:140, y D. Goodenough, 1999, *Proc Natl Acad Sci USA* **96**:319. Fotografía en parte [b] cortesía de S. Tsukita y cols., 2001, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* **2**:285.)



Las uniones estrechas sellan cavidades del cuerpo y restringen la difusión de los componentes de la membrana

Para que las células epiteliales polarizadas funcionen como barreras y mediadores del transporte selectivo, los líquidos extracelulares que rodean las membranas basolateral y apical deben mantenerse separados. Las uniones estrechas entre las células epiteliales adyacentes suelen localizarse en una banda que rodea la célula justo por debajo de la superficie apical y ayuda a establecer y mantener la polaridad de la célula (Figs. 20-10 y 20-16). Estas uniones especializadas forman una barrera que sella las cavidades del cuerpo como el lumen intestinal.

matriz extracelular permiten que una célula permanezca firmemente anclada a su diana que expresa el ligando.

Parte de ambas subunidades α y β de una molécula de integrina contribuyen al sitio de unión al ligando extracelular primario (véase la Fig. 20-2). La unión de las integrinas al ligando también requiere la unión simultánea de cationes divalentes. Al igual que otras moléculas de adhesión de la superficie celular, la región citosólica de las integrinas interactúa con las proteínas adaptadoras que a su vez se unen al citoesqueleto y a moléculas de señalización intracelular. La mayoría de las integrinas están unidas al citoesqueleto de actina, incluyendo dos de las integrinas que conectan la superficie basal de las células epiteliales a la lámina basal a través de la molécula de la MEC, la laminina. Sin embargo, algunos heterodímeros de integrina interactúan con los filamentos intermedios. El dominio citosólico de la cadena $\beta 4$ en la integrina $\alpha 6 \beta 4$ en los hemidesmosomas, que es mucho más largo que los dominios citosólicos de otras integrinas β , se une a proteínas adaptadoras especializadas que a su vez interactúan con filamentos intermedios basados en queratina (véase el Cuadro 20-3).

Como se verá, la diversidad de las integrinas y sus ligandos de la MEC permite a estas participar en una amplia variedad de procesos biológicos claves, que incluyen la respuesta inflamatoria y la migración de células a sus localizaciones correctas en la formación del plan corporal de un embrión (morfogénesis). La importancia de las integrinas en diversos procesos biológicos es resaltada por los defectos que exhiben ratones modificados genéticamente mediante silenciamiento génico para tener mutaciones en diversos genes de subunidades de integrinas. Estos defectos incluyen anomalías importantes en el desarrollo, en la formación de vasos sanguíneos, en la función leucocitaria, en la inflamación, en la remodelación ósea y en la hemostasia. A pesar de sus diferencias, todos estos procesos dependen de las interacciones mediadas por integrinas entre el citoesqueleto y la MEC o las CAM de otras células.

Además de las funciones de adhesión, las integrinas pueden mediar la señalización desde afuera hacia adentro y desde adentro hacia afuera (véase la Fig. 20-8). El engranaje de las integrinas por sus ligandos extracelulares puede, por medio de las proteínas adaptadoras unidas a la región citosólica de la integrina, influenciar el citoesqueleto y las vías de señalización intracelular (señalización desde afuera hacia adentro). Por el contrario, las vías de señalización intracelular pueden alterar, a partir del citoplasma, la estructura de las integrinas y en consecuencia sus capacidades para adherirse a sus ligandos extracelulares y mediar las interacciones entre célula y célula y entre célula y matriz (señalización desde adentro hacia afuera). Las vías de señalización mediada por integrinas influyen en procesos tan diversos como la supervivencia celular, la proliferación celular y la muerte celular programada (véase el Cap. 21).

nal y separa la sangre del líquido cefalorraquídeo del sistema nervioso central (p. ej., la barrera sangre-cerebro).

Las uniones estrechas evitan la difusión de macromoléculas y que, a escalas diferentes, moléculas pequeñas solubles en agua e iones atraviesen una lámina epitelial a través de los espacios entre las células. También contribuyen a mantener la polaridad de las células epiteliales al evitar la difusión de proteínas de membrana y glucolípidos entre las regiones apical y basolateral de la membrana plasmática, lo cual asegura que estas regiones contengan distintos componentes de membrana. En efecto, las composiciones lipídicas de las regiones apical y basolateral de la lamela son diferentes. En esencia, todos los glucolípidos están restringidos a la cara exoplasmática de la membrana apical, como lo están las proteínas unidas a la membrana a través de un anclaje glucosilfosfatidilinositol (GPI) (véase la Fig. 10-19). Por el contrario, las regiones apical y basolateral de la lamela citosólica tienen composición uniforme de membrana en las células epiteliales; sus lípidos y proteínas pueden difundir lateralmente desde una región a la otra.

Las uniones estrechas están compuestas por bandas delgadas de proteínas de membrana plasmática que encierran completamente la célula y están en contacto con bandas similares delgadas en células adyacentes. Cuando las secciones delgadas de células son vistas en un microscopio electrónico, las superficies laterales de células adyacentes parecen estar en contacto entre sí a intervalos e incluso fusionarse en la zona justo por debajo de la superficie apical (véase la Fig. 20-10b). En preparaciones de criofractura, las uniones estrechas aparecen como una red de crestas y surcos en la membrana plasmática (Fig. 20-16a). Amplificaciones muy grandes revelan que las hileras de partículas proteicas de 3-4 nm de diámetro forman las crestas vistas en las microfotografías de criofracturas de las uniones estrechas. En el modelo mostrado en la Figura 20-16b, la unión estrecha está formada por una hilera doble de estas partículas, una hilera donada por cada célula. El tratamiento de un epitelio con la proteasa tripsina destruye las uniones estrechas; esto avala el supuesto de que las proteínas son componentes estructurales esenciales de estas uniones.

Las dos principales proteínas integrales de membrana encontradas en las uniones estrechas son la *occludina* y la *claudina* (del latín “para cerrar”). Cuando los investigadores diseñaron ratones modificados genéticamente con mutaciones que inactivaban la formación de uniones estrechas, descubrieron con sorpresa que el ratón aún tenía las uniones estrechas morfológicamente distintivas. Análisis posteriores llevaron al descubrimiento de la claudina. Cada una de estas proteínas tiene cuatro hélices α que atraviesan la membrana (Fig. 20-17). Otra proteína de unión estrecha, la *tricelulina*, también tiene esta estructura. La tricelulina se concentra en las uniones donde coinciden tres células (véanse las Figs. 20-12 y 20-17). La familia multigénica claudina codifica al menos 24 proteínas homólogas que presentan diferentes patrones de expresión específicos de tejidos. Se ha encontrado que un grupo de *moléculas de adhesión de las uniones* (JAM) también contribuye a la adhesión homófila y a otras funciones de las uniones estrechas. JAM y otras proteínas de unión, el receptor de *coxsackievirus* y *adenovirus* (CAR), contienen una única hélice α transmembrana y pertenecen a la superfamilia de las Ig de las CAM. En apariencia, los dominios extracelulares de las hileras de occludina, claudina y proteínas JAM en la membrana plasmática de una célula forman conexiones extremadamente fuertes con hileras similares de las mismas proteínas en una célula adyacente, lo que crea un sellamiento fuerte. La adhesión mediada por cadherina

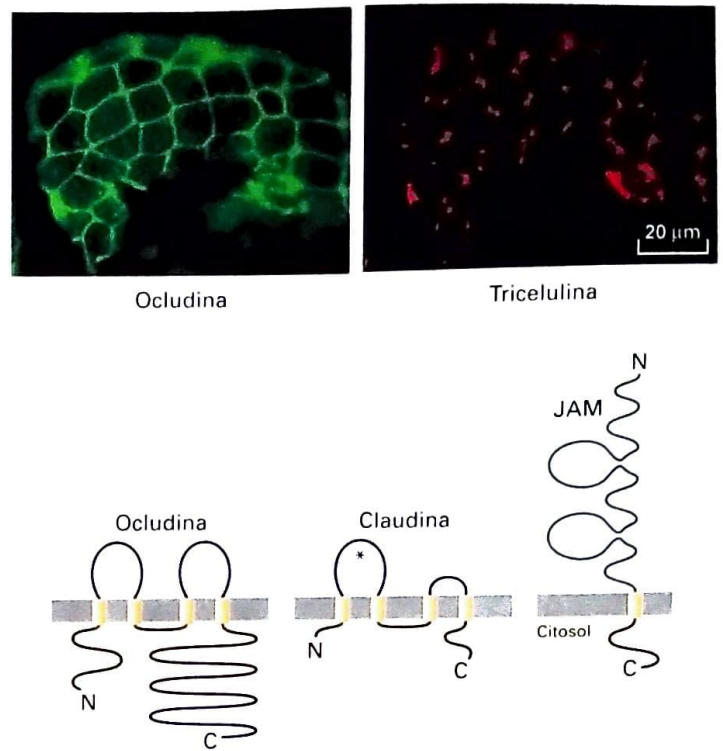


FIGURA 20-17 Proteínas que median las uniones estrechas. Como se muestra en estos dibujos esquemáticos de las principales proteínas en las uniones estrechas, tanto la occludina como las claudinas contienen cuatro hélices transmembrana, donde la molécula de adhesión a la unión (JAM) tiene un único dominio transmembrana y una gran región extracelular. El asa extracelular de las claudinas que contribuye significativamente a la selectividad de ion paracelular está indicada por un asterisco. Recuadro: localización inmunofluorescente de la occludina (verde) y la tricelulina (rojo) en el epitelio intestinal murino. Nótese cómo la tricelulina está concentrada predominantemente en las uniones tricelulares. Barra, 20 μ m. (Dibujo inferior adaptado de S. Tsukita y cols., 2001, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2:285. Recuadro de J. Ikenouchi y cols., 2005, *J. Cell Biol.* 171:939-945. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells.)

dependiente de Ca^{2+} también cumple una función importante en la formación, la estabilidad y la función de las uniones estrechas.

El segmento citosólico largo C-terminal de la occludina se une a los dominios PDZ en algunas proteínas citosólicas adaptadoras grandes. Los *dominios PDZ* son de alrededor de 80 a 90 aminoácidos de longitud y se encuentran en diversas proteínas citosólicas; median la unión a otras proteínas citosólicas o al extremo C-terminal de proteínas de la membrana plasmática particular. Las proteínas citosólicas que contienen un dominio PDZ suelen tener más de uno de ellos. En el genoma humano, hay ~250 dominios PDZ que se encuentran en alrededor de 100 proteínas. Las proteínas con múltiples dominios PDZ pueden servir como andamios para ensamblar proteínas en complejos funcionales más grandes. Las proteínas adaptadoras que contienen PDZ asociadas con la occludina están unidas, a su vez, a otras proteínas de señalización y del citoesqueleto y a las fibras de actina. Estas interacciones parecen estabilizar la conexión entre las moléculas de occludina y claudina, esencial para el mantenimiento de la integridad de las uniones estrechas. El extremo C terminal de las claudinas también se une a la proteína adaptadora intracelular ZO-1, que contiene múltiples dominios PDZ y que también se encuentra en las uniones de adherencia (véase la Fig. 20-13).

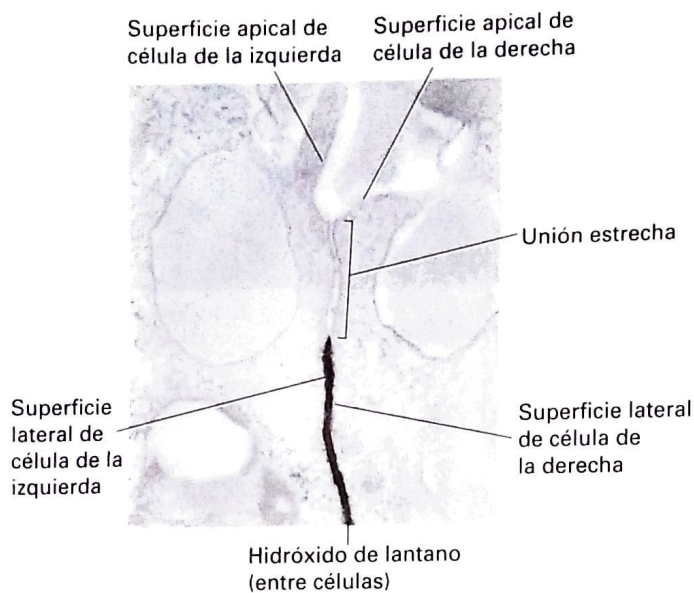


FIGURA EXPERIMENTAL 20-18 Las uniones estrechas evitan el paso de moléculas grandes a través del espacio extracelular entre las células epiteliales. Las uniones estrechas en el páncreas son impermeables al gran coloide soluble en agua hidróxido de lantano (tinción oscura) administrado desde el lado basolateral del epitelio. [Cortesía de D. Friend]

Por ende, al igual que en el caso de las uniones de adherencia y los desmosomas, las proteínas adaptadoras citosólicas y sus conexiones al citoesqueleto son componentes cruciales de las uniones estrechas.

Un experimento simple demuestra la impermeabilidad de las uniones estrechas a algunas sustancias solubles en agua. En este experimento, se inyecta hidróxido de lantano (un coloide denso en electrones de alto peso molecular) a los vasos sanguíneos pancreáticos de un animal experimental; unos minutos más tarde, las células epiteliales pancreáticas acinares se fijan y se preparan para microscopía. Como se muestra en la Figura 20-18, el hidróxido de lantano se difunde desde la sangre hasta el espacio que separa las superficies laterales de células acinares adyacentes, pero no puede penetrar más pasando las uniones estrechas.

Como consecuencia de las uniones estrechas, el movimiento de muchos nutrientes a través del epitelio intestinal no puede ocurrir entre las células y en gran parte se logra por la *vía transcelular* mediante proteínas específicas de transporte unidas a membrana (véanse las Figs. 11-30 y 20-19). Sin embargo, la barrera para la difusión provista por las uniones estrechas no es absoluta y exhibe permeabilidad selectiva de iones y de tamaño. La importancia de esta permeabilidad selectiva es resaltada por la conservación evolutiva de las moléculas que la establecen y de enfermedades que surgen cuando son interrumpidas. Por ejemplo, los embriones murinos no pueden desarrollarse adecuadamente si se interrumpe la permeabilidad selectiva debido a que no es posible mantener el adecuado equilibrio de líquidos a los lados diferentes del epitelio. De manera similar, los riñones dependen de la adecuada permeabilidad de las uniones estrechas para establecer los gradientes de iones necesarios para la regulación normal de los líquidos corporales y la eliminación de desperdicios. Debido, al menos en parte, a las propiedades variables de los diferentes tipos de moléculas claudina localizadas en uniones estrechas diferentes, la permeabilidad de las uniones estrechas a iones, moléculas pequeñas y agua varía enormemente entre los distintos tejidos epiteliales. En los epitelios con unio-

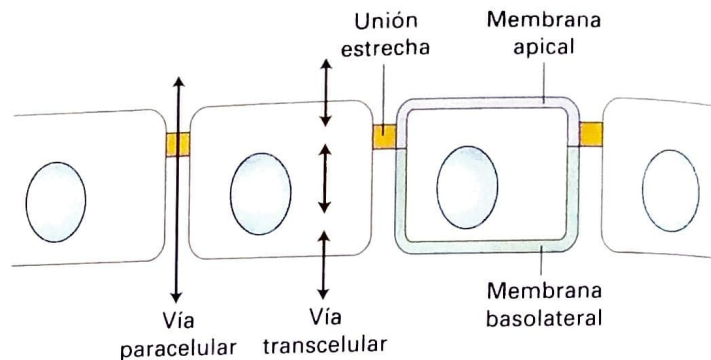


FIGURA 20-19 Las vías transcelular y paracelular del transporte transepitelial. El transporte transepitelial requiere la captación celular de moléculas sobre un lado y la posterior liberación por el lado opuesto mediante los mecanismos analizados en el Capítulo 11. En el transporte paracelular, las moléculas se mueven extracelularmente a través de partes de las uniones estrechas, cuya permeabilidad a las moléculas pequeñas y los iones depende de la composición de los componentes de unión y el estado fisiológico de las células epiteliales. (Adaptado de S. Tsukita y cols., 2001, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:285.)

nes estrechas selectivamente permeables, ciertas moléculas pequeñas e iones pueden moverse desde un lado de la capa celular hasta la otra a través de la *vía paracelular*, además de mediante la vía transcelular (Fig. 20-19). Se cree que una de las vueltas extracelulares en las claudinas (véase la Fig. 20-17) cumple una función principal en la definición de la permeabilidad selectiva conferida sobre las uniones estrechas por isoformas específicas de la claudina.

La permeabilidad de las uniones estrechas se puede alterar por las vías de señalización extracelular, en especial la proteína G y las vías acopladas al AMP citoplasmático (véase el Cap. 15). La regulación de la permeabilidad de la unión estrecha suele ser estudiada por medición del flujo de iones (resistencia eléctrica) o por el movimiento de moléculas radioactivas o fluorescentes a través de monocapas de MDCK u otras células epiteliales (resistencia transepitelial).

 La importancia del transporte paracelular se evidencia en diversas enfermedades humanas. En la hipomagnesemia hereditaria, los defectos en el gen *claudina16* evitan el flujo paracelular normal de magnesio en los riñones. Esto produce una concentración sanguínea anormalmente baja de magnesio, que puede llevar a convulsiones. Por otra parte, una mutación en el gen *claudina 14* causa sordera hereditaria, aparentemente por alteración del transporte alrededor del epitelio de las células pilosas en la cóclea del oído interno.

Algunos patógenos han evolucionado para explotar las moléculas en las uniones estrechas. Algunos utilizan las proteínas de las uniones como correceptores para adherirse inicialmente a células antes de infectarlas (p. ej., el virus de hepatitis C utiliza *claudina1* y *occludina*, junto con otros dos “correceptores,” para entrar en las células hepáticas). Otros degradan la barrera de las uniones y atraviesan el epitelio a través del movimiento paracelular, y otros producen toxinas que alteran la función de la barrera (ya sea desde el espacio extracelular o del intracelular). Por ejemplo, las toxinas producidas por *Vibrio cholerae*, la bacteria entérica que causa cólera, alteran la barrera de permeabilidad del epitelio intestinal al modificar la composición o la actividad de las uniones estrechas. *Vibrio cholerae* también libera una proteasa que interrumpe las uniones estrechas

mediante degradación de la parte extracelular de la ocludina. Otras toxinas bacterianas pueden afectar la actividad de bombeo de iones de proteínas de transporte de membrana en las células epiteliales intestinales. Los cambios inducidos por las toxinas en la permeabilidad de las uniones estrechas (transporte paracelular incrementado) y en el bombeo de iones mediado por proteínas (transporte transcelular incrementado) puede dar como resultado la pérdida masiva de iones corporales internos y de agua hacia el aparato gastrointestinal, lo que a su vez produce diarrea y deshidratación potencialmente mortal (véase el Cap. 11). ■

Las uniones de hendidura compuestas por conexinas permiten que moléculas pequeñas pasen directamente entre células adyacentes

Las primeras microfotografías electrónicas de células en los tejidos revelaban sitios de contacto entre célula y célula con una hendidura intercelular característica (Fig. 20-20a). Esta característica se encontró prácticamente en todas las células animales en contacto e impulsó tempranamente a los morfólogos a llamar a estas regiones uniones de hendidura. En retrospectiva, la característica más importante de estas uniones no es la hendidura de ~2-4 nm en sí misma, sino un conjunto bien definido de partículas cilíndricas que atraviesan la hendidura y componen los poros que conectan los citoplasmas de células adyacentes.

En muchos tejidos, en cualquier lugar desde unas pocas hasta cientos de partículas de uniones de hendidura se agrupan y forman regiones (p. ej., a lo largo de las superficies laterales de las células epiteliales; véase la Fig. 20-10). Cuando la membrana plasmática se purifica y luego se secciona en fragmentos pequeños, se generan algunas piezas que contienen sobre todo regiones de uniones de hendidura. Debido a sus contenidos de proteínas relativamente alto, estos fragmentos tienen una densidad mayor que la del resto de la membrana plasmática y es posible purificarlos mediante centrifugación en equilibrio de gradiente de densidad (véase la Fig. 9-26). Cuando se visualizan estas preparaciones perpendiculares a la membrana, las uniones de hendidura aparecen como estructuras de partículas hexagonales que contienen canales llenos de agua (Fig. 20-20b).

El tamaño efectivo del poro de las uniones de hendidura puede medirse al inyectar una célula con un colorante fluorescente unido covalentemente a moléculas impermeables de la bicapa de diversos tamaños y observando con un microscopio de fluorescencia si el colorante pasa a las células vecinas. Las uniones de hendidura entre las células de mamífero permiten el paso de moléculas tan grandes como de 1,2 nm de diámetro. En los insectos, estas uniones son permeables a moléculas tan grandes como de 2 nm de diámetro. En general, las moléculas menores de 1 200 Da pasan libremente y aquellas más grandes de 2 000 Da no pasan; el paso de moléculas de tamaño intermedio es variable y limitado. Por ende los iones, muchos precursores de bajo peso molecular de macromoléculas celulares, los intermediarios de metabolismos y las moléculas de señalización intracelular pequeñas pueden pasar desde una célula a otra a través de las uniones de hendidura.

En el tejido nervioso, algunas neuronas están conectadas por uniones de hendidura a través de las cuales pasan rápidamente iones, lo que de esta forma permite la transmisión muy rápida de señales eléctricas. La transmisión de los impulsos a través de estas conexio-

nes, llamadas sinapsis eléctricas, es casi mil veces más rápida que las sinapsis químicas (véase el Cap. 22). Las uniones de hendidura también están presentes en muchos tejidos neuronales, donde ayudan a integrar las actividades eléctricas y metabólicas de muchas células. En el corazón, por ejemplo, las uniones gap pasan rápidamente señales iónicas entre las células musculares, donde están interconectadas con fuerza a través de los desmosomas, y así contribuyen a la contracción coordinada eléctricamente estimulada de las células del músculo cardíaco durante un latido. Como se analizó en el Capítulo 15, algunas señales hormonales extracelulares inducen la producción o la liberación de moléculas de señalización extracelular llamados **segundos mensajeros** (p. ej., AMP cíclico, IP_3 y Ca^{2+}) que regulan el metabolismo celular. Debido a que los segundos mensajeros pueden ser transferidos entre células a través de las uniones de hendidura, la estimulación hormonal de una célula puede desencadenar una respuesta coordinada por esa misma célula, como así también por muchas de sus vecinas. Tal señalización mediada por uniones de hendidura cumple una función importante, por ejemplo, en la secreción de enzimas digestivas por el páncreas y en las ondas de contracción muscular coordinadas (peristalsis) en el intestino. Otro ejemplo conocido de transporte mediado por uniones de hendidura es el fenómeno de *acoplamiento metabólico*, o *cooperación metabólica*, en el cual una célula transfiere nutrientes o metabolitos intermediarios a una célula vecina que en sí misma es incapaz de sintetizarlos. Las uniones de hendidura cumplen un papel crucial en el desarrollo de las células huevo en los ovarios al mediar el movimiento tanto de metabolitos como de moléculas de señalización entre un ovocito y sus células granulosas que lo rodean, como así también entre las células granulosas vecinas.

En la Figura 20-20c, d, e se muestra un modelo actual de la estructura de la unión de hendidura. Las uniones de hendidura de vertebrados están compuestas por **conexinas**, una familia de proteínas transmembranas estructuralmente relacionadas con pesos moleculares entre 26 000 y 60 000. Una familia completamente distinta de proteínas, las **inexinas**, forman uniones en invertebrados. Se ha encontrado una tercera familia de proteínas del tipo inexcina, llamadas **panexinas**, tanto en vertebrados como en invertebrados. Cada partícula hexagonal de vertebrados consiste en 12 moléculas de conexinas asociadas en forma no covalente: seis forman un hemicanal conexón cilíndrico en una membrana plasmática que está unida a un hemicanal conexón en la membrana celular adyacente y forman el canal acuoso continuo (diámetro ~14 Å) entre las células. Cada molécula de conexina individual tiene cuatro hélices α que atraviesan la membrana con una topología similar a la de la ocludina (véase la Fig. 20-17), lo que da como resultado 24 hélices α transmembrana en cada hemicanal. Las panexinas también son capaces de formar canales intracelulares; sin embargo, los hemicanales de panexcina también pueden funcionar para permitir el intercambio directo entre los espacios intracelulares y extracelulares.

Existen 21 genes de conexinas diferentes en los seres humanos, con distintos grupos de conexinas expresados en diversos tipos celulares. Esta diversidad, junto con la generación de ratones mutantes con mutaciones inactivantes en los genes de conexina, ha resaltado la importancia de las conexinas en una amplia variedad de sistemas celulares. Algunas células expresan una única conexina que forma canales homotípicos. No obstante, la mayoría de las células expresan al menos dos conexinas; estas diferentes proteínas se ensamblan para formar el conexón heteromérico. La diversidad de la composición de canales lleva a diferencias en

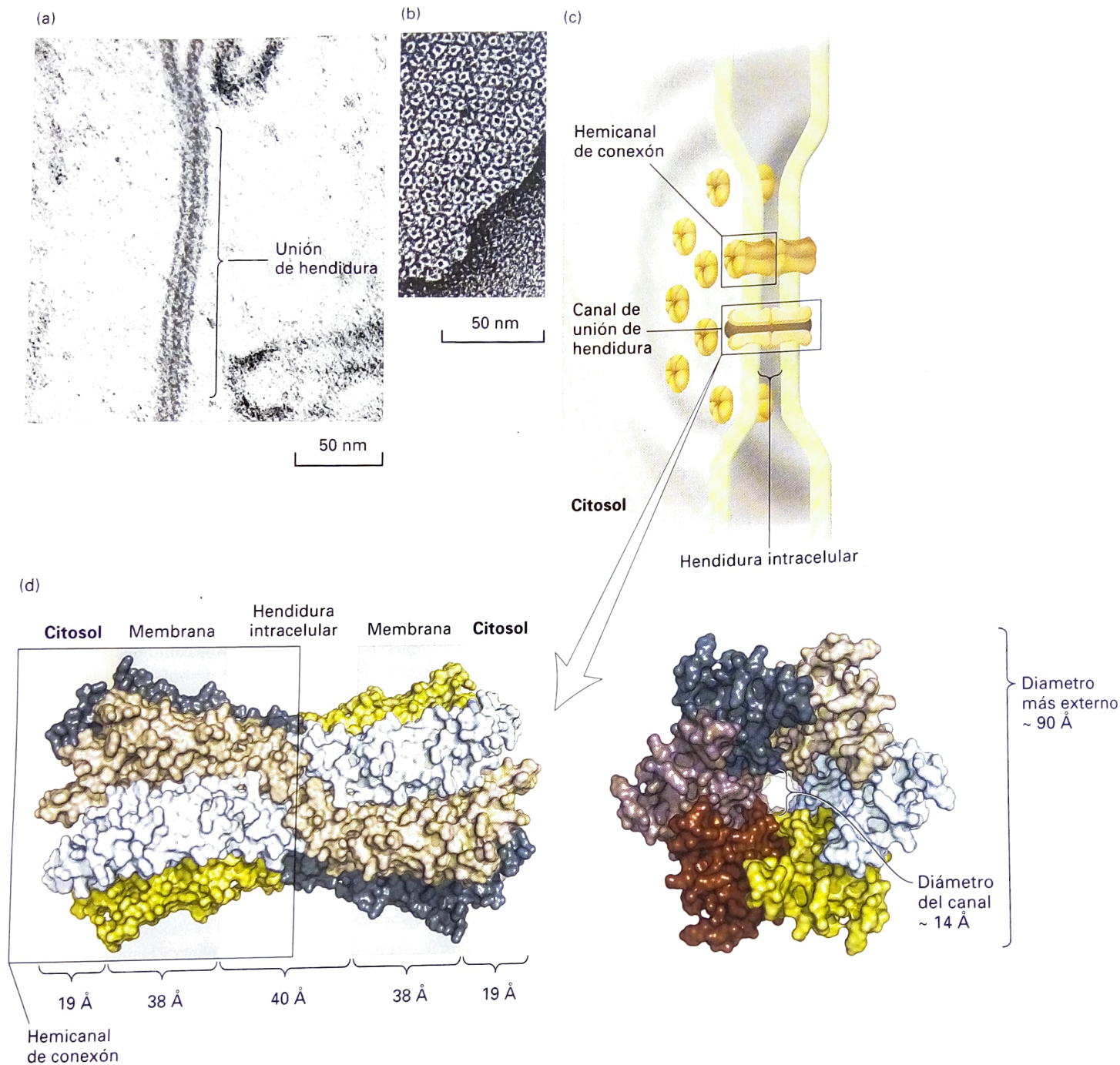


FIGURA 20-20 Uniones de hendidura. (a) En esta sección delgada a través de una unión de hendidura que conecta dos células hepáticas murinas, las dos membranas plasmáticas están estrechamente asociadas a una distancia de varios cientos de nanómetros, separadas por una "hendidura" de 2-3 nm. (b) En esta vista perpendicular de la cara citosólica de una región de la membrana plasmática en las uniones de hendidura, se visualizan numerosas partículas apenas hexagonales. Cada partícula se alinea con una partícula similar sobre una célula adyacente y forma un canal que conecta las dos células. (c) Modelo esquemático de una unión de hendidura que conecta dos membranas plasmáticas. Ambas membranas contienen hemicanales conexones, cilindros de seis moléculas de conexina con forma de mancuerna. Los dos conexones se unen en la hendidura entre las células para formar un canal de unión de hendidura, 1,5-2,0 nm de diámetro, que conecta los citosoles de dos

células. (d) Modelo de canal conexón de unión de hendidura Cx26 humana recombinante determinado por cristalografía de rayos X (resolución 3,5 Å). (Izquierda) Modelo espacial de una vista lateral de la estructura completa de dos hemicanales adheridos orientados como en la parte (c). Cada una de estas seis conexinas que comprenden un hemicanal de conexón tiene cuatro hélices transmembrana y un color diferente. Las estructuras de las asas que conectan las hélices transmembranas no están bien definidas y no se muestran. (Derecha) Vista desde el citosol perpendicular a las bicapas, mirando hacia el conexón con su poro central. El diámetro del canal del poro es ~14 Å y está recubierto por muchos aminoácidos polares/cargados. (Parte [a] cortesía de D. Goodenough; parte [b] cortesía de N. Gilula; parte [d] adaptado de S. Nakagawa y cols., 2010, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **20**(4):423-430)

la permeabilidad del canal. Por ejemplo, los canales formados a partir de una isoforma de conexina de 43 kDa, la Cx43 –la conexina con expresión más ubicua– son más de 100 veces más permeables al ADP y al ATP que aquellos formados a partir de Cx32 (32 kDa).

La permeabilidad de las uniones de hendidura está regulada por la modificación postraduccional de las conexinas (p. ej., fosforilación) y es sensible a los cambios ambientales como el pH intracelular y las concentraciones de Ca^{2+} , el potencial de membrana y diferencias en el potencial intracelular entre células adyacentes interconectadas (“regulación de apertura de canales por voltaje”). El N-terminal de las conexinas parece tener especial importancia en el mecanismo de apertura de canales. Un ejemplo de la regulación fisiológica de las uniones de hendidura se produce durante el nacimiento de mamíferos. Las células musculares en el útero de mamífero deben contraerse fuertemente y en forma sincronizada durante el trabajo de parto para expeler el feto. Para facilitar esta actividad coordinada, inmediatamente antes y durante el parto existe un incremento aproximado de cinco a diez veces en la cantidad de conexina miometrial principal, la Cx43, y un aumento en el número y el tamaño de las uniones de hendidura, que disminuyen rápidamente después del parto.

El ensamblaje de las conexinas, su tránsito dentro de las células y la formación de uniones de hendidura funcionales aparentemente dependen de la N-cadherina y sus proteínas adaptadoras asociadas (p. ej., las α y β cateninas, ZO-1 y ZO-2) como así también de las proteínas desmosómicas (placoglobina, desmoplaquina y placofilina-2). Los dominios PDZ en ZO-1 y ZO-2 se unen al C-terminal de Cx43 y median su interacción con las cateninas y la N-cadherina. La relevancia de estas relaciones es en particular evidente en el corazón, que depende de las uniones de hendidura para el acoplamiento eléctrico coordinado, y sobre las uniones de adherencia adyacentes y los desmosomas para el acoplamiento mecánico entre los cardiomiocitos para lograr la integración intercelular de la actividad eléctrica y el movimiento requerido para la función cardíaca normal. Cabe destacar que ZO-1 sirve como un adaptador para las uniones de adherencia (véase la Fig. 20-13), las uniones estrechas y las de hendidura, lo cual sugiere que este y otros adaptadores pueden ayudar a integrar la formación y las funciones de estas uniones diversas.



Las mutaciones en los genes de conexina causan al menos ocho enfermedades humanas, incluyendo la sordera neurosensorial (Cx26 y Cx31), malformaciones cardíacas o cataratas (Cx43, Cx46 y Cx50) y la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth ligada al cromosoma X (Cx32), que está marcada por la degeneración progresiva de los nervios periféricos. ■

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 20.2

Uniones entre células y entre célula y MEC y sus moléculas de adhesión

- Las células epiteliales polarizadas tienen superficies apical, basal y lateral diferentes. Las microvellosidades que se proyectan desde las superficies apicales de muchas células epiteliales expanden de manera considerable la superficie celular.

- Tres importantes clases de uniones celulares (las uniones de anclaje, las uniones estrechas y las uniones de hendidura) se ensamblan en las células epiteliales para formar láminas y mediar la comunicación entre ellas (véanse las Figs. 20-1 y 20-10). A su vez, las uniones de anclaje pueden subdividirse en uniones de adherencia, desmosomas y hemidesmosomas.

- Las uniones de adherencia y los desmosomas son uniones de anclaje que contienen cadherina, que une las membranas de células adyacentes y otorga fuerza y rigidez a todo el tejido.

- Las cadherinas son moléculas de adhesión celular (CAM) responsables de las interacciones dependientes de Ca^{2+} entre las células en los tejidos epiteliales y otros. Promueven una fuerte adhesión entre célula y célula al mediar tanto las interacciones intracelulares laterales como las intercelulares.

- Las proteínas adaptadoras que se unen al dominio citosólico de las cadherinas y otras CAM y receptores de adhesión median la asociación del citoesqueleto y de moléculas de señalización con la membrana plasmática (véanse las Figs. 20-8 y 20-13). La fuerte adhesión entre célula y célula depende de la unión de las CAM interactuantes con el citoesqueleto.

- Los hemidesmosomas son uniones de anclaje que contienen integrinas que adhieren las células a elementos de la matriz extracelular subyacente.

- Las integrinas son una familia grande de proteínas de la superficie celular $\alpha\beta$ heterodiméricas que median tanto las adhesiones entre célula y célula como entre célula y matriz y la señalización desde adentro hacia afuera y desde afuera hacia dentro en numerosos tejidos.

- Las uniones estrechas bloquean la difusión de proteínas y algunos lípidos en el plano de la membrana plasmática, lo cual contribuye a la polaridad de las células epiteliales. También limitan y regulan el flujo extracelular (paracelular) del agua y los solutos desde un lado del epitelio hasta el otro (véase la Fig. 20-19). Las dos principales proteínas integrales de membrana que se encuentran en las uniones estrechas son la *occludina* y la *claudina*.

- Las uniones de hendidura se construyen a partir de múltiples copias de proteína conexina, ensambladas para formar un canal transmembrana que interconecta los citoplasmas de dos células adyacentes (véase la Fig. 20-20). Las moléculas pequeñas y los iones pueden pasar a través de las uniones de hendidura permitiendo así el acoplamiento eléctrico y metabólico de células adyacentes.

20.3 La matriz extracelular I: la lámina basal

En los animales, la matriz extracelular (MEC) ayuda a organizar las células en tejidos y a coordinar sus funciones celulares mediante la activación de vías de señalización intracelular que controlan el crecimiento, la proliferación y la expresión génica celular. La MEC puede influir directamente en la estructura y la función celular y tisular. Además, puede servir como reposición de moléculas de señalización inactivas o inaccesibles (p. ej., factores de crecimiento) que son libe-

rados para actuar cuando la MEC es desensamblada o remodelada por las hidrolasas, como las proteasas. En efecto, los fragmentos hidrolizados de las macromoléculas de la MEC pueden en sí mismas tener actividad biológica independiente. Muchas funciones de la matriz requieren receptores de adhesión transmembrana, incluyendo las integrinas que se unen directamente a los componentes de la MEC y que también interactúan, a través de proteínas adaptadoras, con el citoesqueleto.

Los receptores de adhesión se unen a tres tipo de moléculas abundantes de la matriz extracelular de todos los tejidos (véase el Cuadro 20-1):

- Los **proteoglicanos**, un grupo de glucoproteínas que sellan las células y unen una amplia variedad de moléculas extracelulares.
- Las **fibras de colágeno**, que proporcionan integridad estructural, fuerza mecánica y resiliencia.
- Las **proteínas multiadhesivas de la matriz**, como la laminina y la fibronectina, que se unen a los receptores de la superficie celular y los entrecruzan, y a otros componentes de la MEC.

Comenzaremos la descripción con las estructuras y las funciones de estos principales componentes de la MEC en el contexto de la lámina basal (lámina de la matriz extracelular especializada que cumplen una función de particular importancia en la determinación de la arquitectura y la función general del tejido epitelial). En la siguiente sección, se analizarán las moléculas de la MEC que se encuentran en los tejidos no epiteliales, incluyendo el tejido conectivo.

La lámina basal proporciona un soporte para el ensamblaje de células en los tejidos

En los animales, la mayoría de los grupos organizados de células en los tejidos epiteliales y no epiteliales están sostenidos o rodeados por lámina basal, una malla laminar de componentes de la MEC de no más de 60-120 nm de espesor (Fig. 20-21). La lámina basal está estructurada de distinto modo en diferentes tejidos. En los epitelios cilíndricos y otros como el revestimiento intestinal y la piel, es una base sobre la cual descansa una sola superficie de células. En otros tejidos, como el músculo o la grasa, la lámina basal rodea cada célula. La lámina basal cumple funciones importantes en la regeneración después del daño tisular y en el desarrollo embrionario. Por ejemplo, la lámina basal ayuda a los embriones de cuatro a ocho células a adherirse juntos en una esfera. En el desarrollo del sistema nervioso, las neuronas migran a lo largo de vías de la MEC que contienen componentes de la lámina basal. En los animales superiores, se utilizan dos láminas basales distintas para formar una fuerte barrera que limita la difusión de moléculas entre la sangre y el cerebro (barrera sangre-cerebro), y en el riñón, una lámina basal especializada sirve como un filtro de sangre de permeabilidad selectiva. En el músculo, la lámina basal contribuye a proteger a las membranas celulares del daño durante la contracción/relajación y evita las distrofias musculares. Así, la lámina basal es importante para la organización de las células en tejidos y compartimientos diferentes, en la reparación tisular, en la formación de barreras de permeabilidad y como guía de células en migración durante el desarrollo. Por lo

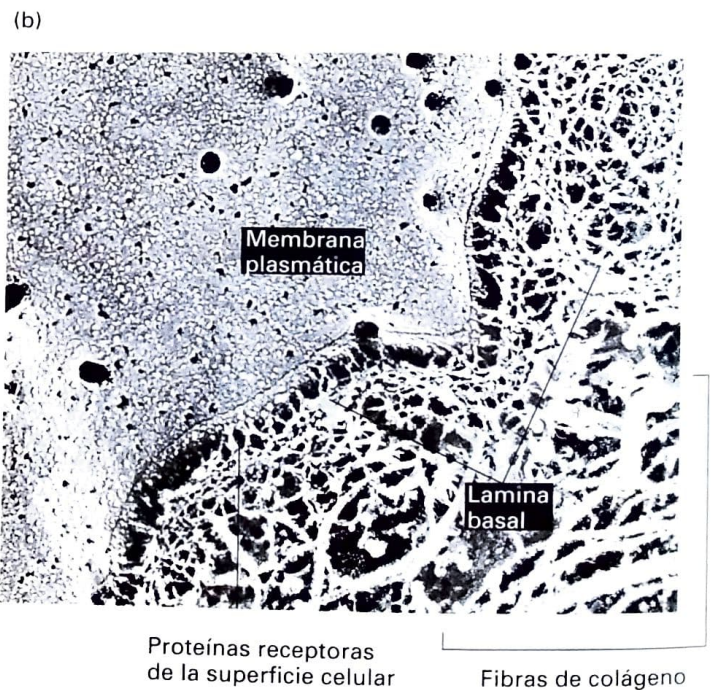
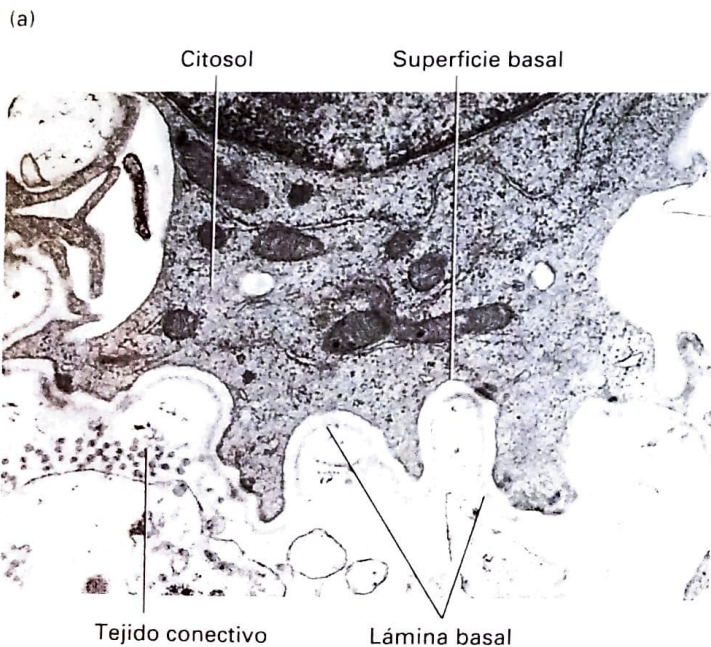


FIGURA 20-21 La lámina basal separa las células epiteliales y algunas otras células del tejido conectivo. (a) Microfotografía electrónica de transmisión de una sección delgada de células (arriba) y tejido conectivo subyacente (abajo). Puede verse que la capa densa de electrones de la lámina basal sigue la ondulación de la superficie basal de las células. (b) Microfotografía electrónica de una preparación de grabado profundo por

congelación rápida del músculo esquelético que muestra la relación de la membrana plasmática, la lámina basal y el tejido conectivo circundante. En esta preparación, la lámina basal se revela como una red de proteínas filamentosas que se asocia con la membrana plasmática y las fibras de colágeno más gruesas del tejido conectivo. (Parte [a] cortesía de P. FitzGerald. Parte [b] © D. W. Fawcett, 1981, *The cell*, 2d ed. Saunders/Photo Researchers; cortesía de John Heuser.)

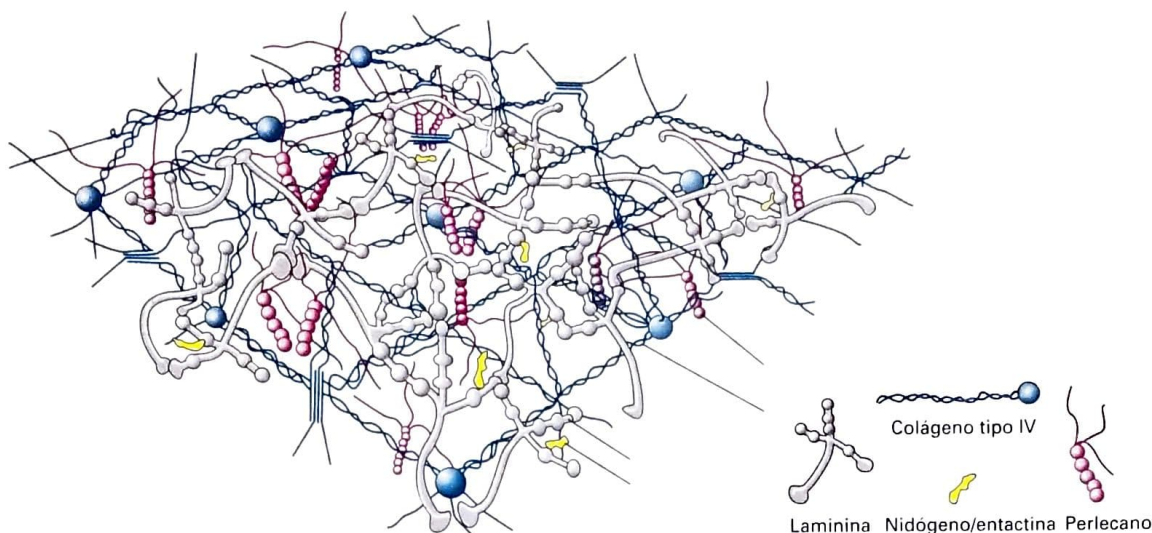


FIGURA 20-21 Principales proteínas componentes de la lámina basal. El colágeno tipo IV y la laminina forman cada una redes bidimensionales que

están entrecruzadas por moléculas de entactina y perlecana. [Adaptado de B. Alberts y cols., 1994, *Molecular Biology of the Cell*, 3d ed. Garland, p. 991.]

tanto, no es sorprendente que los componentes de la lámina basal se hayan conservado en gran medida a través de la evolución.

La mayoría de los componentes de la MEC en la lámina basal son sintetizados por las células que reposan sobre ella. En la lámina basal se encuentran cuatro componentes de proteínas ubicuas (Fig. 20-22):

- **Colágeno tipo IV**, moléculas triméricas con dominios globulares y tipo varilla que forman una red bidimensional.
- **Lamininas**, una familia de proteínas multiadhesivas con forma de cruz que forman una red bidimensional fibrosa con colágeno tipo IV y que también se unen a las integrinas y otros receptores de adhesión.
- **Perlecana**, un proteoglicano multidominio grande que se une y entrecruza muchos componentes de la MEC y moléculas de la superficie celular.
- **Nidógeno** (también conocido como *entactina*), una molécula tipo varilla que entrecruza colágeno tipo IV, perlecana y laminina y ayuda a incorporar otros componentes a la MEC y también estabiliza la lámina basal.

Otras moléculas de la MEC, como los miembros de la antigua familia evolutiva de glucoproteínas llamadas fibulinas, son incorporadas a varias laminas basales, dependiendo del tejido y los requerimientos funcionales particulares de la lámina basal.

Como se describe en la Figura 20-1, un lado de la lámina basal está conectado a las células mediante receptores de adhesión, incluyendo las integrinas en los hemidesmosomas, que se unen a la laminina en la lámina basal. El otro lado de la lámina basal está anclado al tejido conectivo adyacente mediante una capa de fibras de colágeno embebidas en una matriz rica en proteoglicanos. En los epitelios escamosos estratificados (p. ej., piel), esta unión está mediada por fibrillas de anclaje del tipo colágeno tipo IV. Juntas, la lámina basal y las fibrillas de anclaje a colágeno forman la estructura que se denomina *membrana base*.

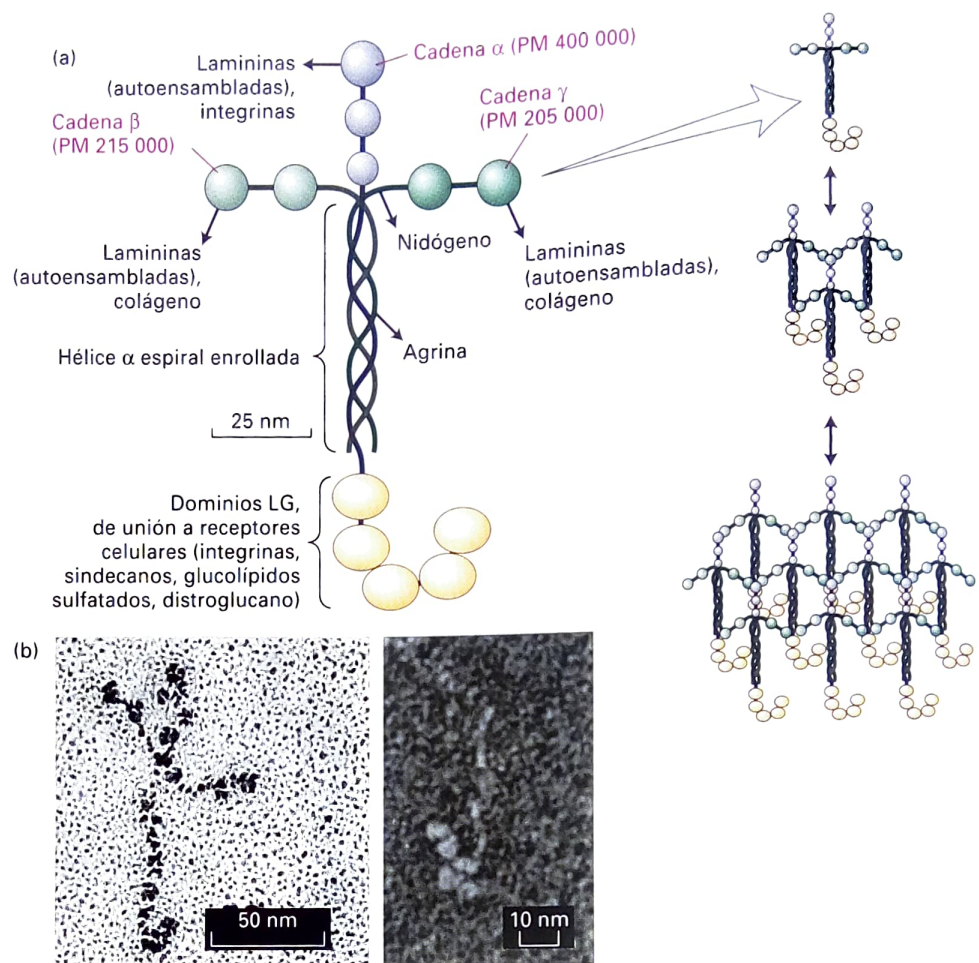
La laminina, una proteína multiadhesiva de la matriz, ayuda a entrecruzar los componentes de la membrana basal

La **laminina**, la principal proteína multiadhesiva de la matriz en la lámina basal, es una proteína heterodimérica que comprende cadenas α , β y γ . Al menos 16 isoformas de laminina en los vertebrados se ensamblan a partir de cinco cadenas α , tres β y tres γ , nombradas para reflejar la composición de cadenas: laminina- $\alpha\beta\gamma$ (p. ej., laminina-111 o laminina-511). Cada laminina exhibe un patrón distintivo de expresión específico de tejido y de estadio del desarrollo. Como se muestra en la Figura 20-23, muchas lamininas son proteínas grandes, con forma cruzada (peso molecular de alrededor de 820 000), aunque algunas tienen forma de Y o de bastón. Los dominios globulares en el N-terminal de cada subunidad se unen a otro y así median el autoensamblaje de las lamininas para formar redes del tipo malla que, junto con sus uniones a los receptores de laminina sobre las células, son esenciales para el ensamblaje de la lámina basal. Cinco **dominios LG** globulares en el extremo C-terminal de la subunidad α de la laminina median la unión dependiente de Ca^{2+} a los receptores de laminina en la superficie celular, incluyendo ciertas integrinas (véase el Cuadro 20-3), como así también los glucolípidos sulfatados, el síndecano y el distroglicano, que se describirán más adelante, en la Sección 20.4. Algunas de estas interacciones se realizan a través de hidratos de carbono cargados negativamente sobre los receptores. Los dominios LG se encuentran en una amplia variedad de otras proteínas y pueden mediar la unión a esteroides y proteínas, como así también a hidratos de carbono. La laminina es el principal ligando de la lámina basal de las integrinas.

El colágeno tipo IV formador de láminas es el principal componente estructural de la lámina basal

El colágeno tipo IV es, junto con la laminina, un componente estructural principal de todas las laminas basales y puede unirse a receptores de

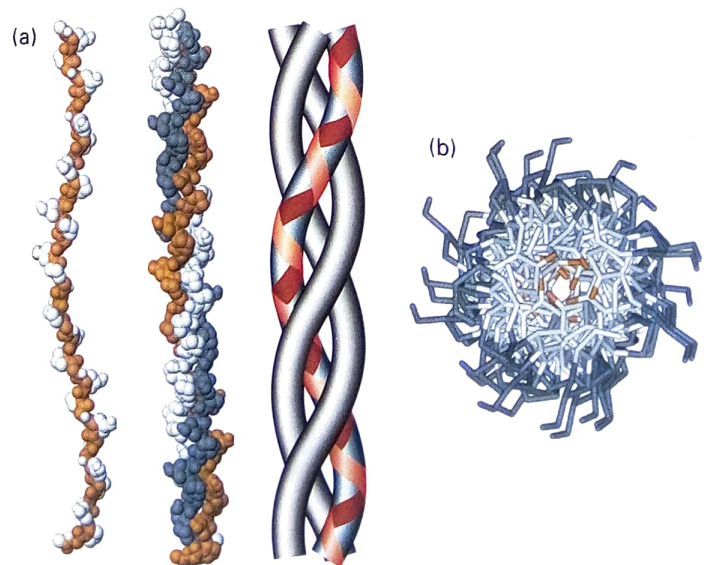
FIGURA 20-23 Laminina, una proteína heterotrimérica multiadhesiva de la matriz que se encuentra en todas las láminas basales. (a) Modelo esquemático de la laminina con forma de cruz que muestra la forma general, la localización de los dominios globulares y la región de espiral enrollada en la cual las tres cadenas de laminina están covalentemente unidas por diversos enlaces disulfuros. Diferentes regiones de laminina se unen a los receptores de superficie celular y varios componentes de la matriz (indicados por flechas). Recuadro: las lamininas se ensamblan en una red a través de interacciones entre sus dominios globulares N-terminales. (b) Microfotografías electrónicas de la molécula intacta de laminina que muestra su apariencia de cruz característica (*izquierda*) y los dominios LG de unión a hidrato de carbono cerca del extremo C-terminal (*derecha*). (Parte [a] adaptada de G. R. Martin y R. Timpl, 1987, *Ann. Rev. Cell Biol.* **3**:57; Durbeej M. Laminins, 2010, *Cell Tissue Res* **339**(1):259-268; y S. Meinen, P. Barzaghi, S. Lin, H. Lochmüller y M. A. Ruegg, 2007, *J. Cell Biol.* **176**(7):979-993. Parte [b] de R. Timpl y cols., 2000, *Matrix Biol.* **19**:309; fotografía en cortesía de Jürgen Engel.)



adhesión, incluyendo algunas integrinas. El colágeno tipo IV es uno de al menos 28 tipos de colágeno en los seres humanos que participan en la formación de matrices extracelulares en varios tejidos (**Cuadro 20-4**). También existen al menos 20 proteínas del tipo colágeno adicionales (como los colágenos de defensa de huéspedes) en el proteoma humano. Aunque los colágenos difieren en ciertas características estructurales y en la distribución de tejido, todos son proteínas triméricas sintetizadas a partir de tres polipéptidos, cada uno de los cuales está codificado por al menos 43 genes en los seres humanos, en general llamadas cadenas α

de colágeno. Las tres cadenas α pueden ser idénticas (homotriméricas) o diferentes (heterotriméricas). Todas las moléculas de colágeno de tres hebras o parte de ellas pueden enroscarse juntas y formar una triple hélice especial llamada hélice triple de *colagenosa*. Cuando existe más de un segmento helicoidal triple, estos segmentos se unen mediante regiones no helicoidales de la proteína. Dentro de un segmento helicoidal, cada una de las tres cadenas α se enrosca en una hélice levógira, y las tres cadenas luego se entrelazan una alrededor de la otra para formar una triple hélice levógira (**Fig. 20-24**).

FIGURA 20-24 La triple hélice de colágeno. (a) (*Izquierda*) Vista lateral de la estructura cristalina de un fragmento polipeptídico cuya secuencia se basa en grupos repetitivos de tres aminoácidos, Gly-X-Y, característica de las cadenas α de colágeno. (*Centro*) Cada cadena gira y forma una hélice levógira, y las tres cadenas se enrollan una alrededor de la otra para formar una triple hélice destrógira. El modelo esquemático (*derecha*) ilustra claramente la naturaleza triple helicoidal de la estructura y muestra el giro levógira de las cadenas individuales de colágeno α (línea roja). (b) Vista vertical del eje de la triple hélice. Las cadenas laterales de protones de los residuos de glicina (naranja) apuntan hacia el espacio muy estrecho entre las cadenas polipeptídicas en el centro de la triple hélice. En las mutaciones del colágeno en las cuales otros aminoácidos reemplazan a la glicina, el protón de la glicina es reemplazado por grupos más grandes que interrumpen el empaquetamiento de las cadenas y desestabilizan la estructura triple helicoidal. (Adaptado de R. Z. Kramer y cols., 2001, *J. Mol. Biol.* **311**:131.)



Tipo	Composición de la molécula	Características estructurales	Tejidos representativos
Colágenos fibrilares			
I	$[\alpha 1(I)]_2[\alpha 2(I)]$	Fibrillas de 30 nm de largo	Piel, tendón, hueso, ligamentos, dentina, tejidos intestinales
II	$[\alpha 1(II)]_2$	Fibrillas de 30 nm de largo	Cartílago, humor vítreo
III	$[\alpha 1(III)]_3$	Fibrillas de 30 nm de largo; a menudo con tipo I	Piel, músculo, vasos sanguíneos
V	$[\alpha 1(V)]_2[\alpha 1(V)], [\alpha 1(V)]_3$	Fibrillas de 390 nm de largo con extensiones globulares en el N-terminal; a menudo, con tipo I	Córnea, dientes, huesos, placenta, piel, músculo liso
Colágenos asociados a fibrilla			
VI	$[\alpha 1(VI)][\alpha 2(VI)][\alpha 3(VI)]$	Asociación lateral con tipo I; dominios globulares periódicos	La mayoría de los tejidos intestinales
IX	$[\alpha 1(IX)][\alpha 2(IX)][\alpha 3(IX)]$	Asociación lateral con tipo II; Dominio globular en el N-terminal; unido a GAG	Cartílago, humor vítreo
Colágenos formadores de lámina y de anclaje			
IV	$[\alpha 1(IV)]_2[\alpha 2(IV)]$	Red bidimensional	Todos lámina basal
VII	$[\alpha 1(VII)]_3$	Fibrillas largas	Por debajo de la lámina basal de la piel
XV	$[\alpha 1(XV)]_3$	Proteína central de proteoglicano condroitín-sulfato	Extendido; cerca de la lámina basal en músculos
Colágenos transmembrana			
XIII	$[\alpha 1(XIII)]_3$	Proteína integral de membrana	Hemidesmosomas en la piel
XVII	$[\alpha 1(XVII)]_3$	Proteína integral de membrana	Hemidesmosomas en la piel
Colágenos de defensa del huésped			
Colectinas		Oligómeros de triple hélice; dominios lectina	Sangre, espacio alveolar
C1q		Oligómeros de triple hélice	Sangre (complemento)
Receptores barrenderos clase A		Proteínas de membranas homotriméricas	Macrófagos

FUENTE: K. Kuhn, 1987, in R. Mayne y R. Burgeson, eds., *Structure and Function of Collagen Types*, Academic Press, p.2 and M. van der Rest and R. Garrone, 1991, *FASEB J.* 5:2814.

La triple hélice de colágeno puede formarse debido a la abundancia inusual de tres aminoácidos: glicina, prolina y una forma modificada de prolina llamada hidroxiprolina (véase la Fig. 2-15). Ellos forman el motivo de secuencia repetitiva característico Gly-X-Y, donde X e Y pueden ser cualquier aminoácido pero por lo general, prolina y hidroxiprolina y con menos frecuencia, lisina e hidroxilisina. La glicina es esencial debido a su cadena lateral pequeña, un átomo de hidrógeno, es la única que puede ajustarse en el centro congestionado de la hélice de triple hebra (véase la Fig. 20-24). Los enlaces de hidrógeno ayudan a mantener las tres cadenas juntas. Aunque las uniones rígidas de prolina-peptidil e hidroxiprolina-peptidil no son comparables con la formación de una hélice α clásica de simple hebra, ellos

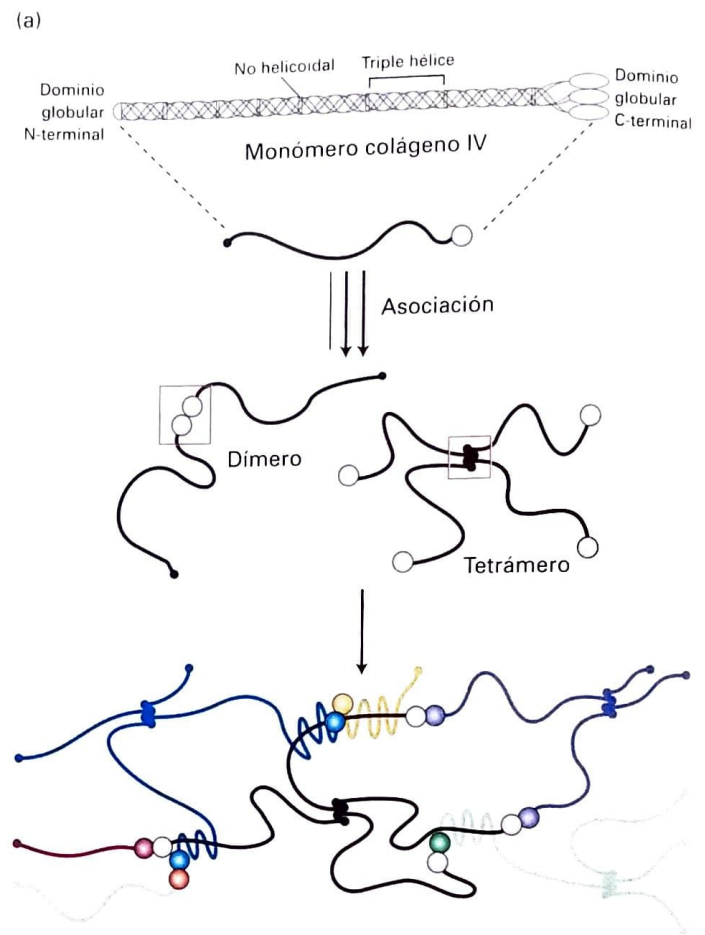
estabilizan la hélice triple hebra distintiva. El grupo hidroxilo en la hidroxiprolina ayuda a mantener su anillo en una conformación que estabiliza la hélice triple hebra.

Existen diversos receptores de superficie celular distintivos para el colágeno IV y otros tipos de colágeno, los cuales se analizan en la siguiente sección. Estos receptores de superficie celular incluyen ciertas integrinas, dominios discoidina receptores 1 y 2 (receptores tiro-sincinasa), glucoproteína IV (plaquetas), receptor 1 tipo Ig asociado a leucocito, miembros de la familia de receptor de manosa y una forma modificada de la proteína CD44. Ellos pueden cumplir funciones cruciales en ayudar al ensamblaje de la MEC y en la integración de la actividad celular con la MEC.

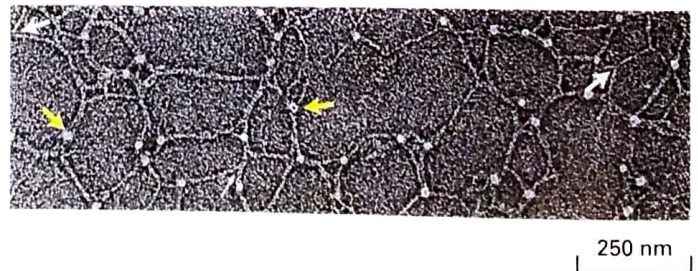
FIGURA 20-25 Estructura y ensamblaje del colágeno tipo IV. (a)

Representación esquemática de colágeno tipo IV. Esta molécula de 400 nm de largo tiene un dominio globular no colagenoso en el extremo N-terminal y un gran dominio globular en el extremo C-terminal. La triple hélice está interrumpida por segmentos no helicoidales que introducen angulaciones flexibles en la molécula. Las interacciones laterales entre los segmentos triples helicoidales, como así también las interacciones cabeza a cabeza y cola con cola entre los dominios globulares, forman dímeros, tetrámeros, y complejos de orden superior, lo que resulta en una red similar a una lámina. Múltiples enlaces inusuales de sulfilimina ($-S=N-$) o enlaces tioéter entre residuos de hidroxilisina (o lisina) y metionina entrecruzan covalentemente algunos dominios C-terminales adyacentes y contribuyen a la estabilidad de la red. (b) Microfotografía electrónica de la red de colágeno tipo IV formada in vitro. La apariencia de encaje es el resultado de la flexibilidad de la molécula, la unión de lado a lado entre los segmentos de triple hélice (flechas blancas) y las interacciones entre los dominios globulares C-terminales (flechas amarillas).

(Parte [a] adaptado de A. Boutaud, 2000, *J. Biol. Chem.* **275**:30716. Parte [b] cortesía de P. Yurchenco, véase P. Yurchenco y G. C. Ruben, 1987, *J. Cell Biol.* **105**:2559)



(b) Hélice tipo IV



Las propiedades únicas de cada tipo de colágeno se deben principalmente a diferencias en (1) el número y las longitudes de los segmentos helicoidales triples de colágeno; (2) los segmentos que flanquean o interrumpen los segmentos triple hélices y que se pliegan en otras clases de estructuras tridimensionales; y (3) la modificación covalente de las cadenas α (p. ej., hidroxilación, glucosilación, oxidación, entrecruzamiento). Por ejemplo, las cadenas en el colágeno tipo IV se designan cadenas $IV\alpha$. Los mamíferos expresan seis cadenas $IV\alpha$ homólogas, que se ensamblan en tres colágenos tipo IV heterotriméricos diferentes con propiedades distintas. Sin embargo, todos los subtipos de colágeno IV forman una triple hélice larga de 400 nm (Fig. 20-25) que es interrumpida alrededor de 24 veces con segmentos no helicoidales y flanqueada por dominios globulares más grandes en el extremo C terminal de las cadenas y más pequeños en el extremo N-terminal. Las regiones no helicoidales introducen flexibilidad en la molécula. A través de las asociaciones como de las interacciones laterales que comprenden los extremos N y C terminal, las moléculas de colágeno tipo IV se ensamblan en una red fibrosa bidimensional irregular y ramificada que forma un entramado sobre el cual, junto con el entramado de laminina, se construye la lámina basal (véanse las Figs. 20-22 y 20-25).

 En el riñón, una lámina basal doble llamada la membrana base glomerular separa el epitelio que recubre el espacio urinario del endotelio que reviste los capilares circundantes llenos de sangre. Los defectos en esta estructura, que es la responsable de la ultrafiltración de la sangre y la formación inicial de orina, pueden llevar a fallas renales. Por ejemplo, mutaciones que alteran el dominio globular C terminal de ciertas cadenas $IV\alpha$ están asociadas con insuficiencia renal progresiva, como así también con pérdida de la audición sensorioneural y anomalías oculares, un trastorno conocido como *síndrome de Alport*. En el *síndrome de Goodpasture*, una enfermedad autoinmunitaria relativamente rara, los anticuerpos se unen a las cadenas $\alpha3$ del colágeno tipo IV que se encuentran en la membrana

base glomerular y en los pulmones. Estas uniones desencadenan una respuesta inmunitaria que causa daño celular que provoca insuficiencia renal progresiva y hemorragias pulmonares. ■

El perlecano, un proteoglucano, forma enlaces cruzados entre los componentes de la lámina basal y los receptores de la superficie celular

El **perlecano**, el principal proteoglucano secretado en la lámina basal, consiste en una proteína centro multidominio grande (~470 kDa) constituida por repeticiones de cinco dominios distintos, que incluyen dominios LG del tipo laminina y dominios de Ig. Las numerosas repet-

cciones globulares otorgan la apariencia de un collar de perlas cuando es visualizado con microscopía electrónica; de allí el nombre de perleciano. El perleciano es una glucoproteína que contiene tres tipos de cadenas de polisacáridos covalentes: *N*-unido (véase el **Cap. 14**), *O*-unido y los glucosaminoglucanos (GAG) (los azúcares *O*-unidos y los GAG se analizan a continuación, en la **Sección 20.4**). Los GAG son polímeros largos de repetición de disacáridos. Las glucoproteínas que contienen cadenas GAG unidas covalentemente se denominan **proteoglucanos**. La proteína que constituye un proteoglucano suele denominarse proteína centro, sobre la cual se adhieren las cadenas de GAG. Tanto la proteína como los componentes GAG del perleciano contribuyen a su capacidad para incorporarse y definir la estructura y función de la lámina basal. Debido a sus múltiples dominios y cadenas de polisacáridos que tienen propiedades de unión distintas, el perleciano se une a docenas de otras moléculas, incluyendo otros componentes de la MEC (p. ej., laminina, nidógeno), receptores de la superficie celular y factores de crecimiento polipeptídico. La unión simultánea a estas moléculas da como resultado el entrecruzamiento mediado por el perleciano. El perleciano puede encontrarse en la lámina basal y en la MEC de lámina no basal. El receptor de adhesión distroglucano puede unir directamente perleciano, a través de sus dominios Lg, e indirectamente, a través de su unión a laminina. En los seres humanos, las mutaciones en el gen de perleciano pueden llevar al enanismo o a anomalías musculares, aparentemente debido a la disfunción de la unión neuromuscular que controla el disparo muscular.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 20.3

La matriz extracelular I: la lámina basal

- La lámina basal, una malla delgada de las moléculas de la matriz extracelular (MEC), separa la mayoría de los epitelios y otros grupos organizados de células del tejido conectivo adyacente. Juntas, la lámina basal y la red de colágeno inmediatamente adyacente forman una estructura denominada membrana basal.
- Cuatro proteínas de la MEC se encuentran en toda la lámina basal (véase la **Fig. 20-22**): la laminina (una proteína de la matriz multiadhesiva), colágeno tipo IV, perleciano (un proteoglucano) y nidógeno/enactina.
- Los receptores de la superficie celular como las integrinas anclan las células a la lámina basal, que a su vez está conectada con otros componentes de la MEC (véase la **Fig. 20-1**). La laminina en la lámina basal es el principal ligando de la integrina $\alpha 6 \beta 4$ (véase el **Cuadro 20-3**).
- La laminina y otras proteínas multiadhesivas de la matriz son moléculas multidominio que unen múltiples receptores de adhesión y componentes de la MEC.
- Las moléculas de colágeno tipo IV, grandes y flexibles, interactúan extremo con extremo y lateralmente para formar una malla de sostén a la cual se unen otros componentes de la MEC y receptores de adhesión (véanse las **Figs. 20-22 y 20-25**).
- El colágeno tipo IV es un miembro de la familia de proteínas de colágeno distinguida por la presencia de la secuencia de repetición tripéptido de Gly-X-Y que da origen a la estructura triple hélice de colágeno (véase la **Fig. 20-24**). Los diferentes colágenos se distinguen por la longitud de las modificaciones químicas de sus cadenas α y

por la presencia de segmentos que interrumpen o flanquean sus regiones de triple hélice.

- El perleciano, un proteoglucano presente principalmente en la lámina basal, une muchos componentes de la MEC y receptores de adhesión. Los proteoglucanos consisten en proteínas centro secretadas o asociadas a la membrana covalentemente unida a una o más cadenas de polisacáridos especializados llamados glucosaminoglucanos (GAG).

20.4 La matriz extracelular II: tejido conectivo

El tejido conectivo como el tendón y el cartílago difiere de otros tejidos sólidos en que la mayoría de su volumen está constituido de matriz extracelular en lugar de células. Esta matriz se empaqueta con proteínas fibrosas insolubles. Los componentes clave de la MEC en el tejido conectivo, alguno de los cuales también se encuentran en otros tipos de tejidos, son:

- **Colágenos**, moléculas triméricas que suelen agruparse para formar fibras (colágenos fibrilares).
- **Glucosaminoglucanos (GAG)**, cadenas de polisacárido lineal especializado de disacáridos repetitivos que pueden estar altamente hidratados y conferir propiedades de físicas y de unión (p. ej., resistencia a la compresión).
- **Proteoglucanos**, las glucoproteínas contienen una o más cadenas de GAG unidas covalentemente.
- **Proteínas multiadhesivas**, proteínas multidominio grandes que suelen abarcar muchas copias (“repeticiones”) de unos pocos dominios distintos que se unen y forman enlaces cruzados con una variedad de receptores adhesivos y componentes de la MEC.
- **Elastina**, una proteína que forma el centro amorfo de fibras elásticas.

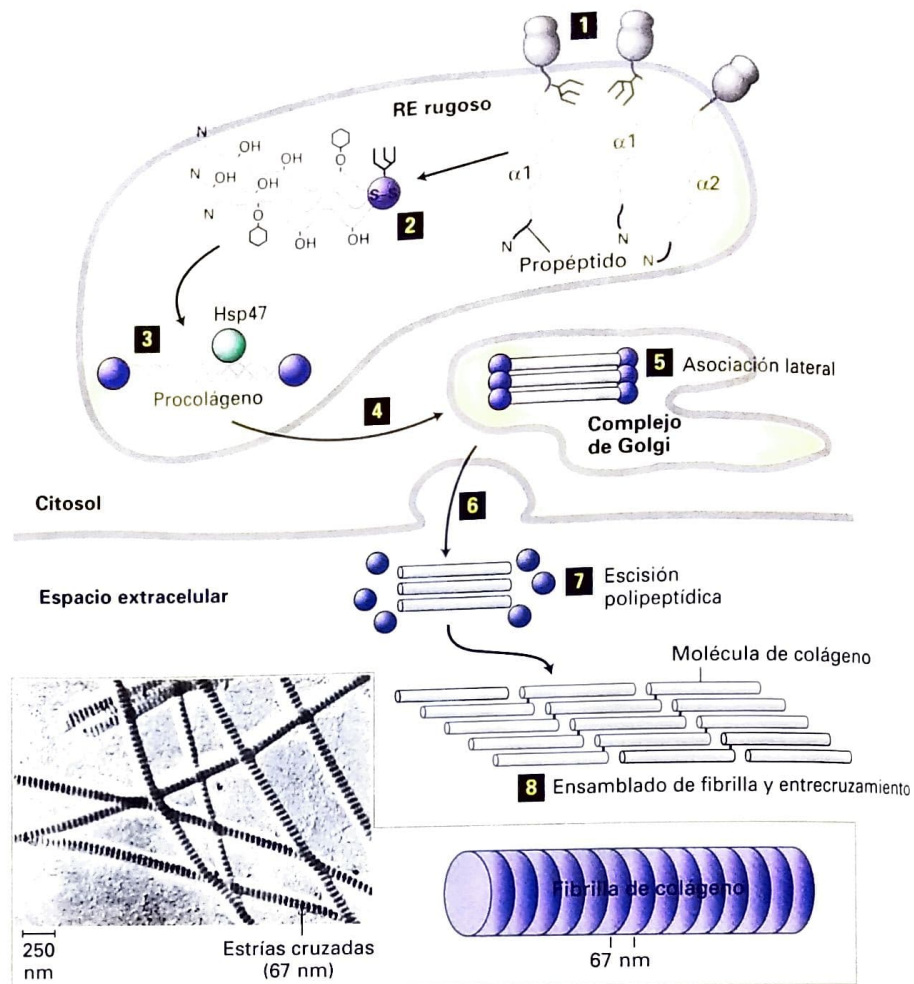
El colágeno es la proteína fibrosa más abundante en el tejido conectivo. Las fibras de elastina del tipo caucho, que puede estirarse y relajarse, también está presente en sitios deformables (p. ej., piel, tendones, corazón). Las fibronectinas, una familia de proteínas multiadhesivas de la matriz, forman sus propias fibrillas distintivas en la matriz de muchos tejidos conectivos. Aunque en el tejido conectivo se encuentran varios tipos de células, los diversos componentes de la MEC son producidos principalmente por células denominadas **fibroblastos**. En esta sección exploramos la estructura y la función de los diversos componentes en la MEC del tejido conectivo, como así también cómo se degrada y remodela la MEC mediante una variedad de proteínas especializadas.

Los colágenos fibrilares son las principales proteínas fibrosas en la MEC y en los tejidos conectivos

Alrededor del 80-90% del colágeno en el cuerpo consiste en **colágenos fibrilares** (tipo I, II y III), localizados principalmente en los tejidos conectivos (véase el **Cuadro 20-4**). Debido a su abundancia en el tejido rico en tendón como la cola de rata, el colágeno tipo I es fácil de aislar

FIGURA 20-26 Biosíntesis de los colágenos fibrilares.

Paso **1** las cadenas de procólgeno α se sintetizan sobre ribosomas asociados con el retículo endoplasmático (RE rugoso), y en el RE los oligosacáridos unidos a asparagina se añaden al propéptido C-terminal. Paso **2** los propéptidos se asocian para formar trímeros y están unidos de manera covalente por enlaces disulfuro, y residuos seleccionados en el triplete Gly-X-Y son covalentemente modificados (ciertas prolina y lisinas son hidroxiladas, se adhiere galactosa o galactosa-glucosa [hexágonos] a algunas hidroxilisinas, las prolina están isomerizadas de *cis*→*trans*). Paso **3** estas modificaciones facilitan la formación similar a una cremallera, la estabilización de la triple hélice y la unión mediante la proteína chaperona Hsp47 (véase el Cap. 13), que puede estabilizar las hélices o evitar la agregación prematura de los trímeros o ambos. Pasos **4** y **5** : los procolágenos plegados son transportados hasta y a través del aparato de Golgi, donde se produce parte de la asociación lateral en haces pequeños. Las cadenas luego son secretadas (paso **6**), los propéptidos N- y C-terminales son eliminados (paso **7**) y los trímeros se ensamblan en fibrillas y se entrecruzan covalentemente (paso **8**). El escalonamiento de 67 nm de los trímeros otorga a las fibrillas una apariencia estriada en las microfotografías electrónicas (*recuadro*). (Adaptado de A. V. Persikov y B. Brodsky, 2002, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* **99**:1101-1103)



y fue el primero en ser caracterizado. Su unidad estructural fundamental es una triple hélice larga (300 nm), delgada (1,5 nm de diámetro) (véase la Fig. 20-24) que consiste en dos cadenas $\alpha 1(I)$ y una cadena $\alpha 2(I)$, cada una de 1 050 aminoácidos de longitud. Las moléculas triple hélice se empaquetan estrechamente y se enrollan una alrededor de la otra formando *microfibrillas* que se asocian con polímeros de orden superior llamados *fibrillas*, que a su vez suelen agruparse para formar haces denominados *fibras* (Fig. 20-26).

Las de colágeno menos abundantes, pero no menos importantes, incluyen los *colágenos asociados a fibrillas*, que conectan los colágenos fibrilares entre sí o con los componentes de la MEC; los *colágenos formadores de lámina y de anclaje*, que forman redes bidimensionales en la lámina basal (tipo IV) y conectan la lámina basal en la piel al tejido conectivo subyacente (tipo IV); los *colágenos transmembrana*, que funcionan como receptores de adhesión; y los *colágenos de defensa del huésped*, que contribuyen a que el cuerpo reconozca y elimine patógenos. Resulta interesante destacar que varios colágenos (p. ej., tipos IX, XVIII y XV) también son proteoglucanos con GAG unidos covalentemente (véase el Cuadro 20-4).

El colágeno fibrilar se secreta y se ensambla en fibrillas fuera de la célula

Los colágenos fibrilares son proteínas secretadas, producidas principalmente por fibroblastos en la MEC. La biosíntesis y la secreción del colágeno siguen la vía normal para una proteína secretada, descrita en

detalle en los Capítulos 13 y 14. Las cadenas α de colágenos son sintetizadas como precursores más largos, llamados cadenas pro- α , por ribosomas adheridos al retículo endoplasmático (RE). Las cadenas pro- α sufren una serie de modificaciones covalentes y se pliegan para formar moléculas de *procólgeno* triple helicoidales antes de ser liberadas desde las células (véase la Fig. 20-26).

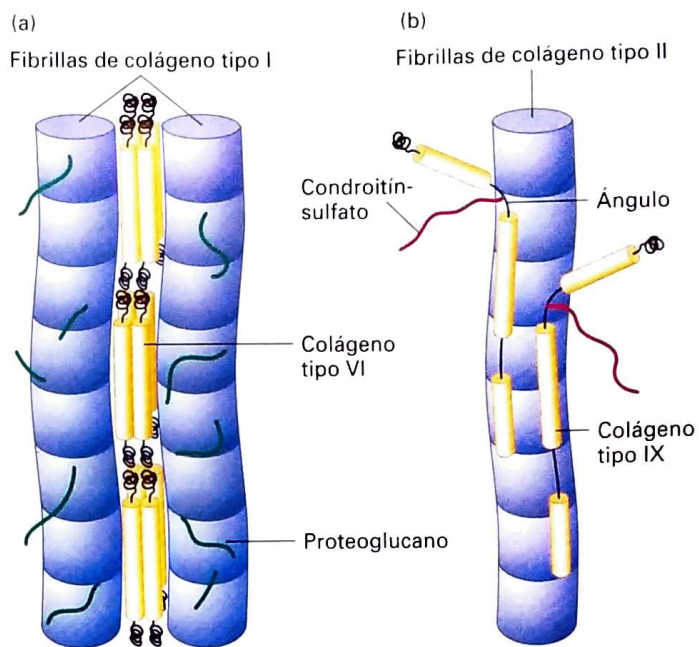
Después de la secreción de procólgeno desde la célula, las peptidasas extracelulares eliminan los propéptidos N-terminal y C-terminal. En los colágenos fibrilares, las moléculas resultantes, que consisten casi enteramente en una hélice triple hebra, se asocian lateralmente para generar fibrillas con un diámetro de 50-200 nm. En las fibrillas, las moléculas de colágeno adyacentes están separadas unas de otras por 67 nm, alrededor de un cuarto de su longitud. Esta disposición escalonada produce un efecto estriado que por microscopía óptica y electrónica puede verse como imágenes de fibrillas de colágeno (véase la Fig. 20-26, *recuadro*). Las propiedades únicas de los colágenos fibrilares se deben principalmente a la formación de fibrillas.

Los segmentos cortos que no son triple hélice en cualquiera de los extremos de las cadenas α de colágeno fibrilar son de particular importancia en la formación de fibrillas de colágeno. En estos segmentos, las cadenas laterales de lisina e hidroxilisina están covalentemente modificados por lisil oxidasas extracelulares para formar aldehídos en lugar del grupo amino en el extremo de la cadena lateral. Estos grupos de aldehído reactivo forman enlaces cruzados covalentes con residuos de lisina, hidroxilisina, e histidina en moléculas de adyacentes. Estos entrecruzamientos estabilizan el empaquetamiento lado a lado de las

Cell Biol **103**:393. Parte [b], véase L. M. Shaw y B. Olson, 1991, *Trends Biochem. Sci.* **18**:191.

Las modificaciones postraduccionales de las cadenas pro- α son cruciales para la formación de moléculas de colágeno maduro y sus ensamblajes en fibrillas. Defectos en estas modificaciones tienen consecuencias graves, como experimentaban frecuentemente los marinos antiguos. Por ejemplo, el ácido ascórbico (vitamina C) es un cofactor esencial para las hidroxilasas responsables de la adición de grupos hidroxilos a los residuos de prolina y lisina en las cadenas pro- α . En las células sin ascorbato, como en la enfermedad *escorbuto*, las cadenas pro- α no están lo suficientemente hidroxiladas para formar procólageno triple hélice estable a temperatura corporal normal, y el procólageno que se forma no puede ensamblarse en fibrillas normales. Sin el soporte estructural del colágeno, los vasos sanguíneos, los tendones y la piel se tornan frágiles. La fruta fresca en la dieta puede proporcionar suficiente vitamina C para mantener la formación de colágeno normal. Históricamente, se proveía con lima a los navegantes británicos para evitar el escorbuto, lo cual derivó en que se los denominara “límeros.” Mutaciones en los genes de la lisil hidrolasa también pueden causar defectos en el tejido conectivo. ■

Los colágenos difieren en las estructuras de las fibras que forman y cómo estas fibras se organizan en mallas. De los tipos predominantes de colágeno que se encuentran en los tejidos conectivos, el tipo I forma fibras largas, mientras que las redes de colágeno tipo II se parecen más a una malla. En los tendones, por ejemplo, las fibras de colágeno tipo I largas conectan los músculos a los huesos y deben soportar fuerzas enormes. Debido a que las fibras de colágeno tipo I tienen gran fuerza tensora, los tendones suelen estirarse sin romperse. En efecto, gramo a gramo, el colágeno tipo I es más fuerte que el acero. Dos colágenos fibrilares cuantitativamente menores, tipo V y tipo XI, se ensamblan junto con el colágeno tipo I para formar fibras y regular así las estructuras y propiedades de las fibras. Por ejemplo, la incorporación del colágeno tipo V produce fibras de menor diámetro.



En muchos tejidos conectivos, en particular el músculo esquelético, los proteoglucanos y un colágeno asociado a fibrilla denominado colágeno tipo VI se unen en forma no covalente a los lados de las fibrillas tipo I y pueden unir las fibrillas para formar fibras de colágeno más gruesas (Fig. 20-27a). El colágeno tipo VI es inusual en el sentido en que la molécula consiste en una triple hélice relativamente corta con dominios globulares en ambos extremos. La asociación lateral de dos tipos de monómeros genera un dímero “antiparalelo.” La asociación de extremo con extremo de estos dímeros a través de sus dominios globulares forma las “microfibrillas” tipo VI. Estas microfibrillas tienen una apariencia de cuentas en un collar, con alrededor de regiones triple hélice de 60 nm de largo separadas por dominios globulares de 40 nm de largo.

20.4 La matriz extracelular II: tejido conectivo

como lo hace una cadena de GAG que a veces se une a las cadenas tipo IX. Se cree que estas estructuras que sobresalen anclan las fibrillas tipo II a los proteoglicanos y a otros componentes de la matriz. La estructura triple hélice interrumpida del colágeno tipo IX y otros relacionados evitan que se ensamblen en fibrillas, aunque pueden asociarse con fibrillas formadas a partir de otros tipos de colágenos y formar entrecruzamientos covalentes entre ellos.

 Las mutaciones que afectan el colágeno tipo I y sus proteínas asociadas causan una variedad de enfermedades humanas. Ciertas mutaciones en los genes que codifican las cadenas de colágeno tipo I $\alpha 1(I)$ o $\alpha 2(I)$ causan *osteogénesis imperfecta*, o enfermedad de los huesos quebradizos. Debido a que la tercera posición en una cadena de colágeno α debe ser una glicina para que se forme la triple hélice (véase la Fig. 20-24), las mutaciones de glicina a casi cualquier otro aminoácido son perjudiciales y dan como resultado hélices inestables mal formadas. Solo una cadena α defectuosa de las tres en una molécula de colágeno puede interrumpir la estructura y la función de triple hélice de la molécula. Una mutación en una copia simple (alelo) de cualquiera de los genes $\alpha 1(I)$ o $\alpha 2(I)$, que se localizan en los cromosomas no sexuales, puede causar esta patología. Por lo tanto, muestra herencia autosómica dominante (véase el Cap. 5).

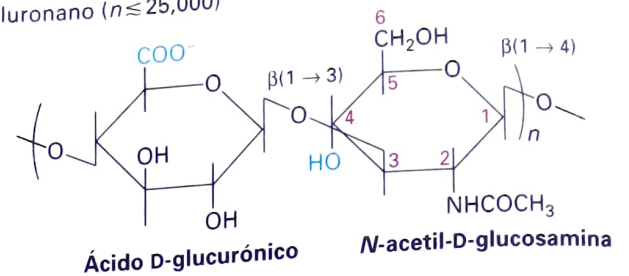
La ausencia o el mal funcionamiento de las microfibrillas asociadas a las fibrillas de colágeno en el tejido muscular se deben a mutaciones en los genes de colágeno tipo VI que causan distrofias musculares congénitas recesivas o dominantes con debilitamiento muscular generalizado, insuficiencia respiratoria, pérdida de masa muscular y anomalías articulares relativas al músculo. Se han informado anomalías cutáneas con enfermedades de colágeno tipo VI. ■

Los proteoglicanos y sus GAG constituyentes cumplen diversas funciones en la MEC

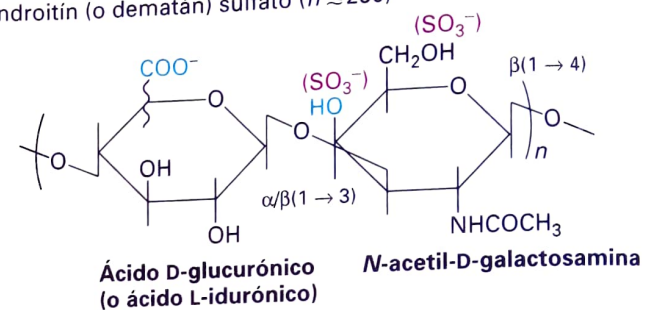
Como vimos con el perlecano en la lámina basal, los proteoglicanos cumplen un papel importante en la adhesión entre célula y MEC. Los proteoglicanos son un subgrupo de glucoproteínas adheridas a la superficie celular o secretadas que contienen cadenas de polisacáridos especializados unidos covalentemente llamados **glucosaminoglucanos (GAG)**. Los GAG son polímeros lineales de disacáridos repetitivos específicos. Por lo general, un azúcar es un ácido urónico (ácido D-glucurónico o L-idurónico) o D-galactosa; el otro azúcar es N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina (Fig. 20-28). Uno o ambos de estos azúcares contienen al menos un grupo aniónico (carboxilato o sulfato). Por lo tanto, la cadena GAG porta muchas cargas negativas. Los GAG se clasifican en varios tipos principales sobre la base de la naturaleza de la unidad de disacárido repetitivo: heparán-sulfato, condroitín-sulfato, dematán-sulfato, queratán-sulfato y hialuronano. Una forma persulfatada de heparán-sulfato llamada *heparina*, producida principalmente por mastocitos, cumple una función en las reacciones alérgicas. También se lo utiliza médicamente como un fármaco anticoagulante debido a su capacidad para activar un inhibidor natural de la coagulación llamado antitrombina III.

A excepción del hialuronano, que se analiza a continuación, todos los GAG principales se producen naturalmente como componentes de los proteoglicanos. Al igual que otras glucoproteínas secretadas o transmembrana, las proteínas centrales de los proteoglicanos son sintetizadas en el retículo endoplasmático, y las cadenas de GAG se ensamblan y se unen covalentemente a estos centros proteicos en el complejo de Golgi.

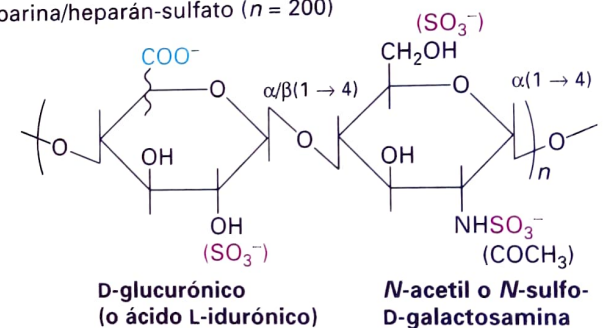
(a) Hialuronano ($n \approx 25,000$)



(b) Condroitín (o dematán) sulfato ($n \approx 250$)



(c) Heparina/heparán-sulfato ($n = 200$)



(d) Queratán-sulfato ($n = 20-40$)

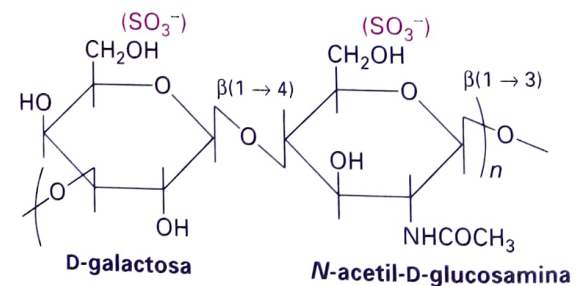


FIGURA 20-28 Los disacáridos repetitivos de los glucosaminoglucanos (GAG), el polisacárido componente de los proteoglicanos. Cada una de las cuatro clases de GAG se forma por polimerización de unidades de monómeros para formar repeticiones de un disacárido particular y

posteriores modificaciones, incluyendo la adición de grupos sulfato e inversión (epimerización) del grupo carboxilo sobre el carbono 5 del ácido D-glucurónico para dar el ácido L-idurónico. Las líneas onduladas representan enlaces covalentes que están orientados ya sea por encima (ácido D-glucurónico) o por debajo (L-idurónico) del anillo. La heparina se genera por hipersulfatación de heparán-sulfato, mientras que el hialuronano está desulfatado.

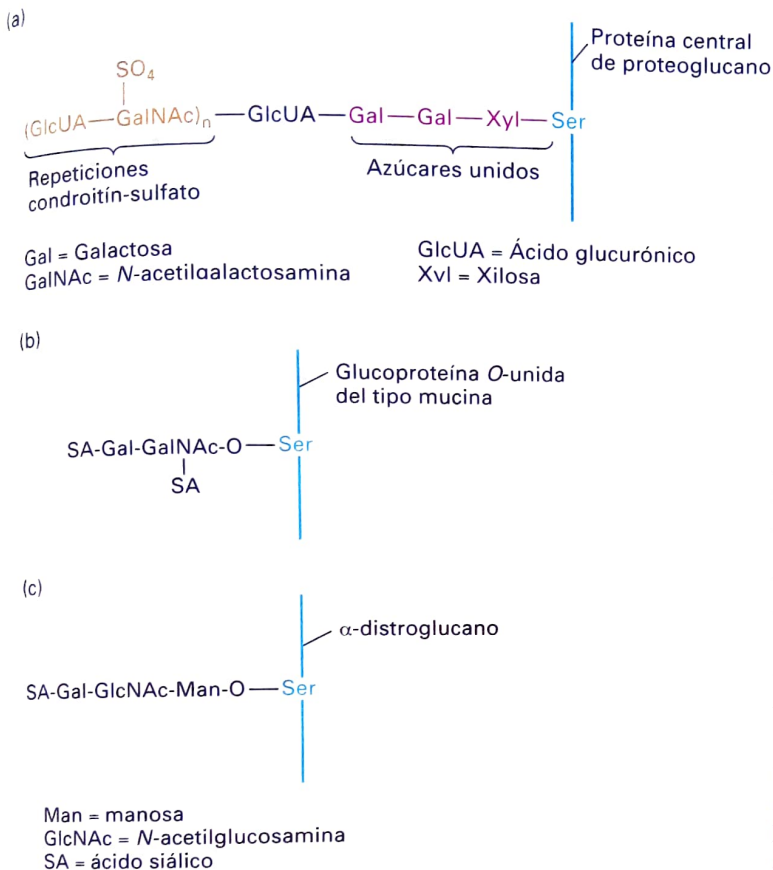


FIGURA 20-29 Polisacáridos O-unidos a hidroxilo. (a) Síntesis de un glucosaminoglucano (GAG), en este caso el condroitín-sulfato, es iniciado por transferencia de un residuo de xilosa a un residuo de serina en la proteína central, más probablemente en el aparato de Golgi, seguido por la adición secuencial de dos residuos de galactosa. El ácido glucurónico y los residuos de N-acetilgalactosamina luego son añadidos secuencialmente a estos azúcares conectores y forman la cadena de condroitín-sulfato. Las cadenas de heparán-sulfato están conectadas a proteínas centrales por el mismo conector de tres azúcares. (b) Las cadenas O-unidas tipo mucina están unidas de manera covalente a glucoproteínas a través de un monosacárido N-acetilgalactosamina (GalNAc) al cual se adhieren covalentemente una variedad de otros azúcares. (c) Ciertos oligosacáridos O-unidos especializados, como aquellos que se encuentran en la proteína distroglicano, están unidos a proteínas a través de monosacáridos de manosa (Man).

Para generar las cadenas de heparán o condroitín-sulfato, un “conector” de tres azúcares se adhiere primero a las cadenas laterales hidroxilos de ciertos residuos de serina en un centro proteico; así, el conector se denomina un **oligosacárido O-ligado** (Fig. 20-29). Por el contrario, los conectores para la adición de cadenas de queratán-sulfato son cadenas de oligosacáridos adheridas a residuos de asparagina. Como los **oligosacáridos N-ligados**, están presentes en muchas glucoproteínas (véase el Cap. 14), aunque solo un subgrupo de cadenas porta GAG. Todas las cadenas GAG son alargadas por la adición alternante de monómeros de azúcares para formar repeticiones de disacáridos característicos de un GAG particular; las cadenas suelen ser modificadas con posterioridad por la unión covalente de moléculas pequeñas como el sulfato. Se desconoce el mecanismo responsable de la determinación de qué proteínas son modificadas con los GAG, la secuencia de disacáridos por ser añadida, los sitios por

ser sulfatados y las longitudes de las cadenas GAG. La proporción de polisacáridos en todos los proteoglicanos es mucho más alta que en la mayoría de las otras glucoproteínas.

Función de las modificaciones de cadenas de GAG Como sucede con la secuencia aminoacídica en las proteínas, la disposición de los residuos de azúcares en las cadenas GAG y la modificación de azúcares específicos en las cadenas puede determinar sus funciones y la de los proteoglicanos que los contiene. Por ejemplo, los agrupamientos de ciertos azúcares modificados en las cadenas GAG de los proteoglicanos de heparina sulfato pueden controlar la unión de factores de crecimiento a ciertos receptores de las actividades de proteínas en la cascada de coagulación de la sangre.

En el pasado, la complejidad química y estructural de los proteoglicanos representó una barrera de enormes proporciones para analizar y comprender sus estructuras y muchas de sus diversas funciones. En los últimos años, mediante el uso de las técnicas bioquímicas clásicas y nuevas, la espectrometría de masa y la genética, los investigadores han comenzado a elucidar las estructuras y funciones detalladas de estas moléculas de MEC ubicuas. Los resultados de los estudios en curso sugieren que conjuntos de secuencias de residuos de azúcar que contienen las modificaciones comunes, en lugar de secuencias únicas exclusivas, son las responsables de especificar diferentes funciones a las GAG. Un caso puntual es un conjunto de secuencias de cinco residuos (pentasacáridos) que se encuentran en un subgrupo de GAG de heparina que controla la actividad de antitrombina III (ATIII), un inhibidor de la trombina, una proteasa clave de la coagulación de la sangre. Cuando estas secuencias de pentasacáridos en la heparina son sulfatadas en dos posiciones específicas (Fig. 20-30), la heparina puede activar ATIII e inhibir así la formación de coágulos. Varios otros sulfatos pueden estar presentes en el pentasacárido activo en diversas combinaciones, pero no son esenciales para la actividad anticoagulante de la heparina. Aún no se conoce la razón fundamental por la cual se generan conjuntos de secuencias activas similares en lugar de una secuencia única.

Diversidad de los proteoglicanos Los proteoglicanos constituyen un grupo notablemente diverso de moléculas que son abundantes en la matriz extracelular de todos los tejidos animales y también se expresan en la superficie celular. Por ejemplo, de las cinco principa-

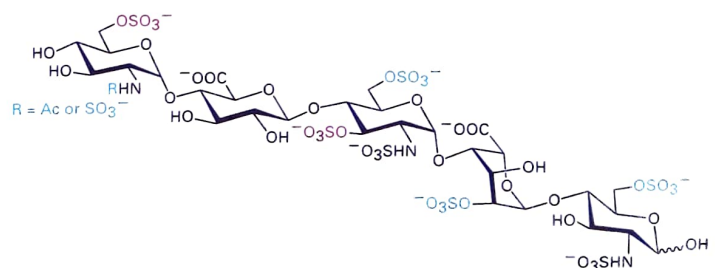


FIGURA 20-30 Secuencia de pentasacáridos de GAG que regulan la actividad antitrombina III (ATIII). Grupos de secuencias de cinco residuos en el GAG mucho más largo llamado heparina con la composición mostrada aquí se une a ATIII, lo activa e inhibe la coagulación de la sangre. Los grupos sulfato en el tipo rojo son esenciales para esta función de la heparina; las modificaciones en color azul pueden estar presentes pero no son esenciales. Se cree que otros grupos de secuencias de GAG modificados regulan la actividad de otras proteínas diana.

les clases de proteoglucanos heparán-sulfato, tres se localizan en la matriz extracelular (perlecana, agrina y colágeno tipo XVIII) y dos son proteínas de la superficie celular. El último incluye proteínas integrales de membrana (sindecanos) y proteínas de anclaje a GPI (glipicanos); las cadenas de GAG en ambos tipos de proteoglucanos de la superficie celular se extienden hacia el espacio extracelular. Las secuencias y longitudes de las proteínas del centro de los proteoglucanos varía considerablemente, y la cantidad de cadenas GAG adheridas oscila desde unas pocas hasta más de 100. Por otra parte, una proteína central suele estar unida a dos tipos diferentes de cadenas GAG y generar un proteoglucano “híbrido”. El proteoglucano perlecana de la lámina basal es principalmente un proteoglucano heparán-sulfato (HSPG) con tres a cuatro cadenas de GAG, aunque a veces puede tener una cadena de coindroitín-sulfato. La diversidad adicional de los proteoglucanos se produce debido a que número de cadenas, composiciones, y secuencias de las GAG adheridas a las proteínas del centro de otro modo idénticas, pueden diferir considerablemente. La generación y el análisis de mutantes de laboratorio con defectos en la producción de proteoglucanos en *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta), *C. elegans* (gusano) y ratones han demostrado claramente que los proteoglucanos cumplen funciones cruciales en el desarrollo, muy probablemente como moduladores de diversas vías de señalización.

Los **sindecanos** son proteoglucanos de la superficie celular expresados por las células epiteliales y las no epiteliales que se unen a colágenos y proteínas multiadhesivas de la matriz como la fibronectina, las células de anclaje para la matriz extracelular. Al igual que muchas proteínas integrales de membrana, el dominio citosólico de los sindecanos interactúa con el citoesqueleto de actina y, en algunos casos, con moléculas reguladoras intracelulares. Además, los proteoglucanos de la superficie celular como el sindecana unen muchos factores de crecimiento proteicos y otras moléculas de señalización extracelular, lo que ayuda a regular el metabolismo y la función celulares. Por ejemplo, los sindecanos en la región hipotalámica del cerebro modulan el comportamiento de la alimentación en respuesta a la privación de alimentos. Lo llevan a cabo a través de la participación en la unión de receptores de la superficie celular de péptidos antisaciedad que ayudan a controlar el comportamiento en la alimentación. En el estado alimentado, el dominio extracelular del sindecana cubierto con cadenas de heparán-sulfato es liberado de la superficie por proteólisis y suprime así la actividad de los péptidos antisaciedad y el comportamiento de la alimentación. En ratones genéticamente modificados para sobreexpresar el gen de *syndecan-1* en la región hipotalámica del cerebro y otros tejidos, el control normal de la alimentación mediante péptidos antisaciedad es interrumpido y los animales se alimentan en exceso y se tornan obesos.

El hialuronano resiste la compresión, facilita la migración celular y otorga al cartílago propiedades similares a las del gel

El hialuronano, también conocido como ácido hialurónico (HA) o hialuronato, es una GAG no sulfatado (véase la Fig. 20-28a) sintetizado por una enzima unida a la membrana plasmática llamada HA sintasa y es secretado directamente al espacio extracelular a medida que es sintetizado. (Las células vegetales utilizan un enfoque similar para sintetizar celulosa, componente de la MEC). El HA es un componente principal de la matriz extracelular que rodea las células en migración y proliferación, en particular en tejidos embrionarios. Además, el hialuronano forma el almacén de los agregados de pro-

teoglucanos complejos que se encuentra en muchas matrices extracelulares, en particular sobre el cartílago. Debido a sus propiedades físicas notables, el hialuronano imparte rigidez y elasticidad; también actúa como un lubricante de calidad para muchos tipos de tejidos conectivos, por ejemplo, las articulaciones.

Las moléculas de hialuronano varían en longitud desde unas pocas repeticiones de disacáridos hasta ~25 000. El hialuronano típico en tales articulaciones, como la del codo, tiene 10 000 repeticiones para una masa total de 4×10^6 Da y una longitud de 10 μm (alrededor del diámetro de una célula pequeña). Los segmentos individuales de una molécula de hialuronano se pliegan en una conformación similar a un bastón debido a las uniones β glucosídicas entre los azúcares y los extensivos enlaces de hidrógeno intracadena. La repulsión mutua entre los grupos carboxilos cargados negativamente que se proyectan hacia afuera a intervalos regulares también contribuye a estas estructuras locales rígidas. Sin embargo, globalmente, el hialuronano no es un bastón largo, rígido, como lo es el colágeno fibrilar; más bien, es muy flexible en solución, se curva y se enrosca en muchas conformaciones para formar un enrollamiento aleatorio.

Debido al gran número de residuos aniónicos sobre su superficie, la molécula de hialuronano típica une una gran cantidad de agua y se comporta como si fuera una gran esfera hidratada con un diámetro de ~ 500 nm. A medida que la concentración del hialuronano aumenta, las cadenas largas comienzan a enredarse y forman un gel viscoso. Incluso a concentraciones bajas, el hialuronano forma un gel hidratado; cuando se lo coloca en un espacio confinado, como en una matriz entre dos células, las moléculas largas de hialuronano tienden a empujar hacia afuera. Este empuje hacia afuera crea un aumento de volumen, o *presión de turgencia*, dentro del espacio extracelular. Además, la unión de cationes por parte de grupos carboxilatos (COO^-) sobre la superficie del hialuronano aumenta la concentración de iones y, por ende, la presión osmótica en el gel. Como resultado, se incorporan grandes cantidades de agua a la matriz, lo cual contribuye a la presión de turgencia. Estas fuerzas de turgencia otorgan a los tejidos conectivos sus capacidades de resistir las fuerzas de compresión, a diferencia de las fibras de colágeno, que son capaces de resistir fuerzas de estiramiento.

El hialuronano se une a la superficie de muchas células en migración mediante numerosos receptores de adhesión, como el receptor llamado CD44, que contiene dominios de unión a HA, cada uno con una conformación tridimensional similar. Debido a su naturaleza hidratada, porosa, la “cubierta” de hialuronano unida a las células parece mantenerlas separadas entre sí, brindándoles la libertad de moverse y proliferar. El cese de movimiento celular y la iniciación de las adhesiones entre célula y célula suelen correlacionarse con una disminución en el hialuronano y en los receptores HA y un aumento en la enzima extracelular hialuronidasa, que degrada el hialuronano en la matriz. Estas alteraciones del hialuronano son de particular importancia durante las abundantes migraciones celulares que facilitan la diferenciación y en la liberación de la célula huevo de mamífero (ovocito) de las células que la rodean después de la ovulación.

El proteoglucano predominante en el cartílago, llamado *agrecán*, se ensambla con el hialuronano para formar agregados muy grandes, ilustrativos de las estructuras complejas que suelen formar los proteoglucanos. El esqueleto del agregado de proteoglucanos del cartílago es una molécula grande de hialuronano a la cual se unen con fuerza, pero no de manera covalente, muchas moléculas de *agrecán* (Fig. 20-31). Un único agregado de *agrecán*, uno de los complejos macromoleculares

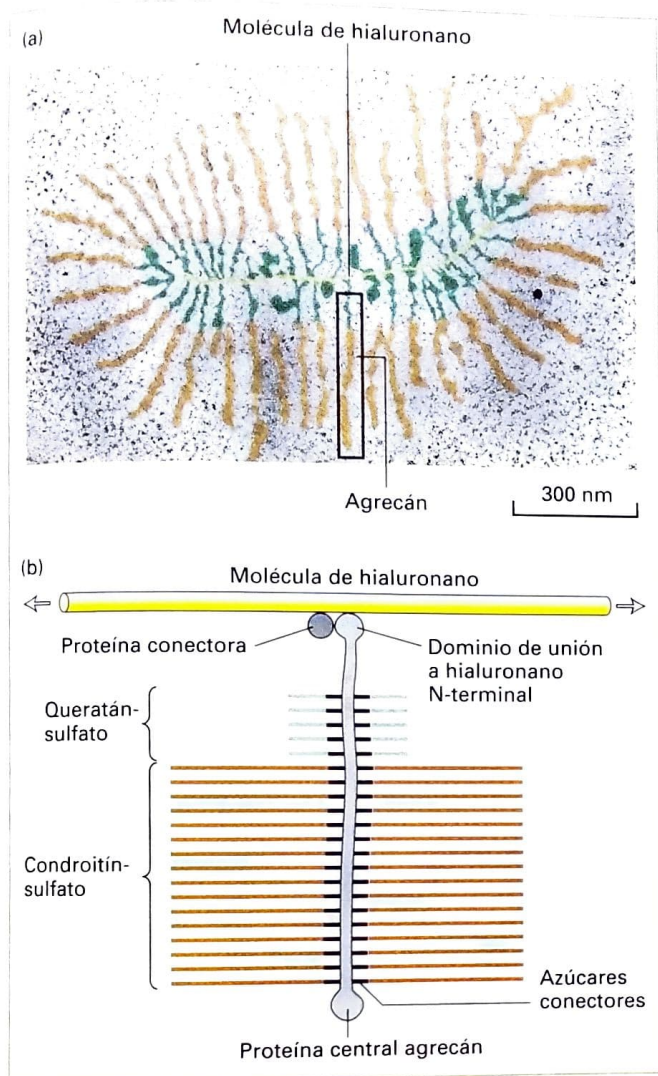


FIGURA 20-31 Estructura del agregado proteoglucano de cartilago.

(a) Microfotografía electrónica de un agregado de agregacán a partir de cartilago epifisiario bovino. Las proteínas centrales de agregacán están unidas a intervalos de ~ 40 nm a una molécula de hialuronano. (b) Representación esquemática de un monómero de agregacán unido a hialuronano (amarillo). En el agregacán, tanto las cadenas de queratán-sulfato (verde) como las de condroitín-sulfato (naranja) están adheridas a la proteína central. El dominio N-terminal de la proteína central se une no covalentemente a una molécula de hialuronano. La unión está facilitada por una proteína conectora, que se une tanto a la molécula de hialuronano como a la proteína central de agregacán. Cada proteína central de agregacán tiene 127 secuencias de Ser-Gly a la cual se pueden añadir cadenas de GAG. El peso molecular de un monómero de agregacán es en promedio 2×10^6 . El agregado entero, que puede contener más de 100 monómeros, tiene un peso molecular de más de 2×10^8 y es casi tan grande como la bacteria *E. coli*. (Parte (a) de J. A. Buckwalter y L. Rosenberg, 1983, *Cell Rel. Res.* 3:489, cortesía de L. Rosenberg.)

más grandes, puede ser de más de 4 mm de largo y tener un volumen mayor que el de una célula bacteriana. Estos agregados otorgan al cartilago sus propiedades únicas similares al gel y su resistencia a la deformación, esencial para la distribución de la carga en las articulaciones que soportan peso.

La proteína central del agregacán (~ 250 000 PM) tiene un dominio globular N-terminal que se une con alta afinidad a una secuencia de disacáridos específicos dentro del hialuronano. Esta secuencia específica se genera mediante modificaciones covalentes de algunos disacáridos repetitivos en la cadena de hialuronano. La interacción entre el agregacán y el hialuronano está facilitada por una proteína conectora que se une tanto a la proteína central del agregacán como al hialuronano (Fig. 20-31b). El agregacán y la proteína conectora tienen un dominio "conector" común, de ~ 100 aminoácidos de largo, que se encuentra en numerosas matrices y en proteínas de unión al hialuronano de la superficie celular tanto en tejidos cartilaginosos como en no cartilaginosos. Casi con certeza, estas proteínas surgieron en el curso de la evolución a partir de un único gen ancestral que codifica solo este dominio.

Las fibronectinas interconectan células y matriz, influyen en la forma, la diferenciación y el movimiento celular

Muchos tipos celulares diferentes sintetizan **fibronectina**, una proteína multiadhesiva de la matriz que se encuentra en todos los vertebrados. El descubrimiento de que la fibronectina funciona como una molécula adhesiva surgió al observar que está presente en las superficies de células fibroblásticas normales, que se adhieren fuertemente a las placas Petri en experimentos de laboratorio, pero está ausente en las superficies de células tumorígenicas (p. ej., cancerosas), que se adhieren débilmente. Las aproximadamente 20 isoformas de fibronectina son generadas a partir de un único gen (véase la Fig. 4-16). Las fibronectinas son esenciales para la migración y la diferenciación de muchos tipos celulares en la embriogénesis. Estas proteínas también son importantes para la cicatrización de heridas debido a que promueven la coagulación de sangre y facilitan la migración de macrófagos y otras células inmunitarias en la zona afectada.

Las fibronectinas ayudan a adherir las células a la matriz extracelular mediante unión a otros componentes de la MEC, en particular colágenos fibrosos y proteoglucanos heparán-sulfato, y a receptores de adhesión de la superficie celular como las integrinas (véase la Fig. 20-2). A través de sus interacciones con receptores de adhesión, las fibronectinas influyen en la forma y el movimiento de las células y la organización del citoesqueleto. Por el contrario, las células pueden esculpir el entorno inmediato de la MEC de acuerdo con sus necesidades al regular su unión mediada por receptores a la fibronectina y a otros componentes de la MEC.

Las fibronectinas son dímeros de dos polipéptidos similares unidos en sus extremos C-terminales mediante dos puentes disulfuros; cada cadena es de alrededor de 60-70 nm de largo y 2-3 nm de espesor. La digestión parcial de la fibronectina con bajas cantidades de proteasa y el análisis de los fragmentos demostró que cada cadena comprende diversas regiones funcionales con diferentes especificidades de unión a ligando (Fig. 20-32a). A su vez, cada región contiene múltiples copias de ciertas secuencias que pueden clasificarse en uno a tres tipos. Estas clasificaciones se designan repeticiones de fibronectina tipo I, II y III sobre la base de las similitudes de secuencia de aminoácidos, aunque las secuencias de dos repeticiones cualesquiera de un tipo dado no sean idénticas. Estas repeticiones conectadas dan a la molécula la apariencia de cuentas en un collar. La combinación de diferentes repeticiones componen las regiones que confieren a la fibronectina su capacidad de unir múltiples ligandos.

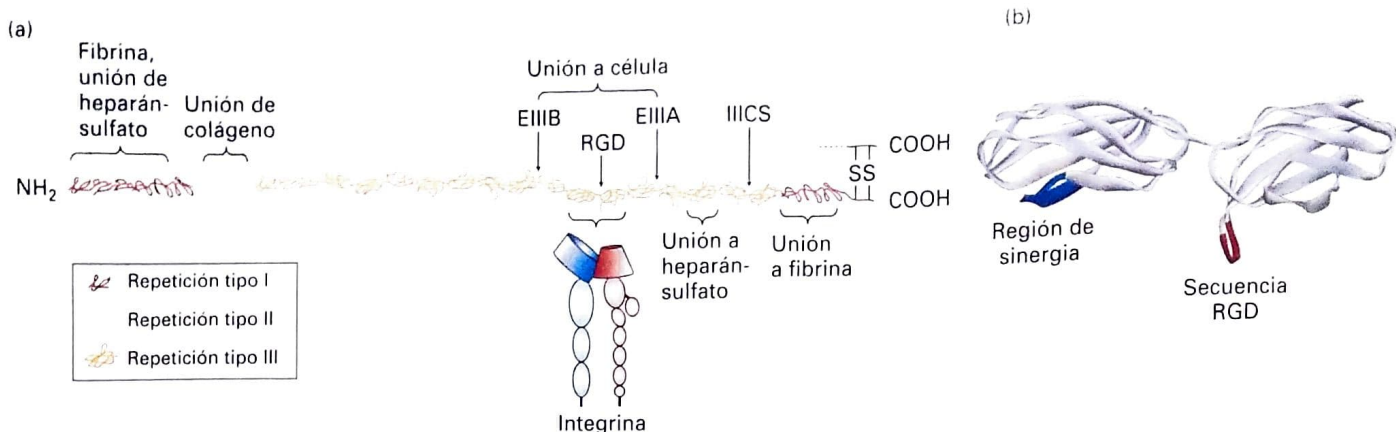


FIGURA 20-32 Organización de la fibronectina y su unión a integrinas.

(a) Modelo a escala de la fibronectina que muestra que está acoplada por dos repeticiones tipo III a los dominios extracelulares de la integrina. Solo se muestra una de las dos cadenas similares, que están unidas por enlaces disulfuros cerca de sus extremos C-terminales en la molécula de fibronectina dimérica. Cada cadena contiene alrededor de 2 446 aminoácidos y está compuesta por tres tipos de secuencias repetitivas de aminoácidos (repeticiones tipo I, II o III) o dominios. El dominio EIIIA, EIIIB –ambos repeticiones tipo III– y el dominio IIICS son procesados y cortados de manera variable para dar la estructura en las localizaciones indicadas por las flechas. La fibronectina circulante carece de uno o ambos EIIIA y EIIIB. Al menos cinco secuencias diferentes pueden estar presentes en la región IIICS como resultado

del proceso de corte y empalme alternativo (véase la Fig. 4-16). Cada cadena contiene diversas regiones con múltiples repeticiones, algunas de las cuales contienen sitios de unión específicos para el heparán-sulfato, la fibrina (un constituyente importante de los coágulos sanguíneos), colágeno, e integrinas de la superficie celular. El dominio de unión a integrina también es conocido como el dominio de unión a célula. Las estructuras de los dominios de la fibronectina fueron determinadas a partir de fragmentos de la molécula. (b) Estructura de alta resolución que muestra que la secuencia de unión RGD (roja) se extiende hacia afuera en un asa a partir de su dominio compacto tipo III sobre el mismo lado de la fibronectina como una región de sinergia (azul), que también contribuye a la unión de alta afinidad a las integrinas. (Adaptado de D. J. Leahy y cols., 1996, *Cell* 84:161)

Una de las repeticiones tipo III en la región de unión a la célula de la fibronectina media la unión a ciertas integrinas. Los resultados de estudios con péptidos sintéticos correspondientes a partes de estas repeticiones identificó la secuencia de tripéptido Arg-Gly-Asp, llamada *secuencia RGD*, como la mínima secuencia dentro de esta repetición necesaria para el reconocimiento por aquellas integrinas. En un estudio, se evaluaron los heptapéptidos que contienen la secuencia RGD o una variación de esta por su capacidad para mediar la adhesión de cé-

lulas de riñón de ratas a una placa de cultivo. Los resultados demostraron que los heptapéptidos que contienen la secuencia RGD imitaban la capacidad de las fibronectinas intactas para estimular la adhesión mediada por integrinas, mientras que las variantes de heptapéptidos que carecían de esta secuencia fueron ineficaces (Fig. 20-33).

Se ensambló un modelo tridimensional de la unión de fibronectina con integrina basado en estructuras parciales de ambas proteínas. En una estructura de alta resolución de la repetición tipo III de la fibro-

FIGURA EXPERIMENTAL 20-33 Una secuencia de tripéptido específico (RGD) en la región de la fibronectina es necesaria para la adhesión de células.

La región de unión a células de la fibronectina contiene una secuencia hexapéptido de unión a integrina, GRGDSP en el código de aminoácidos de una letra (véase la Fig. 2-14). Junto con un residuo de cisteína C-terminal (C) adicional, este heptapéptido y diversas variantes fueron sintetizadas químicamente. Se añadieron diversas concentraciones de cada péptido sintético a las placas de poliestireno que tenían la proteína inmunoglobulina G (IgG) firmemente adherida a sus superficies; los péptidos luego fueron entrecruzados químicamente con las IgG. Subsecuentemente, se añadieron células de riñón de rata normales cultivadas en las placas y se incubaron durante 30 minutos para permitir la adhesión. Después de que se eliminaron las células no unidas, se determinaron las cantidades relativas de células que se adhirieron firmemente mediante tinción de las células unidas con un colorante y se midió la intensidad de la tinción con un espectrofotómetro. Los resultados que se muestran aquí indican que la adhesión celular aumenta por encima del nivel basal con concentración peptídica creciente para aquellos péptidos que contienen secuencias RGD pero no para las variantes que carecen de esta secuencia (modificación subrayada). (De M. D. Pierschbacher y E. Ruoslahti, 1984, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 81:5985.)

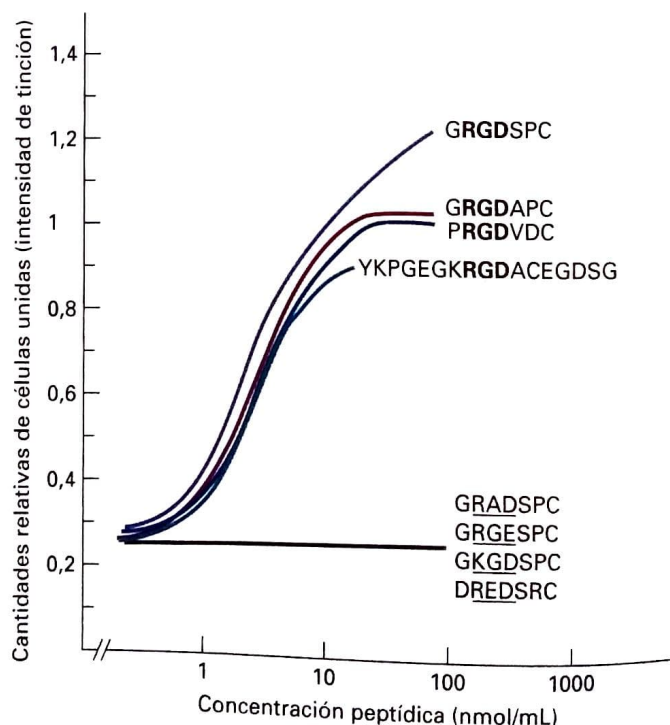
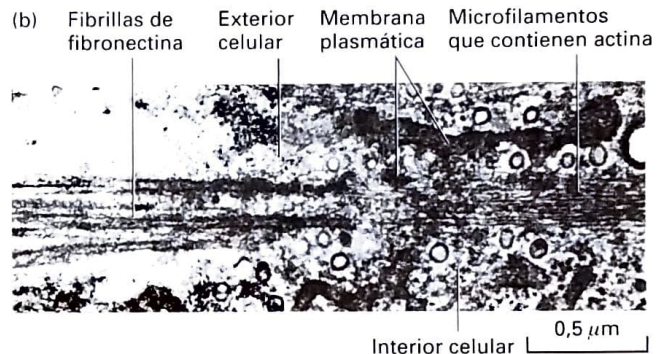
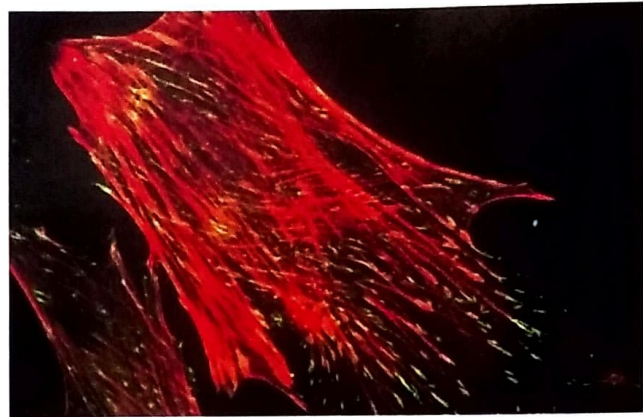


FIGURA EXPERIMENTAL 20-34 Las integrinas median la unión entre la fibronectina y la matriz extracelular y el citoesqueleto. (a)

Microfotografía inmunofluorescente de un fibroblasto cultivado fijado que muestra la colocalización de la integrina $\alpha 5 \beta 1$ (verde) y las fibras de tensión que contienen actina (rojo). La célula fue incubada con dos tipos de anticuerpo monoclonal: un anticuerpo específico de integrina unido a un colorante verde fluorescente y un anticuerpo específico contra integrina unido a un colorante rojo fluorescente. Las fibras de tensión son haces largos de microfilamentos de actina que se irradian hacia adentro desde puntos donde la célula contacta con un sustrato. En el extremo distal de estas fibras, cerca de la membrana plasmática, la coincidencia de la integrina de unión a fibronectina (verde) y a actina (roja) produce una fluorescencia amarilla. (b) Microfotografía electrónica de la unión de las fibras de fibronectina y actina en un fibroblasto cultivado. Los microfilamentos individuales de 7 nm que contienen actina, componentes de las fibras de tensión, finalizan en la membrana celular seccionada de forma oblicua. Los microfilamentos aparecen alineados en proximidad estrecha a las fibrillas de fibronectina, más gruesas, densamente teñidas sobre el lado externo de la célula. (Parte [a] de J. Duband y cols. 1988, *J. Cell Biol.* **107**:1385. Parte [b] de I. J. Singer, 1979, *Cell* **16**:675, cortesía de I. J. Singer, copyright 1979, MIT.)

(a)



nectina unida a la integrina y su dominio tipo III vecino, la secuencia RGD se encuentra en la cima de una asa que sobresale hacia afuera de la molécula, en una posición que facilita la unión a las integrinas (Fig. 20-32b). Aunque la secuencia RGD es necesaria para la unión de varias integrinas, su afinidad por las integrinas es sustancialmente menor que la de la fibronectina intacta o de la región de unión a célula en la fibronectina. Por lo tanto, las características estructurales cerca de la secuencia RGD en las fibronectinas (p. ej., partes de las repeticiones adyacentes, como la región sinergia; véase la Fig. 20-32b) y en otras proteínas que contienen RGD amplifica sus uniones a ciertas integrinas. Más aún, las formas dimericas solubles simples de la fibronectina producidas por el hígado o los fibroblastos se encuentran en un principio en una conformación no funcional que se une pobremente a las integrinas debido a que la secuencia RGD no es rápidamente accesible. La absorción de la fibronectina a una matriz de colágeno o a la lámina basal o, experimentalmente, a una placa de plástico de cultivo de tejido da como resultado un cambio conformacional que aumenta la capacidad de la fibronectina para unirse a las células. Posiblemente, este cambio aumenta la accesibilidad de la secuencia RGD para la unión de integrina.

La microscopia y otras técnicas experimentales (p. ej., experimentos bioquímicos de unión) han demostrado el papel de las integrinas en el entrecruzamiento de la fibronectina y otros componentes de la MEC. Por ejemplo, la colocalización de los filamentos de actina y las integrinas dentro de las células puede ser visualizada por microscopia de fluorescencia (Fig. 20-34a). La unión de las integrinas de superficie celular a la fibronectina en la matriz induce el movimiento dependiente del citoesqueleto de actina de algunas moléculas de integrina en el plano de la membrana. La tensión mecánica resultante del movimiento relativo de algunas moléculas de integrinas unidas a un dmero único de fibronectina estira la fibronectina. Este estiramiento fomenta la asociación mutua de fibronectinas para formar fibrillas multifuncionales.

La fuerza necesaria para desplegar y exponer los sitios funcionales de autoasociación en la fibronectina es mucho menor que la necesaria para interrumpir la unión integrina-fibronectina. Por lo tanto, las moléculas de fibronectina permanecen unidas a la integrina mientras

las fuerzas mecánicas generadas por la célula inducen la formación de fibras. En efecto, las integrinas a través de las proteínas adaptadoras transmiten fuerzas generadas por el citoesqueleto de actina hacia la fibronectina extracelular (señalización desde adentro hacia afuera). Gradualmente, las fibrillas de fibronectina formadas en un inicio maduran para formar componentes de la matriz muy estables mediante entrecruzamientos covalentes. En algunas imágenes de microfotografías electrónicas, las fibrillas exteriores de fibronectina parecen alinearse en una línea continua con haces de fibras de actina dentro de la célula (Fig. 20-34b). Estas observaciones y los resultados de otros estudios proporcionaron el primer ejemplo de un receptor de adhesión molecularmente bien definido que forma un puente entre el citoesqueleto intracelular y los componentes de la matriz extracelular, un fenómeno que ahora se sabe está muy extendido.

Las fibras elásticas permiten que muchos tejidos sufran estiramientos y relajamientos repetidos

Las fibras elásticas se encuentran en la MEC de una amplia variedad de tejidos (Fig. 20-35a) que están sujetos a tensiones mecánicas o deformaciones, como la expansión y la contracción pulmonar durante la respiración, el flujo pulsátil de sangre a través de los vasos sanguíneos debido al latido del corazón y el estiramiento y la contracción de la piel. Las fibras elásticas permiten el estiramiento elástico reversible y una relajación que lleva a una conformación enrollada de estos tejidos.

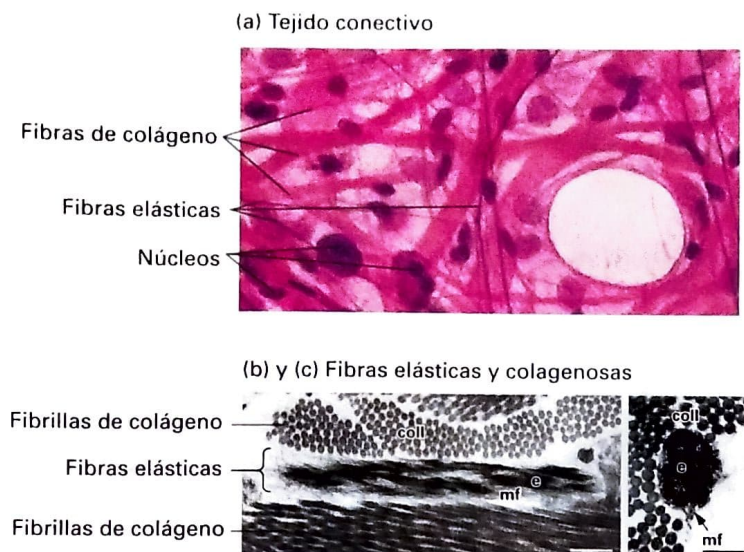


FIGURA 20-35 Fibras elásticas y de colágeno en el tejido conectivo. (a) Vista de microscopio óptico del tejido conectivo laxo del pulmón. Las fibras elásticas son las fibras delgadas que están teñidas de púrpura, las fibras de colágeno (haces de fibrillas de colágeno) están teñidas de rosa y los núcleos de las células están teñidos de púrpura. Vistas longitudinales (b) y transversales de microscopía electrónica de fibras elásticas y fibrillas de colágeno (coll) en la piel de un ratón. Las fibras elásticas tienen un centro sólido de elastina (e) integrado en y rodeado por un haz de microfibrillas (mf). Barras de escala, 0,25 μm . (Parte [a] de Science Photo Library; partes [b] y [c] de J. Choi y cols., 2009, *Matrix Biol.* 28 211-220.)

El principal componente de una fibra elástica, que puede ser de varios cientos a miles de nanómetros en su diámetro, es un centro insoluble, amorfo, compuesto de la proteína *elastina* rodeada por un conjunto de *microfibrillas* de 10-12 nm de diámetro constituidas por proteínas fibrilina, fibulina y proteínas asociadas (Fig. 20-35b). El centro está formado por la agregación de moléculas de *tropoelastina*, monómeros de elastina que están entrecruzados covalentemente por un proceso mediado por lisiloxidasas similar al visto en el colágeno. Los motivos de secuencia hidrófoba enriquecidos con glicina y prolina contribuyen a la capacidad de las tropoelastinas de autoasociarse y volver a enrollarse eficientemente después del estiramiento.

Una amplia variedad de enfermedades, que suelen involucrar anomalías cardiovasculares y esqueléticas, se producen como consecuencia de mutaciones en los genes que codifican las proteínas estructurales de las fibras elásticas o las proteínas que contribuyen a sus ensamblajes apropiados. Por ejemplo, mutaciones en el gen fibrilina-1 causa el síndrome de Marfan, cuya variedad de síntomas incluyen crecimiento excesivo de huesos, articulaciones laxas, anomalías en las extremidades largas y en la cara, y defectos cardiovasculares debido al debilitamiento en las paredes de los vasos y la aorta. Se ha especulado que el cuerpo alargado, inusualmente alto, del presidente Abraham Lincoln, podría haber sido una consecuencia del síndrome de Marfan. ■

En los mamíferos, la síntesis de la mayoría de la tropoelastina solo se produce inmediatamente antes y después del nacimiento durante los períodos fetal tardío y neonatal. Por lo tanto, la mayoría de la elastina del cuerpo debe durar toda la vida. La extraordinaria estabilidad de la

elastina se ha medido en una variedad de formas. Es posible utilizar experimentos de pulso y caza (véase el Cap. 3) mediante la administración de aminoácidos radioactivos para medir el tiempo de vida de la elastina en los animales. En los seres humanos, se utilizaron otros dos métodos para estudiar la longevidad de la elastina y revelaron que el tiempo de vida medio de una molécula de elastina en los pulmones humanos es de alrededor de 70 años! El primer método aprovecha un fenómeno que se produce naturalmente: la velocidad naturalmente lenta de la conversión del ácido L-aspartico (incorporado a las proteínas durante sus síntesis) a ácido D-aspartico. Por lo tanto, puede estimarse la edad de una proteína de larga vida usando análisis químico para determinar la fracción de su ácido L-aspartico que se ha convertido en el transcurso del tiempo a la isoforma D, junto con el conocimiento de la edad del tejido a partir del que se aisló. El segundo método es una variación de los clásicos experimentos de pulso y caza empleados en el laboratorio. Como consecuencia de las pruebas de armas nucleares en las décadas de 1950 y 1960, se introdujo el ^{14}C a la atmósfera y, por consiguiente, a la cadena alimenticia. Este ^{14}C ambiental se ha utilizado como un "pulso" radioactivo en lo que en esencia es un experimento de pulso y caza para determinar la estabilidad de proteínas de interés.

Las metaloproteasas remodelan y degradan la matriz extracelular

Muchos procesos fisiológicos claves, incluyendo la morfogénesis tisular durante el desarrollo, control de la proliferación y motilidad celular, la respuesta a las lesiones, e incluso la supervivencia, requieren no solo la producción de MEC sino también su remodelación o degradación. Debido a su gran importancia como un elemento clave en el microambiente extracelular de los organismos multicelulares, es preciso controlar cuidadosamente la remodelación/degradación de la MEC. La degradación de la MEC suele estar mediada por **metaloproteasas de la matriz dependientes de cinc (MMP)**. Dada la amplia variedad de conformaciones de los componentes de la MEC, no es sorprendente que existan muchas de tales metaloproteasas con variación de especificidad de sustrato y sitios de expresión. En muchos casos, sus nombres incorporan los de sus sustratos, como para las MMP llamadas colagenasas, gelatinasas, elastasas y agreganasas. Algunas son secretadas al líquido extracelular, y otras están estrechamente asociadas con las membranas plasmáticas de las células, ya sea unidas con fuerza en una asociación no covalente con la membrana o como proteínas integrales de membrana. En un principio, muchas son sintetizadas como precursoras inactivas que deben ser específicamente activadas para funcionar.

Existen tres subgrupos principales de proteasas de la MEC según las estructuras de las enzimas: las MMP (de las cuales existen 23 en los seres humanos), una disintegrina y metaloproteinasas (ADAM), y ADAM con motivos de trombospondina (ADAMTS). Estas proteasas pueden degradar componentes de la MEC así como también aquellos que no son de la MEC, como los receptores de adhesión de la superficie. En efecto, una función clave de las ADAM es el corte de dominios extracelulares de los sustratos de proteínas integrales de membrana. Un mecanismo empleado para controlar las actividades de estas proteasas es la producción de inhibidores proteicos denominados TIMP (inhibidores tisulares de metaloproteinasas) y RECK (proteína inductora de la reversión rica en cisteína con motivos kazal). Algunas de estas tienen sus propios receptores de superficie celular y funciones independientes de su capacidad para inhibir las metaloproteinasas. Las proteasas que degradan la MEC están asociadas

das con una variedad de enfermedades; la más conocida es el cáncer metastásico (diseminación) (véase el Cap. 24).

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 20.4

La matriz extracelular II: tejido conectivo

- El tejido conectivo, como el tendón y el cartilago, difieren de otros tejidos en que la mayoría de su volumen está constituido por matriz extracelular (MEC) en lugar de por células.
- La síntesis de colágeno fibrilar (p. ej., tipos I, II y III) comienza dentro de la célula con la modificación química de cadenas α recién sintetizadas y su ensamblaje para formar procolágeno triple hélice dentro del retículo endoplasmático. Después de la secreción, las moléculas de procolágeno son cortadas, se asocian lateralmente y se forman enlaces cruzados covalentes para constituir haces llamados fibrillas, que a su vez pueden formar ensamblados más grandes denominados fibras (véase la Fig. 20-26).
- Los diversos colágenos se distinguen por la capacidad de cualquiera de sus regiones helicoidales y no helicoidales para asociarse en fibrillas, formar hebras o entrecruzar otros tipos de colágeno (véase el Cuadro 20-4).
- Los proteoglucanos consisten en proteínas centrales secretadas o asociadas a membrana unidas covalentemente a una o más cadenas de glucosaminoglucano (GAG), que son polímeros lineales de disacáridos que suelen estar modificados por sulfatación.
- Los proteoglucanos de la superficie celular como los sindecanos facilitan las interacciones célula-matriz y ayudan a presentar ciertas moléculas de señalización externas a sus receptores de la superficie celular.
- El hialuronano, una GAG altamente hidratada, es un componente principal de la MEC de células en migración o proliferación. Ciertos receptores de adhesión de la superficie celular unen hialuronano a las células.
- Los agregados de proteoglucanos grandes que contienen una molécula de hialuronano central unida de forma no covalente a la proteína centro de las moléculas de proteoglucano (p. ej., agregán) contribuyen a la capacidad de la matriz para resistir fuerzas compresivas (véase la Fig. 20-31).
- Las fibronectinas son proteínas multiadhesivas de la matriz que cumplen un papel clave en la migración y la diferenciación celular. Contienen sitios de unión para las integrinas y componentes de la MEC (colágenos, proteoglucanos) y, por lo tanto, pueden adherir células a la matriz (véase la Fig. 20-32).
- La secuencia de tripéptido RGD (Arg-Gly-Asp), que se encuentra en las fibronectinas y algunas proteínas de la matriz, es reconocida por diversas integrinas.
- Las fibras elásticas permiten estiramientos y relajaciones repetidas de los tejidos debido a su centro altamente elástico de elastina amorfa, entrecruzada, que está rodeada por una malla de microfibrillas.
- La remodelación/degradación de la MEC suele estar mediada por una gran cantidad de metaloproteasas asociadas a la membrana celular que se encuentran dentro de varias familias (MMP, ADAM, ADAMTS) y cuyas actividades están reguladas por la activación y por inhibidores de proteínas (TIMP y RECK).

20.5 Interacciones adhesivas en células móviles y no móviles

Una vez formadas las interacciones adhesivas durante la diferenciación, suelen ser muy estables y pueden durar todo el período de vida de las células o hasta que el epitelio sufra posteriores diferenciaciones. Aunque tal adhesión de larga duración (no móviles) también exista en los tejidos no epiteliales, algunas células no epiteliales deben ser capaces de arrastrarse a través o por una capa de la matriz extracelular u otras células. Más aún, durante el desarrollo o la cicatrización de heridas y en ciertos estados patológicos (p. ej., cáncer), las células epiteliales pueden transformarse en más células móviles (la transición epitelial-mesenquimática). Los cambios en la expresión de las moléculas adhesivas cumplen una tarea en esta transformación, como lo hacen en otros procesos biológicos que involucran el movimiento celular, como el movimiento de los glóbulos blancos hacia los tejidos infectados. En esta sección, se describen varias estructuras de la superficie celular que median las interacciones adhesivas transitorias que están especialmente adaptadas para el movimiento de las células, como así también aquellas que median la adhesión de larga duración. Los mecanismos intracelulares detallados utilizados para generar las fuerzas mecánicas que impulsan las células y modificar sus formas se tratan en los Capítulos 17 y 18.

Las integrinas liberan señales entre las células y sus ambientes tridimensionales

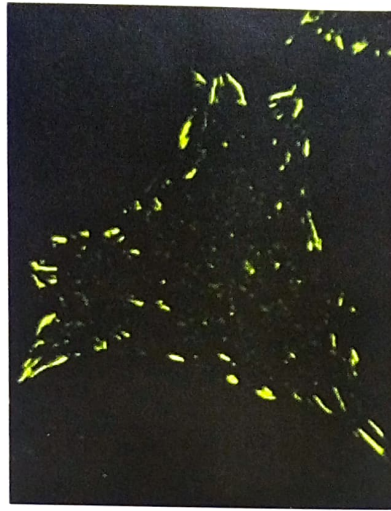
Como se analizó anteriormente, las integrinas conectan las células epiteliales a la lámina basal y, a través de proteínas adaptadoras, a filamentos intermedios del citoesqueleto (véase la Fig. 20-1). Es decir, las integrinas forman un puente entre la MEC y el citoesqueleto; hacen lo mismo en las células no epiteliales. En las células no epiteliales, las integrinas en la membrana plasmática también se agrupan con otras moléculas en varias estructuras adhesivas llamadas adhesiones focales, contactos focales, complejos focales, adhesiones 3-D y adhesiones fibrilares, como así también en las adhesiones circulares llamadas podosomas. Estas estructuras son complejos multiproteínas que colectivamente se denominan adhesoma de integrinas. Estos complejos median el acoplamiento mecanosensitivo entre las células y sus ambientes, y se observan rápidamente por microscopia de fluorescencia con el uso de anticuerpos que reconocen las integrinas u otras moléculas coagrupadas (Fig. 20-36). Al igual que con las uniones de anclaje entre célula y matriz en las células epiteliales, las diversas estructuras de adhesión adhieren las células no epiteliales a la matriz extracelular a través de, por ejemplo, la unión a fibronectina (véase la Fig. 20-34). Ellas también median la asociación de integrinas con el citoesqueleto de actina y activan las señales dependientes de adhesión para el crecimiento y la movilidad celular (véase la Fig. 20-8).

Las estructuras adhesivas que contienen integrinas son dinámicas (componentes que se mueven constantemente hacia dentro y hacia afuera de las células) y contienen docenas de adaptadores intracelulares y proteínas asociadas (más de 190 identificadas hasta la fecha) con el potencial de participar en muchos cientos (más de 740) de interacciones entre proteínas que pueden ser sometidas a regulación. Por ejemplo, los sitios de unión generados por fosforilación de las integrinas y sus proteínas asociadas, así como también por generación de derivados fosforilados del fosfatidilinositol en la membrana adyacente, reclutan proteínas adicionales y también pueden provocar la

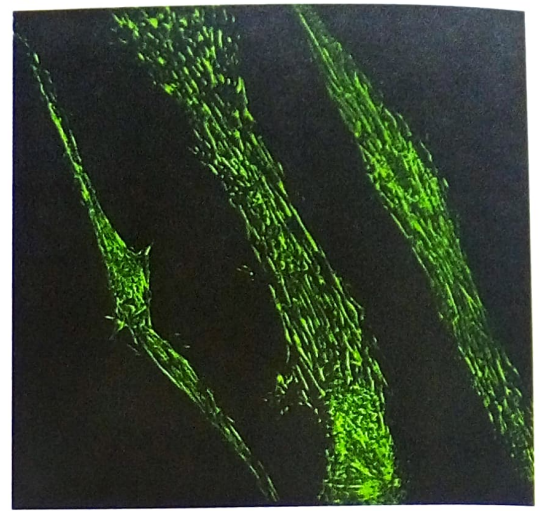
FIGURA EXPERIMENTAL 20-36 Grupos de integrinas en estructuras adhesivas con diversas morfologías en células no epiteliales.

Se utilizaron métodos de inmunofluorescencia para detectar estructuras adhesivas (verde) sobre células cultivadas. Aquí se muestran las adhesiones focales (a) y las adhesiones 3D (b) sobre las superficies de fibroblastos humanos. Las células fueron cultivadas directamente sobre la superficie plana de una placa de cultivo (a) o sobre una matriz tridimensional de componentes de la MEC (b). La forma, la distribución y la composición de las adhesiones basadas en la integrina formadas por las células varían, dependiendo del ambiente de las células. (Parte [a] de B. Geiger y cols., 2001, *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2:793; parte [b] cortesía de K. Yamada y E. Cukierman; véase E. Cukierman y cols., 2001, *Science* 294:1708-1712.)

(a) Adhesión focal



(b) Adhesión 3D



liberación de algunas proteínas desde estos complejos multiproteína. Existe una coreografía fuertemente controlada de señales internas, contribuciones de otras vías de señalización tales como las que implican tirosina-cinasas (véase la Fig. 20-8) y señales externas (como la rigidez de la MEC), que regula estos complejos. Juntos, contribuyen a definir la composición y actividad precisa del complejo multiproteico de integrinas y la influencia consiguiente que tiene sobre la estructura y la actividad celular (efecto desde afuera hacia adentro), como así también la influencia del citoesqueleto de actina sobre la MEC (efecto desde adentro hacia afuera).

Aunque se encuentran en muchas células no epiteliales, las estructuras adhesivas que contienen integrina han sido estudiadas con mayor frecuencia en fibroblastos que crecen en cultivos celulares sobre placas de vidrio o superficies plásticas llamados sustrato. Estas condiciones solo se aproximan pobremente al ambiente tridimensional de la MEC que por lo general rodea a las células in vivo. Cuando los fibroblastos se cultivan en matrices de MEC tridimensional derivadas de células o tejidos, forman adhesiones al sustrato tridimensional de la MEC, llamadas adhesiones 3D. Estas estructuras difieren un poco en composición, forma, distribución y actividad respecto de las adhesiones focales o fibrilares vistas en los crecimientos de células sobre sustrato plano que se suelen usar en los experimentos de cultivo celular (véase la Fig. 20-36). Los fibroblastos cultivados con estas uniones de anclaje “más naturales” exhiben mayor adhesión y movilidad, lo que aumenta las tasas de proliferación celular, y las morfologías con forma de huso más parecidas a la de los fibroblastos de los tejidos que a las células cultivadas sobre superficies planas. Estas observaciones indican que las propiedades topológicas, de composición y mecánicas de la matriz extracelular cumplen una función en el control de la forma y la actividad de una célula. Las diferencias específicas de tejido en estas características de la matriz probablemente contribuyen a las propiedades específicas de tejido.

La importancia del ambiente 3D de las células ha sido destacada en estudios de cultivos de células de la morfogénesis, el funcionamiento y la estabilidad de células epiteliales mamarias productoras de leche y sus contrapartidas transformadas en cancerígenas. Por ejemplo, la señalización desde afuera hacia adentro dependiente de matriz 3D mediada por integrinas influye en el sistema de señalización del receptor tirosina-cinasa del factor de crecimiento epidérmico y viceversa. La matriz

3D también permite que las células epiteliales mamarias generen estructuras epiteliales circulares similares a las in vivo, llamadas ácidos. Los ácidos secretan los principales constituyentes proteicos y permiten comparaciones de las respuestas de células normales y cancerosas para potenciales agentes quimioterapéuticos. Están desarrollándose sistemas análogos que utilizan tanto MEC 3D natural como sintética para proporcionar más condiciones similares a las in vivo a fin de estudiar otros tejidos complejos y órganos, como el hígado.

La regulación de la adhesión mediada por integrinas y la señalización controlan el movimiento celular

Las células pueden controlar de manera minuciosa la fuerza de las interacciones entre célula y matriz mediada por integrinas al regular los niveles de expresión de las integrinas, las actividades de unión al ligando, o ambas. Tal regulación es crucial para la función de estas interacciones en la migración celular y otras funciones que involucran el movimiento celular.

Unión de integrinas Muchas integrinas, si no todas, integrinas pueden existir en dos conformaciones: una forma de baja afinidad (inactiva) y una forma de alta afinidad (activa) (Fig. 20-37a). Los resultados de estudios estructurales y los experimentos de investigación de unión de ligandos por las integrinas han proporcionado un modelo de los cambios que ocurren cuando las integrinas son activadas. En el estado inactivo, el heterodímero $\alpha\beta$ se dobla (Fig. 20-37a, parte superior; y 20-37c), la conformación del sitio de unión al ligando en la punta de la molécula permite solo la unión de ligandos de baja afinidad, y los dominios transmembrana y las colas citoplasmáticas C-terminales de las dos subunidades están estrechamente unidas. En el estado activo, alteraciones estructurales sutiles en la conformación de los dominios que forman el sitio de unión permiten la unión de ligandos de manera más ajustada (alta afinidad) y esto está acompañado por la separación de los dominios transmembrana y citoplasmáticos (Fig. 20-37a, arriba). La activación está acompañada por el enderezamiento de la conformación curvada hacia una forma lineal

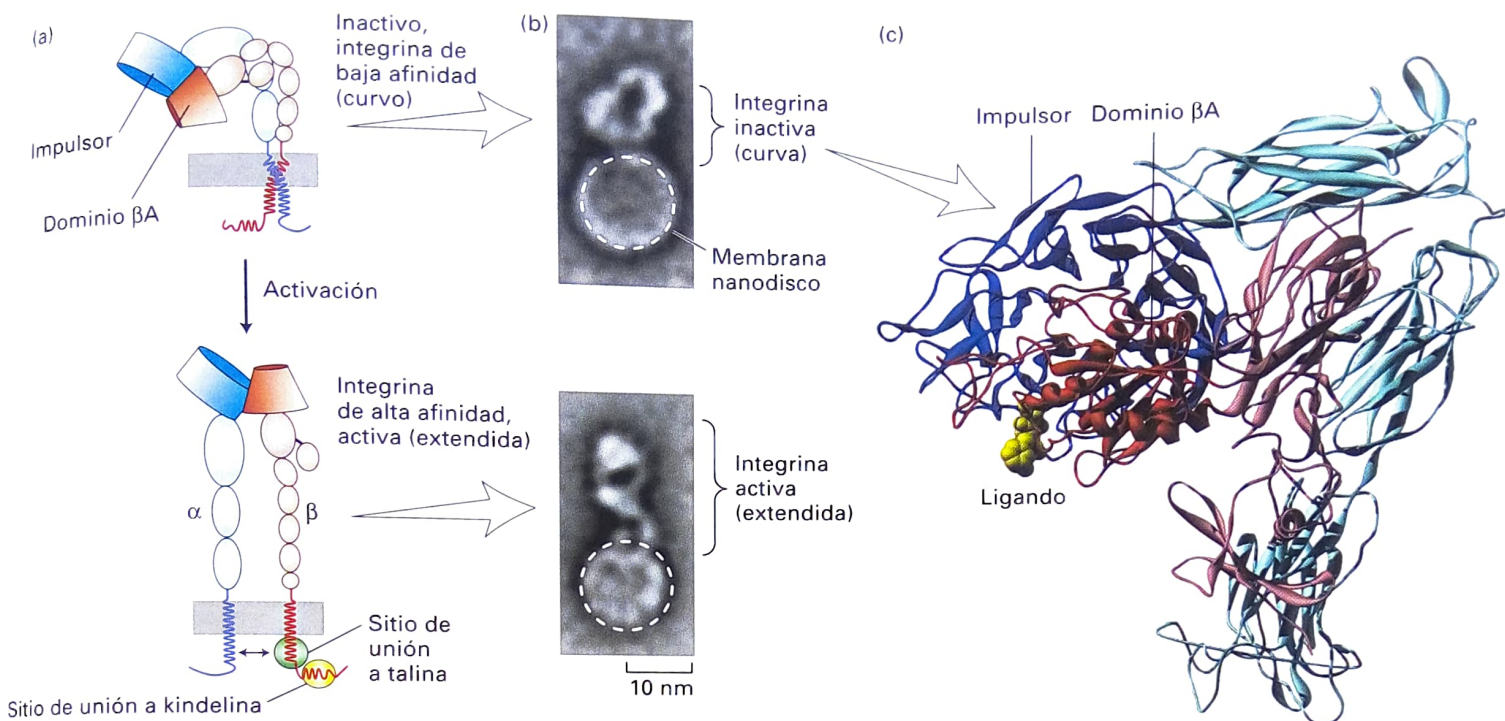


FIGURA EXPERIMENTAL 20-37 Modelo para la activación de integrinas. (a) Se cree que la activación de las integrinas se debe a cambios conformacionales que incluyen movimientos clave cerca de los dominios impulsores y βA , que incrementan la afinidad para ligandos. Estos están acompañados por rectificaciones de la molécula desde la conformación "curvada" inactiva, de baja afinidad (*arriba*), hasta la conformación "extendida" activa, de alta afinidad (*abajo*). La activación también involucra la separación (indicada por flecha de doble punta, abajo) de los dominios transmembrana y citoplasmáticos, inducidos por o resultante de las interacciones alteradas con proteínas adaptadoras talina y kindelina, cuyos sitios de unión a la cola citoplasmática de la cadena β están indicados por óvalos verdes y amarillos, respectivamente. (b) Las moléculas de integrina $\alpha IIb \beta 3$ inactiva (curvada) (panel superior) fueron incorporadas a los nanodiscos de fosfolípidos (bicapas pequeñas en las cuales los dominios extracelulares y citoplasmáticos de la integrina están expuestos al tampón) y a algunos de estos (panel inferior)

se les añadieron el dominio de unión a integrina y el dominio "cabeza" de activación de la proteína adaptadora talina. Se recolectaron y promediaron múltiples imágenes de microscopía electrónica de los discos individuales. Los nanodiscos de fosfolípidos se indican mediante círculos blancos de línea punteada, las alturas de las regiones extracelulares de la integrina que se extienden por encima de los nanodiscos están indicadas por corchetes. (c) Un modelo molecular de la región extracelular de la integrina $\alpha v \beta 3$ en su forma inactiva, de baja afinidad ("curvada"), con la subunidad α en tonos de azul y la subunidad β en tonos de rojo se basa en la estructura de cristalografía de rayos X. Los principales sitios de unión al ligando se encuentran en la punta de la molécula, donde interactúan el dominio impulsor de la subunidad α (azul oscuro) y el dominio βA (rojo oscuro). Un ligando péptido RGD se muestra en amarillo. (Adaptado de M. Arnaout y cols., 2002, *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**:641; R. I. Hynes, 2002, *Cell* **110**:673; Feng Ye y cols., 2010, *J CELL BIOL.* **188**:157-73; y M. Moser y cols., 2009, *Science* **324**:895-899.)

más extendida, en la cual el sitio de unión al ligando se proyecta más lejos respecto de la superficie de la membrana (véase la Fig. 20-37).

Estos modelos estructurales proporcionan una explicación atractiva para la capacidad de las integrinas de mediar la señalización desde afuera hacia adentro y desde adentro hacia afuera. La unión de ciertas moléculas de la MEC o de las CAM en otras células al sitio de unión al ligando extracelular de la integrina podría obstaculizarla en la forma activa con colas citoplasmáticas separadas. Los adaptadores intracelulares podrían "censar" la separación de las colas y, como resultado, unirse a ellas o disociarse. Por consiguiente, los cambios en estos adaptadores podrían alterar el citoesqueleto y activar o inhibir las vías de señalización intracelular. A la inversa, los cambios en el estado metabólico/señalización de las células podrían causar que los adaptadores intracelulares se unan a las colas citoplasmáticas de las integrinas o se disocien de ellas y así forzar a las colas a separarse o asociarse. Como consecuencia, la integrina podría curvarse (inactivarse) o extenderse (activarse), y de esta manera alterar su interacción con la MEC u otras células. En efecto, estudios in vitro de integrinas purificadas y reconstituidas individualmente para formar bicapas lipídicas "nano-

discos" demuestran que la unión del dominio globular de la proteína adaptadora talina a la cola citoplasmática de las cadenas β de la integrina es suficiente para activar la integrina e inducir una extensión de la conformación curva a una forma activa, extendida (Fig. 20-37a, parte superior; y 20-37b, parte inferior). Otros estudios sugieren que la activación de las integrinas en las células intactas también puede requerir la participación de otra clase de proteínas adaptadoras llamadas *kindlinas*, que se unen a distintos sitios de la cola citoplasmática de la cadena β integrina (véase Fig. 20-37a, abajo).

La función plaquetaria, analizada en más detalle a continuación, proporciona un buen ejemplo de cómo las interacciones entre célula y matriz están moduladas al controlar la actividad de unión de la integrina. Las plaquetas son fragmentos celulares que circulan en la sangre y se agrupan con moléculas de la MEC para formar coágulos de sangre. En su estado basal, la integrina $\alpha IIb \beta 3$ presente en las membranas plasmáticas de las plaquetas por lo general no puede unirse fuertemente a sus ligandos proteicos (incluyendo fibrinógeno y fibronectina), todos los cuales participan en la formación de un coágulo de sangre, debido a que están en la conformación inactiva (curva). Durante la formación

del coágulo, las plaquetas se unen a proteínas de la MEC como el colágeno y a una proteína grande llamada factor von Willibrand a través de receptores que generan señales intracelulares. Las plaquetas también pueden ser activadas por el ADP o la enzima de coagulación, llamada trombina. Estas señales inducen alteraciones en las vías de señalización en el citoplasma que resultan en un cambio conformacional activador en la integrina $\alpha\text{IIb}\beta3$ de la plaqueta. Como consecuencia, esta integrina luego puede unirse fuertemente a las proteínas de coagulación y participar en la formación del coágulo. Las personas con defectos genéticos en la subunidad $\beta3$ son propensas al sangrado excesivo, hecho que avala la función de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta3$ en la formación de coágulos sanguíneos (véase el Cuadro 20-3).

Expresión de integrinas Las adhesiones de las células a los componentes de la MEC también pueden modularse por alteración de la cantidad de moléculas de integrina expuestas sobre la superficie celular. La integrina $\alpha4\beta1$, que se encuentra en muchas células hematopoyéticas, ofrece un ejemplo de este mecanismo regulador. Para que estas células hematopoyéticas proliferen y se diferencien, deben estar adheridas a las fibronectinas sintetizadas por las células de sostén (estromales) en la médula ósea. La integrina $\alpha4\beta1$ sobre las células hematopoyéticas se une a una secuencia Glu-Ile-Leu-Asp-Val (EILDV) en la fibronectina, y ancla así las células a la matriz. Esta integrina también se une a una secuencia en una CAM llamada CAM-1 vascular (VCAM-1), que está presente en las células estromales de la médula ósea. Por lo tanto, las células hematopoyéticas contactan directamente las células estromales, como así también las adhieren a la matriz. Más tarde en sus diferenciaciones, las células hematopoyéticas disminuyen la expresión de esta integrina. Se cree que la reducción resultante en la cantidad de moléculas de integrina $\alpha4\beta1$ sobre la superficie celular permite madurar las células sanguíneas para despegarse de las células de la matriz y de las estromales en la médula ósea y, por consiguiente, entrar en la circulación.

Las conexiones entre la MEC y el citoesqueleto son defectuosas en la distrofia muscular

La importancia de la unión mediada por receptor de adhesión entre los componentes de la MEC y el citoesqueleto se destaca por un grupo de enfermedades de desgaste muscular hereditario, colectivamente llamado distrofias musculares. La distrofia muscular de Duchenne (DMD), el tipo más común, es un trastorno ligado al sexo y afecta a 1 cada 3 300 varones. Esta patología produce una falla cardíaca o respiratoria, en general en la adolescencia tardía o los veinte años. El primer indicio para comprender las bases moleculares de esta enfermedad proviene del descubrimiento de que las personas con DMD portan mutaciones en el gen que codifica una proteína llamada *distrofina*. Se encontró que esta proteína, muy grande, era citosólica adaptadora y se une a filamentos de actina y a un receptor de adhesión denominado *distroglicano* (Fig. 20-38).

El distroglicano se sintetiza como un precursor glucoproteico que es escindido proteolíticamente en dos subunidades poco tiempo después de su síntesis y antes de que se mueva a la superficie celular. La subunidad α es una proteína periférica de membrana, y la subunidad β es una proteína transmembrana cuyo dominio extracelular se asocia con la subunidad α (Fig. 20-38). Múltiples oligosacáridos O-ligados se adhieren de manera covalente a grupos hidroxilos de cadenas laterales de residuos de serina o treonina en la subunidad α . A diferencia de los oligosacáridos O-ligados más abundantes, también denominados simi-

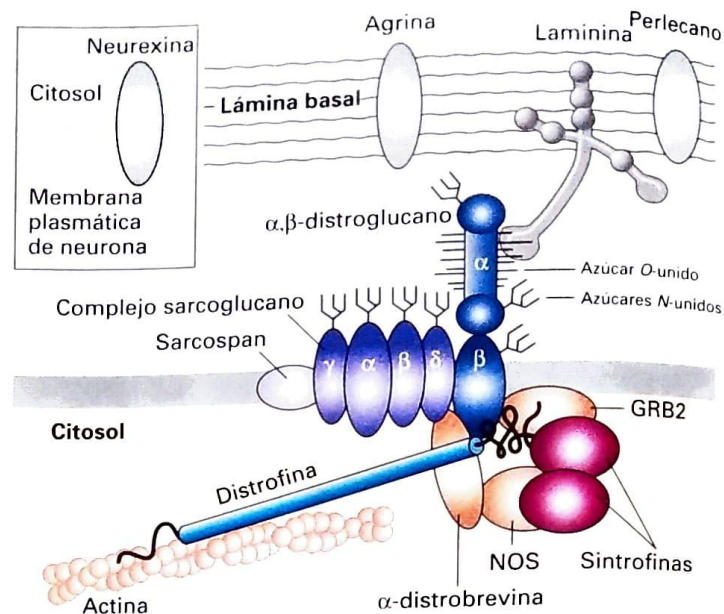


FIGURA 20-38 El complejo glucoproteico distrofina (DGC) en las células de músculo esquelético. Este modelo esquemático muestra que el DGC comprende tres subcomplejos: el subcomplejo distroglicano α,β , el subcomplejo sarcoglucano/sarcospan de proteínas integrales de membrana y el subcomplejo adaptador citosólico que comprende la distrofina, otras proteínas adaptadoras, y moléculas de señalización. A través de sus azúcares O-unidos, el β -distroglicano se une a sus componentes de la lámina basal, como la laminina y el perlecano, y proteínas de la superficie celular, como la neurexina en las neuronas. La distrofina –proteína defectuosa en la distrofia muscular de Duchenne– une el β -distroglicano al citoesqueleto de actina, y la α -distrobrevina une la distrofina al subcomplejo sarcoglucano/sarcospan. La óxido nítrico sintasa (NOS) produce el óxido nítrico, una molécula de señalización gaseosa, y la GRB2 es un componente de las vías de señalización activada por ciertos receptores de la superficie celular (véase el Cap. 15).

(Adaptado de S. J. Winder, 2001, *Trends Biochem. Sci.* **26**:118, y D. E. Michele y K. P. Campbell, 2003, *J. Biol. Chem.* **278**(18):15457-15460)

lares a mucina, en los cuales un N-acetilgalactosamina (GalNAc) es el primer azúcar en la cadena unido directamente al grupo hidroxilo de la cadena lateral de serina o treonina (Fig. 20-20b) o la unión en proteoglicanos (Fig. 20-29a), muchas cadenas O-ligadas en el distroglicano se unen directamente al grupo hidroxilo a través de un azúcar manosa (véase la Fig. 20-29c).

Estos oligosacáridos O-ligados especializados se unen a varios componentes de la lámina basal, incluyendo los dominios LG de la proteína multiadhesiva laminina de la matriz y de los proteoglicanos perlecano y agrina. Las neurexinas, una familia de moléculas de adhesión expresadas en las neuronas, también se unen a través de estos oligosacáridos especializados, cuyas estructuras heterogéneas y mecanismos de síntesis todavía no se han elucidado por completo.

El segmento transmembrana de la subunidad β distroglicano se asocia con un complejo de proteínas integrales de membrana; su dominio citosólico une distrofina y otras proteínas adaptadoras, como así también diversas proteínas de señalización intracelular (véase la Fig. 20-38). El ensamblado heterodimérico, grande, el *complejo distrofinaglicoproteico* (DGC), conecta la matriz extracelular al citoesqueleto y a las vías de señalización dentro las células musculares y otros tipos de células. Por ejemplo, la enzima de señalización óxido nítrico sintasa (NOS) se asocia a través de la sintrofina con el sub-

complejo citosólico distrofina del músculo esquelético. El aumento de Ca^{2+} intracelular durante la contracción muscular activa la NOS para producir óxido nítrico (NO), una molécula de señalización que se difunde dentro de las células de músculo liso que rodean los vasos sanguíneos. NO estimula la relajación del músculo liso y produce así un aumento local del flujo sanguíneo que suministra nutrientes y oxígeno al músculo esquelético.

Las mutaciones en la distrofina, en otros componentes de la DGC, en la laminina o en enzimas que añaden los azúcares O-unidos al distroglucano pueden desestabilizar la conexión mediada por DGC entre el exterior y el interior de las células musculares y causar distrofias musculares. Además, las mutaciones de los distroglucanos han demostrado reducir en gran medida el agrupamiento de los receptores de acetilcolina en las células musculares en las uniones neuromusculares, que también son dependientes de las proteínas de la lámina basal laminina y agrina. En apariencia, estos y otros posibles efectos del DGC llevan a un debilitamiento acumulativo de la estabilidad mecánica de las células musculares a medida que sufren contracción y relajación, lo que produce el deterioro de las células y la distrofia muscular.

Los distroglucanos proporcionan un ejemplo minucioso e importante desde el punto de vista médico de las redes intrincadas de conectividad en la biología celular. Originalmente, el distroglucano se descubrió en el contexto del estudio de la DMD. Sin embargo, luego se demostró que se expresaba en las células no musculares y, a través de su unión a la laminina, cumplía un papel en el ensamblado y la estabilidad de al menos algunas membranas basales. Así, resulta esencial para el desarrollo normal. Los estudios adicionales llevaron a su identificación como un receptor de la superficie celular para el virus que causa la enfermedad humana mortal fiebre de Lassa y otras relacionadas con virus, todas las cuales se unen a través de los mismos azúcares O-ligados especializados que median la unión de la laminina. Por otro lado, el distroglucano también es el receptor de células especializadas en el sistema nervioso (células de Schwann) que unen la bacteria patógena *Mycobacterium leprae*, organismo causante de la lepra. ■

Las IgCAM median la adhesión entre célula y célula en los tejidos neuronales y en otros

Numerosas proteínas transmembrana caracterizadas por la presencia de múltiples dominios de inmunoglobulina en sus regiones extracelulares constituyen la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig) de las CAM, o **IgCAM**. El dominio Ig es un dominio proteico común, que contiene 70-110 residuos, y fue identificado por primera vez en los anticuerpos, las inmunoglobulinas que unen antígeno, pero que tiene un origen evolutivo mucho más ancestral en las CAM. Los genomas humano, de *D. melanogaster* y de *C. elegans* incluyen alrededor de 765, 150 y 64 genes, respectivamente, que codifican proteínas con dominios Ig. Los dominios de inmunoglobulina se encuentran en una amplia variedad de proteínas de la superficie celular, incluyendo los receptores de célula T producidos por los linfocitos y muchas proteínas que participan en interacciones adhesivas. Entre las IgCAM se encuentran las CAM neurales, las CAM intercelulares (ICAM), que funcionan en el movimiento de los leucocitos hacia el interior de los tejidos, y las moléculas de adhesión a unión (JAM), presentes en las uniones estrechas.

Como lo implican sus nombres, las CAM neurales son de particular importancia en los tejidos neuronales. Un tipo, las NCAM, median principalmente interacciones homófilas. Expresadas por primera vez

durante la morfogénesis, las NCAM cumplen un papel importante en la diferenciación de las células musculares, nerviosas y gliales. Su papel en la adhesión celular se demostró directamente mediante la inhibición de la adhesión con anticuerpos anti-NCAM. Numerosas isoformas de NCAM, codificadas por un único gen, se generan mediante corte y empalme alternativo por diferencias en la glucosilación. Otras CAM neurales (p. ej., las L1-CAM) son codificadas por genes diferentes. En los seres humanos, las mutaciones en diferentes partes del gen L1-CAM causan diversas neuropatologías (p. ej., retraso mental, hidrocefalia congénita y espasticidad).

Una NCAM comprende una región extracelular con cinco dominios Ig y dos dominios de fibronectina tipo III, un único dominio que atraviesa la membrana, un segmento citosólico que interactúa con el citoesqueleto (véase la Fig. 20-2). Por el contrario, la región extracelular de L1-CAM tiene seis dominios Ig y cuatro dominios de fibronectina tipo III. Al igual que con las cadherinas, las interacciones cis (intracelulares) y las trans (extracelulares) probablemente cumplen funciones clave en la adhesión mediada por IgCAM (véase la Fig. 20-3); sin embargo, la adhesión mediada por IgCAM es independiente de Ca^{2+} .

La adhesión covalente de múltiples cadenas de ácido siálico, un derivado del azúcar cargado negativamente, a las NCAM altera sus propiedades adhesivas. En los tejidos embrionarios como el cerebro, el ácido polisialílico constituye tanto como el 25% de la masa de NCAM. Posiblemente debido a la repulsión entre los muchos azúcares cargados negativamente en estas NCAM, los contactos entre célula y célula son bastante transitorios, se forman y se rompen, una propiedad necesaria para el desarrollo del sistema nervioso. Por el contrario, las NCAM del tejido adulto contienen como mucho solo un tercio de ácido siálico, lo cual permite adhesiones más estables.

El movimiento de leucocitos hacia el interior de los tejidos está orquestado por una secuencia precisamente sincronizada de interacciones adhesivas

En los organismos adultos, diversos tipos de glóbulos blancos (leucocitos) participan en la defensa contra infecciones causadas por bacterias y virus o por tejido dañado debido a traumatismo o inflamación. Para luchar contra la infección y separar el tejido dañado, estas células deben moverse rápidamente desde la sangre, donde circulan como células relativamente quiescentes, sin adherirse, hacia el tejido subyacente en los sitios de infección, inflamación o daño. Conocemos mucho acerca del movimiento hacia el interior de los tejidos, llamado *extravasación*, de cuatro tipos de leucocitos: neutrófilos, que liberan diversas proteínas antibacterianas; monocitos, los precursores de los macrófagos, que pueden engullir y destruir partículas extrañas; y linfocitos T y B, las células del sistema inmunitario que reconocen antígenos (véase el Cap. 23).

La extravasación requiere la formación sucesiva y la rotura de contactos entre célula y célula entre los leucocitos en las células sanguíneas y endoteliales que revisten los vasos. Algunos de estos contactos están mediados por las **selectinas**, una familia de las CAM que median las interacciones entre células vasculares y leucocitos. Un participante clave en estas interacciones es la *P-selectina*, localizada sobre la superficie orientada hacia la sangre de las células endoteliales. Todas selectinas contienen un *dominio lectina* dependiente de Ca^{2+} , que está localizado en el extremo distal de la región extracelular de la molécula y reconoce azúcares particulares

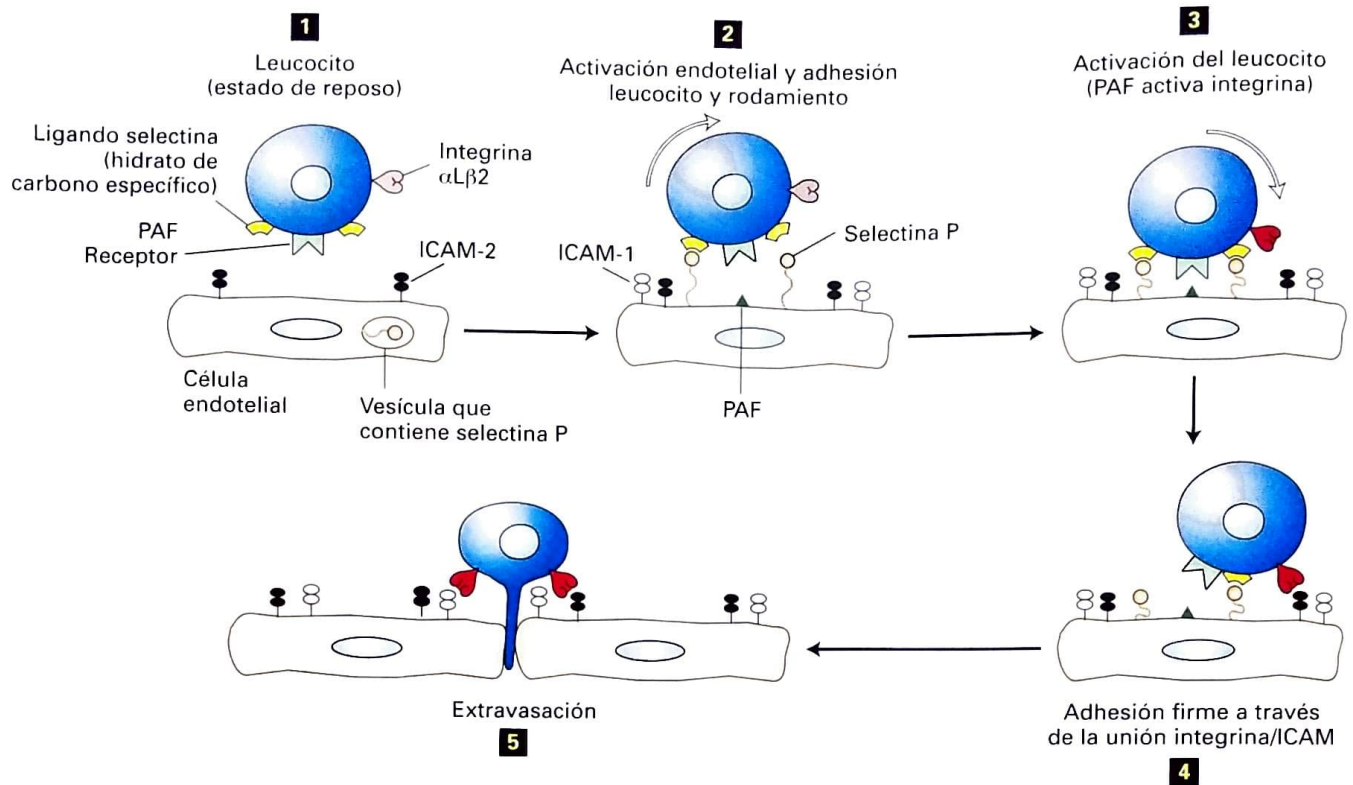


FIGURA 20-39 Interacciones endoteliales-leucocitarias: activación, unión, rodamiento y extravasación. Paso (1): en ausencia de inflamación o infección, las células leucocitarias y endoteliales que recubren los vasos sanguíneos están en un estado de reposo. Paso (2): las señales inflamatorias liberadas solo en zonas de inflamación, infección o ambas activan las células endoteliales en reposo para mover selectinas secuestradas en vesículas hasta la superficie celular. Las selectinas expuestas median la unión débil de los leucocitos mediante interacción con ligandos de hidratos de carbono sobre los leucocitos. El flujo sanguíneo fuerza a los leucocitos débilmente unidos a rodar

a lo largo de la superficie endotelial de los vasos sanguíneos. La activación del endotelio causa la síntesis del factor de activación plaquetario (PAF) y la ICAM-1, ambos expresados sobre la superficie celular. PAF y otros activadores secretados, incluyendo las quimiocinas, luego inducen cambios en las formas de las integrinas de leucocitos como $\alpha L \beta 2$, que es expresada por los linfocitos T (paso 3). La posterior unión fuerte entre las integrinas activadas sobre los leucocitos y las CAM sobre el endotelio (p. ej., ICAM-2 e ICAM-1) provoca la adhesión firme (paso 4) y el movimiento subsiguiente (extravasación) hacia el tejido subyacente (paso 5). (Adaptado de R. O. Hynes y A. Lander, 1992, *Cell* 68:303.)

en glucoproteínas o glucolípidos (véase la Fig. 20-2). Por ejemplo, el ligando primario para las selectinas P y E es un oligosacárido llamado el *antígeno x sialilo de Lewis*, parte de oligosacáridos más largos presentes en forma abundante en glucoproteínas y glucolípidos de leucocitos.

La Figura 20-39 ilustra la secuencia básica de las interacciones entre célula y célula que llevan a la extravasación de leucocitos. Las varias señales inflamatorias liberadas en zonas de infección o inflamación primero provocan la activación del endotelio. La selectina P expuesta sobre la superficie de las células endoteliales activadas media la adhesión débil de los leucocitos circulantes. Debido a la fuerza del flujo sanguíneo y a la rápida velocidad de “encendido” y “apagado” de la unión de la selectina P a sus ligandos, estos leucocitos “atrapados” se desplazan de forma más lenta, pero no se detienen y literalmente ruedan a lo largo de la superficie del endotelio. Entre las señales que estimulan la activación del endotelio se encuentran las **quimiocinas**, un grupo de pequeñas proteínas secretadas (8-12 kDa) producidas por una amplia variedad de células, que incluyen las células endoteliales y los leucocitos.

Para que la adhesión estrecha ocurra entre las células endoteliales y los leucocitos, las integrinas que contienen $\beta 2$ sobre las superficies de los leucocitos también deben ser activadas indirectamente por

quimiocinas u otras señales de activación local, como el *factor activador de plaquetas (PAF)*. El factor activador de plaquetas es inusual, ya que es un fosfolípido en lugar de ser una proteína; es expuesto sobre la superficie de las células endoteliales activadas al mismo tiempo que se expone la selectina P. La unión de PAF u otros activadores a sus receptores *acoplados a la proteína G* sobre los leucocitos lleva a la activación de las integrinas de los leucocitos a sus formas de alta afinidad (véase la Fig. 20-37). Las integrinas activadas sobre los leucocitos luego se unen a las IgCAM distintivas sobre la superficie de las células endoteliales. Estas incluyen la ICAM-2, que se expresa de manera constitutiva, y la ICAM-1. Esta última, cuya síntesis es inducida por activación, no suele contribuir sustancialmente a la adhesión de las células endoteliales a los leucocitos inmediatamente después de la activación, sino que participa más tardíamente en casos de inflamación crónica. La fuerte adhesión resultante mediada por las interacciones de integrina-ICAM independiente de Ca^{2+} conduce al cese del rodamiento y a la diseminación de los leucocitos sobre la superficie del endotelio; pronto, las células adheridas se mueven entre las células endoteliales adyacentes y hacia el interior del tejido subyacente. El paso de extravasación en sí mismo (también denominado transmi-

gración o diapédesis; paso 5 en la Fig. 20-39) requiere la disociación de interacciones por lo demás estables entre células endoteliales que son principalmente mediadas por la CAM VE-cadherina. Existe un acuerdo general respecto de que las interacciones de leucocitos con las células endoteliales inician la señalización desde afuera hacia dentro en las células endoteliales que debilitan o interrumpen sus interacciones mediadas por cadherina VE, y permiten el movimiento paracelular de los leucocitos. También pueden estar involucradas fuerzas mecánicas y otros mecanismos.

La adhesión selectiva de los leucocitos al endotelio cerca de los sitios de infección o inflamación depende por tanto de la aparición y activación secuencial de varias CAM sobre las superficies de las células interactuantes. Diferentes tipos de leucocitos expresan distintas integrinas, todas las cuales contienen la subunidad $\beta 2$. No obstante, todos los leucocitos se mueven hacia el interior de los tejidos por el mismo mecanismo general descrito en la Figura 20-39.

Muchas de las CAM usadas para dirigir la adhesión de los leucocitos son compartidas entre diferentes tipos de leucocitos y tejidos diana. Sin embargo, a menudo solo un tipo particular de leucocito se dirige a un tejido particular. ¿Cómo se logra esta especificidad? Se ha propuesto un modelo de tres pasos para explicar la especificidad del tipo de célula de tal interacción entre célula endotelial y leucocito. Primero, la activación endotelial estimula la unión reversible, transitoria, relativamente débil (p. ej., la interacción de selectinas y sus ligandos de hidratos de carbono). Sin la activación local de señales, el leucocito se moverá rápidamente. Segundo, las células en la vecindad inmediata del sitio de infección o inflamación liberan o expresan señales químicas como las quimiocinas y PAF, que activan solo subgrupos especiales de leucocitos adheridos transitoriamente, dependiendo de los tipos de receptores quimiocina que expresan. Tercero, las CAM dependientes de activación adicional (p. ej., las integrinas) emplean sus patrones de unión y llevan a adhesiones fuertes prolongadas. Solo si se establece la combinación adecuada de CAM, patrones de unión y señales de activación junto con la sincronización apropiada en un sitio específico, un leucocito dado se adherirá fuertemente. Tal densidad combinatoria e interacciones cruzadas permiten que un conjunto pequeño de CAM sirva para diversas funciones a través de todo el cuerpo —un buen ejemplo de parsimonia biológica—.

 La falta de adhesión de los leucocitos es causada por un defecto genético en la síntesis de la subunidad $\beta 2$ de la integrina. Las personas con este trastorno son susceptibles a padecer infecciones bacterianas repetidas debido a que sus leucocitos no pueden extravasarse adecuadamente y, por ende, luchar contra la infección dentro de un tejido.

Algunos virus patógenos han desarrollado mecanismos para explotar en su propio beneficio las proteínas de la superficie celular que participan en la respuesta normal a la inflamación. Por ejemplo, muchos de los virus de RNA que causan el resfriado común (rinovirus) se unen a las células y entran a través de las ICAM-1, y los receptores de quimiocinas pueden ser sitios de entrada importantes para el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), la causa del sida. Las integrinas parecen participar en la unión y la internalización de una amplia variedad de virus, incluyendo retrovirus (que causan fiebre y gastroenteritis, en especial en bebés), adenovirus (que causan conjuntivitis, enfermedad respiratoria aguda) y el virus de la fiebre aftosa (causante de fiebre en el ganado y los cerdos). ■

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 20.5

Interacciones adhesivas en células móviles y no móviles

- Muchas células tienen agregados que contienen integrinas (p. ej., adhesiones focales, adhesiones 3D, podosomas) que física y funcionalmente conectan células a la matriz extracelular y facilitan la señalización desde adentro hacia afuera y desde afuera hacia adentro.
- Por medio de la interacción con las integrinas, la estructura tridimensional de la MEC que rodea una célula puede influir profundamente en el comportamiento celular.
- Las integrinas existen en dos conformaciones (curva-inactiva, recta-activa) que difieren en la afinidad por ligandos y en las interacciones con proteínas adaptadoras citosólicas (véase la Fig. 20-37); la alternancia entre estas dos conformaciones permite la regulación de la actividad de la integrina, la cual es importante para controlar la adhesión y el movimiento celulares.
- El distroglucano, un receptor de adhesión, forma un complejo grande con distrofina, otras proteínas adaptadoras y moléculas de señalización (véase la Fig. 20-38). Este complejo conecta el citoesqueleto de actina a la matriz que la rodea y proporciona estabilidad mecánica al músculo. Las mutaciones en diversos componentes de este complejo causan diferentes tipos de distrofia muscular.
- Las moléculas de adhesión a célula neural, que pertenecen a la familia de inmunoglobulinas (Ig), median la adhesión entre célula y célula independiente de Ca^{2+} en los tejidos neurales y otros.
- La interacción combinatoria y secuencial de diversos tipos de CAM (p. ej., selectinas, integrinas e ICAM) es crucial para la adhesión fuerte y específica de distintos tipos de leucocitos a las células endoteliales en respuesta a señales locales inducidas por infección o inflamación (véase la Fig. 20-39).

20.6 Tejidos vegetales

Nos centraremos ahora en el ensamblaje de células vegetales para formar tejidos. En general, la organización estructural global de las plantas es más simple que la de los animales. Por ejemplo, las plantas tienen solo cuatro tipos amplios de células, que en las plantas maduras forman cuatro clases de tejidos: el *tejido dérmico* interactúa con el ambiente, el *tejido vascular* transporta agua y sustancias disueltas como azúcares e iones, el *tejido de sostén* que llena espacios constituye los principales sitios del metabolismo y el tejido esporógeno forma los órganos reproductores. Los tejidos vegetales están organizados en solo cuatro sistemas de órganos principales: los *tallos* tienen funciones de sostén y de transporte, las *raíces* proporcionan anclaje y absorben y almacenan nutrientes, las *hojas* son los sitios de fotosíntesis y las *flores* encierran las estructuras de reproducción. Por lo tanto, a nivel celular, tisular y de los órganos, las plantas suelen ser menos complejas que la mayoría de los animales.

Más aún, a diferencia de los animales, las plantas no reemplazan o reparan las células o tejidos dañados o viejos; ellas simplemente desarrollan órganos nuevos. En efecto, el destino del desarrollo de cualquier célula vegetal dada se basa principalmente en su posición en el organismo en lugar de en su linaje (véase el Cap. 21), mientras que ambos son importantes en los animales. Por ende, tanto en la célula vegetal como en la animal, la comunicación directa con sus vecinas es impor-

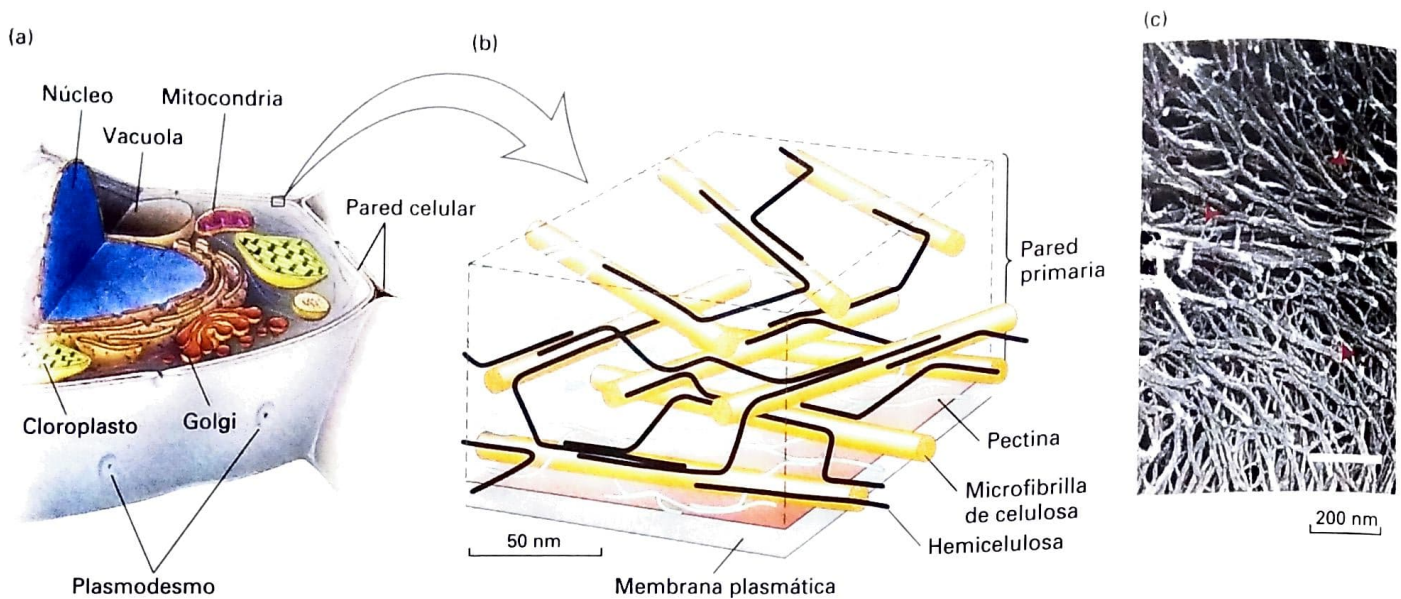


FIGURA 20-40 Estructura de la pared celular. (a) Panorama general de la organización de una célula vegetal típica, en la cual la célula llena de orgánulos con su membrana plasmática está rodeada por una matriz extracelular bien definida denominada pared celular. (b) Representación esquemática de la pared celular de una cebolla. La celulosa y la hemicelulosa están dispuestas en al menos tres capas en una matriz de polímeros de pectina. El tamaño de los polímeros y sus separaciones están dibujados a escala. Para simplificar el diagrama, la mayor parte de los enlaces cruzados de la hemicelulosa y

otros constituyentes de la matriz (p. ej., extensina, lignina) no se muestran. (c) Microfotografía electrónica de grabado profundo, por congelamiento rápido de la pared celular del guisante, en la cual algunos de sus polisacáridos de pectina se eliminaron por tratamiento químico. Las abundantes fibras más gruesas son microfibrillas de celulosa, y las fibras más delgadas son hemicelulosa entrecruzada (puntas de flecha rojas). (Parte [b] adaptado de M. McCann y K. R. Roberts, 1991, in C. Lloyd, ed., *The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form*, Academic Press, P. 126, as modified in C. Somerville y cols. Parte [c] de T. Fujino y T. Itoh, 1998, *Plant Cell Physiol.* **39** 1315-1323.)

tante. Lo principal para este capítulo, y a diferencia de los animales, las pocas células en las plantas contactan directamente unas con otras a través de moléculas incorporadas en sus membranas plasmáticas. En efecto, las células vegetales están rodeadas típicamente por una pared celular rígida que contacta las **paredes celulares** de células adyacentes (Fig. 20-40a). También en contraste con las células animales, una célula vegetal raramente cambia su posición en el organismo en relación con otras células. Estas características de las plantas y su organización han determinado los mecanismos moleculares distintivos por los cuales las células vegetales se comunican unas con otras y forman tejidos.

La pared celular vegetal es un laminado de fibrillas de celulosa en una matriz de glucoproteínas

La matriz extracelular vegetal, o pared celular, que está compuesta principalmente de polisacáridos y es de $\sim 0,2 \mu\text{m}$ de espesor, cubre por completo el exterior de la membrana plasmática de la célula vegetal. Esta estructura cumple algunas de las funciones de la matriz extracelular producida por las células animales, a pesar de que las dos estructuras están compuestas por macromoléculas completamente diferentes y tienen una organización distinta. Alrededor de 1 000 genes en la planta *Arabidopsis*, una planta con flores también llamada “berro” (véanse los Caps. 1 y 6), se dedican a la síntesis y el funcionamiento de su pared celular, incluyendo aproximadamente 414 glucosiltransferasas y más de 316 genes de glucosilhidrolasa. Al igual que la MEC de las células animales, la pared celular vegetal conecta las células para formar tejidos, le indica a la célula que crezca y se divida, y controla la forma de los órganos de la planta. Es una estructura dinámica que cumple funciones importantes en el control de la diferenciación y proporciona una barrera para protegerse contra la infección de patógenos. Al igual que

la matriz extracelular ayuda a definir la forma de las células animales, la pared celular define las formas de las paredes vegetales. Cuando la pared celular se digiere y se separa de las células vegetales mediante enzimas hidrolíticas, quedan las células esféricas encerradas por una membrana plasmática.

Debido a que la función principal de una pared celular vegetal es soportar la presión osmótica de turgencia de la célula (entre 99,97 y 2 999 kilopascales!), la pared celular está construida para fuerzas laterales. Está formada en capas de microfibrillas de **celulosa**, haces de 30-36 cadenas de polímeros largos (de $7 \mu\text{m}$ o más) y lineales extensamente unidos por enlaces de hidrógeno compuestos por glucosas unidas por enlaces β glucosídicos. Las microfibrillas de celulosa están embebidas en una matriz compuesta de **pectina**, un polímero de ácido D-galacturónico y otros monosacáridos, y **hemicelulosa**, un polímero corto, altamente ramificado, de varios monosacáridos de cinco y seis carbonos. La fuerza mecánica de la pared celular depende del entrecruzamiento de las microfibrillas por cadenas de hemicelulosa (Fig. 20-40b, c). Las capas de microfibrillas evitan el estiramiento lateral de la pared celular. Las microfibrillas de celulosa se sintetizan del lado exoplasmático de la membrana plasmática a partir de UDP-glucosa y ADP-glucosa formada en el citosol. La enzima polimerizante, llamada **celulosa sintasa**, se mueve dentro del plano de la membrana plasmática a lo largo de tramos de microtúbulos intracelulares a medida que se forma la celulosa, y proporciona un mecanismo distintivo para la comunicación intracelular/extracelular.

A diferencia de la celulosa, la pectina y la hemicelulosa son sintetizadas en el aparato de Golgi y transportadas a la superficie celular, donde forman una red interconectada que ayuda a unir las paredes de células adyacentes unas con otras y a amortiguarlas. Cuando se purifica, la pectina une agua y forma un gel en presencia de Ca^{2+} e iones boratos

(por ende, el uso de pectinas en muchos alimentos procesados). Tanto como el 15% de la pared celular puede estar compuesto por *extensina*, una glucoproteína que contiene abundante hidroxiprolina y serina. La mayoría de los residuos de hidroxiprolina están unidos a cadenas cortas de arabinosa (un monosacárido de cinco carbonos), y los residuos de serina están unidos a galactosa. Los hidratos de carbono representan alrededor de un 65% del peso de la extensina, y su esqueleto de proteína forma una hélice extendida similar a un bastón con hidroxilos o hidratos de carbono O-ligados que sobresalen hacia afuera. La *ligina* (un polímero insoluble, complejo, de residuos fenólicos) se asocia con la celulosa y es un material que otorga fuerza. Al igual que los proteoglicanos del cartilago, la ligina resiste las fuerzas de compresión sobre la matriz.

La pared celular es un filtro selectivo cuya permeabilidad está controlada en gran medida por las pectinas en la matriz de la pared. Mientras que el agua y los iones se difunden libremente a través de las paredes celulares, la difusión de moléculas grandes, incluyendo proteínas mayores a 20 kDa, es limitada. Esta limitación puede explicar por qué muchas hormonas vegetales son pequeñas moléculas solubles en agua, que pueden difundirse a través de la pared celular e interactuar con los receptores en la membrana plasmática de las células vegetales.

La pérdida de rigidez de la pared celular permite el crecimiento de la célula vegetal

Debido a que la pared celular que rodea una célula vegetal evita que se expanda, la estructura de la pared debe aflojarse cuando crece la célula. La cantidad, el tipo y la dirección de crecimiento de la célula vegetal están regulados por pequeñas moléculas de hormonas llamadas *auxinas*. El debilitamiento inducido por las auxinas de la pared celular permite la expansión de la vacuola intracelular al incorporar agua, y esto lleva a la elongación de la célula. Podemos apreciar la magnitud de este fenómeno al considerar que, si todas las células de un árbol de secuoya fueran reducidas al tamaño típico de los hepatocitos, el árbol tendría una altura máxima de apenas 1 metro.

La pared celular atraviesa su mayor cambio en el **meristemo** de una raíz o en la punta de su brote. Estos sitios son donde las células se dividen y se expanden. Las células meristemáticas jóvenes están conectadas por paredes celulares primarias delgadas, que pueden ablandarse y estirarse para permitir subsiguientes estiramientos. Después de que la elongación celular cesa, la pared celular suele engrosarse, ya sea por secreción de macromoléculas adicionales en la pared celular o, más usualmente, por la formación de una pared celular secundaria compuesta por varias capas. La mayor parte de la célula eventualmente degenera y deja solo la pared celular en los tejidos maduros como el xilema (los tubos que conducen las sales y el agua desde las raíces a través de los tallos hasta las hojas). Las propiedades únicas de la madera y de las fibras vegetales como el algodón se deben a las propiedades moleculares de las paredes celulares en los tejidos de origen.

Los plasmodesmos conectan directamente los citosoles de células adyacentes en las plantas superiores

La presencia de una pared celular que separa las células en las plantas impone barreras a la comunicación entre célula y célula (y por ende,

la diferenciación de tipo de célula) no enfrentada por los animales. Un mecanismo distintivo utilizado por las células vegetales para comunicarse directamente es a través de uniones especializadas entre célula y célula llamadas **plasmodesmos**, que se extienden a través de la pared celular. Al igual que las uniones de hendidura, los plasmodesmos son canales que conectan el citosol de una célula con el de una célula adyacente. El diámetro del canal es de alrededor de 30-60 nm, y su longitud puede variar y ser mayor de 1 μm . La densidad de los plasmodesmos varía dependiendo del tipo de planta y de célula, e incluso las células meristemáticas más pequeñas tienen más de 1 000 interconexiones con sus vecinas. Aunque se han identificado una variedad de proteínas y polisacáridos que están física o funcionalmente asociados con los plasmodesmos, los componentes proteicos estructurales clave de los plasmodesmos y los mecanismos detallados que subyacen a sus biogénesis permanecen sin ser identificados.

Las moléculas más pequeñas de alrededor de 1 000 Da, incluyendo una variedad de componentes metabólicos y de señalización (iones, azúcares, aminoácidos), en general pueden difundirse a través de los plasmodesmos. Sin embargo, el tamaño del canal a través del cual pasan las moléculas es altamente regulado. En algunas circunstancias, el canal está cerrado con fuerza; en otros, está lo suficientemente dilatado para permitir el paso de moléculas más grandes que 10 000 Da. Entre los factores que afectan la permeabilidad de los plasmodesmos, se encuentra la concentración de Ca^{2+} citosólico, cuyo aumento inhibe de manera reversible el movimiento de moléculas a través de estas estructuras.

Aunque los plasmodesmos y las uniones de hendidura se asemejan funcionalmente entre sí con respecto a la formación de canales para la difusión de moléculas pequeñas, sus estructuras difieren dramáticamente en dos formas significativas (Fig. 20-41). En los plasmodesmos, las membranas plasmáticas de las células vegetales adyacentes se fusionan para formar un canal continuo, el *anillo*, mientras que las membranas de las células en una unión de hendidura no son continuas entre sí. Hay un plasmodesmo único (poro único) y plasmodesmos complejos que se ramifican para formar múltiples canales. Además, los plasmodesmos exhiben muchas características funcionales y estructurales complejas. Por ejemplo, contienen dentro del canal una extensión de retículo endoplasmático llamada *desmotúbulo* que pasa a través del anillo y conecta los citosoles de células vegetales adyacentes. También tienen una variedad de proteínas especializadas en la entrada del canal que lo recorren a través de toda la longitud, incluyendo proteínas del citoesqueleto, motoras y de acoplamiento que regulan los tamaños y tipos de moléculas que pueden pasar por el canal. Muchos tipos de moléculas se diseminan de célula a célula a través de los plasmodesmos, incluyendo algunos complejos proteicos, productos metabólicos y virus de plantas. Al parecer, algunos de estos requieren chaperonas especiales para facilitar el transporte. Cinasas especializadas pueden también fosforilar componentes de plasmodesmos para regular sus actividades (p. ej., apertura de canales). Las moléculas solubles pasan a través del anillo citosólico, alrededor de 3-4 nm de diámetro, que se encuentra entre la membrana plasmática y el desmotúbulo, mientras que las moléculas unidas a la membrana o ciertas proteínas dentro del lumen del RE pueden pasar de célula a célula a través del desmotúbulo. Los plasmodesmos parecen cumplir una función importante en la regulación del desarrollo de las células vegetales y de los tejidos, como lo sugiere su capacidad para mediar el movimiento intracelular de los factores de transcripción y los complejos de proteínas ribonucleares.

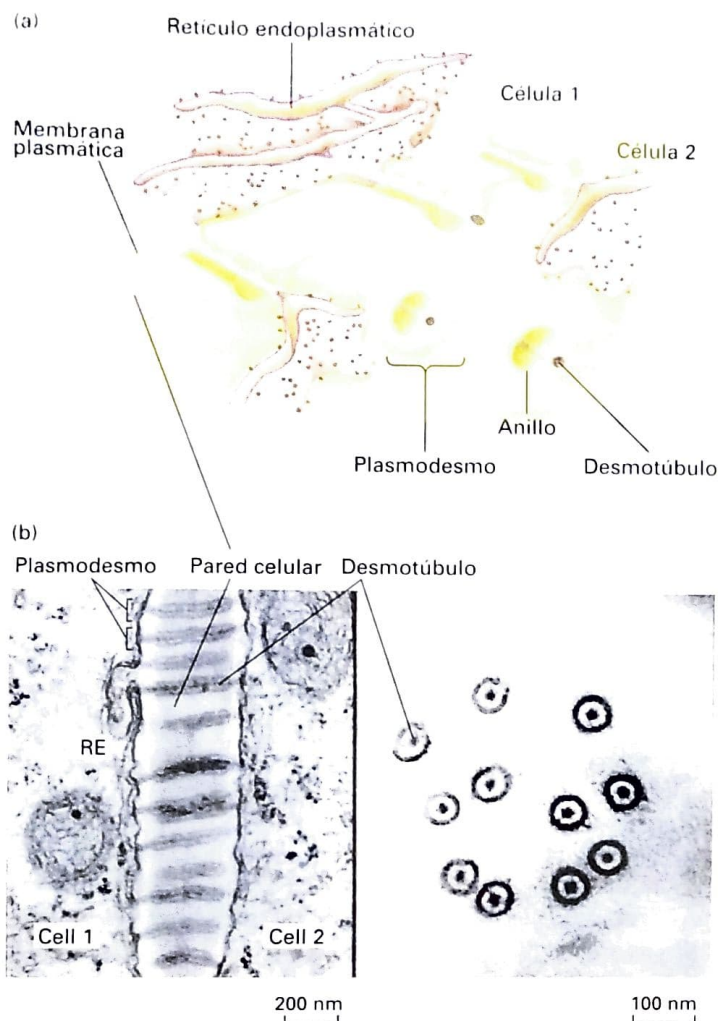


FIGURA 20-41 Plasmodesmos. (a) Modelo esquemático de un plasmodesmo que muestra el desmotúbulo, una extensión del retículo endoplasmático (RE), y el anillo, un canal revestido de membrana plasmática con citosol que interconecta los citosoles de células adyacentes. (b) Microfotografías electrónicas de secciones delgadas de una hoja de caña de azúcar (corchetes indicados por plasmodesmos individuales). (Izquierda) Vista longitudinal que muestra el RE y los desmotúbulos que corren a través de cada anillo. (Derecha) Vistas perpendiculares de secciones transversales de plasmodesmos, en algunos de los cuales se pueden ver las estructuras que conectan la membrana plasmática con el desmotúbulo. (Parte (b) de K. Robinson-Beers y R. F. Evert, 1991, *Planta* **184**:307-318.)

Solo se han identificado unas pocas moléculas adhesivas en las plantas

El análisis sistemático del genoma *Arabidopsis* y el análisis bioquímico de otras especies de plantas no proporcionan evidencia para la existencia de homólogos vegetales de la mayoría de las CAM animales, receptores de adhesión y componentes de la MEC. Este hallazgo no es sorprendente, dada la naturaleza radicalmente distinta de las interacciones entre célula y célula y entre célula y matriz/pared celular en los animales y las plantas.

Entre las proteínas del tipo adhesivas aparentemente únicas en las plantas, se encuentran cinco cinasas asociadas a la pared (*wall-associated kinases*, WAK) y proteínas similares a las WAK expresadas en la membrana plasmática de células de *Arabidopsis*. Las regiones extracelulares en todas estas proteínas contienen múltiples repeticiones del

factor de crecimiento epidérmico (EGF), frecuentemente encontrado en los receptores de la superficie de células animales, que pueden participar de manera directa en la unión a otras moléculas. Se ha demostrado que algunas WAK se unen a proteínas ricas en glicinas en la pared celular, y de esta forma median los contactos entre membrana y pared. Estas proteínas de *Arabidopsis* tienen un dominio transmembrana único y un dominio tirosina-cinasa citosólico que puede participar en las vías de señalización de alguna manera similares al receptor de tirosina-cinasa analizado en el Capítulo 16.

Los resultados de ensayos de unión in vitro combinados con estudios in vivo y análisis de plantas mutantes han permitido identificar diversas macromoléculas en la MEC que son importantes para la adhesión. Por ejemplo, la adhesión normal del polen, que contiene células espermáticas, al estigma o estilo en el órgano reproductor femenino del lirio de Pascua requiere una proteína rica en cisteína llamada adhesina de estigma/estilo rica en cisteína (SCA) y una pectina especializada embebida en la MEC, ~ 10 kDa, llamada quimocianina trabaja en conjunto con la SCA para ayudar a dirigir el movimiento del tubo de polen que contiene espermatozoides (quimiotaxis) hasta el ovario. La interrupción del gen que codifica la glucuroniltransferasa 1, una enzima clave en la biosíntesis de

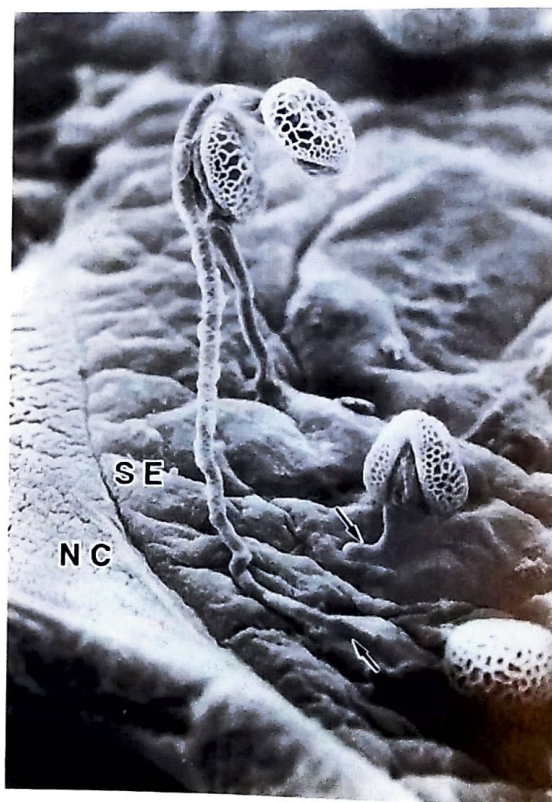


FIGURA EXPERIMENTAL 20-42 Ensayo in vitro para identificar moléculas necesarias para la adhesión de tubos de polen a la matriz estilar. En este ensayo, la matriz estilar extracelular recolectada de los estilos del lirio (SE) o una matriz artificial es secada sobre membranas de nitrocelulosa (NC). Los tubos de polen que contienen espermia luego se añaden y se evalúa su unión a la matriz secada. En esta microfotografía electrónica de barrido, las puntas de los tubos de polen (flechas) se pueden unir a la matriz estilar secada. Este tipo de ensayo ha demostrado que la adhesión del polen depende de la adhesina del estigma/estilo rica en cisteína (SCA) y de una pectina que se une a la SCA. (De G. Y. Jaubert y cols., 1997, *Sex Plant Reprod.* **10**:173.)

la pectina, ha proporcionado una ilustración llamativa de la importancia de las pectinas en la adhesión intracelular en los meristemas de plantas. Normalmente, las moléculas de pectina especializada ayudan a sostener fuertemente a las células en los meristemas. Cuando son cultivadas como un grupo de células relativamente indiferenciadas, llamadas callos, las células meristemáticas normales se adhieren con fuerza y pueden diferenciarse en células productoras de clorofila, lo que da al callo un color verde. Eventualmente, el callo generará brotes. La introducción de un gen de glucuroniltransferasa 1 en las células mutantes restaura su capacidad de adherirse y diferenciarse normalmente.

La escasez de moléculas adhesivas vegetales identificadas hasta el momento, en contraste con las numerosas moléculas adhesivas animales bien definidas, puede deberse a las dificultades técnicas en el trabajo con la MEC/pared celular de las plantas. Es probable que las interacciones adhesivas cumplan diferentes funciones en la biología animal y vegetal debido, al menos en parte, a diferencias en el desarrollo y la fisiología.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 20.6

Tejidos vegetales

- La integración de las células para formar los tejidos en las plantas es fundamentalmente distinto del ensamblaje de los tejidos animales debido sobre todo a que cada célula vegetal está rodeada por una pared celular relativamente rígida.
- La pared celular vegetal comprende capas de microfibrillas de celulosa embebidas dentro de una matriz de hemicelulosa, pectina, extensina y otras moléculas menos abundantes.
- La celulosa, un polímero lineal y largo de glucosa, se ensambla espontáneamente para formar microfibrillas estabilizadas por enlace de hidrógeno.
- La pared celular define la forma de las células vegetales y restringe su elongación. La relajación de la pared celular inducida por la auxina permite la elongación.
- Las células vegetales adyacentes pueden comunicarse a través de plasmodesmos, uniones que permiten a las moléculas pasar a través de canales complejos que conectan los citosoles de células adyacentes (véase la Fig. 20-41).
- Las plantas no producen homólogos de las moléculas adhesivas comunes que se encuentran en los animales. Hasta el momento, solo unas pocas moléculas adhesivas únicas de las plantas han sido bien documentadas.

Perspectivas para el futuro

Un conocimiento más profundo de la integración de las células en tejidos en los organismos complejos se basará en los conocimientos y técnicas de prácticamente todas las subdisciplinas de la biología celular y molecular-bioquímica, biofísica, microscopía, genética, genómica, proteómica y biología del desarrollo (junto con la bioingeniería y las ciencias de la computación). Esta área de la biología celular se encuentra en gran expansión.

Un grupo importante de preguntas para el futuro tiene que ver con los mecanismos por los cuales un grupo de células detecta y responde a fuerzas mecánicas sobre ellas y sobre la matriz extracelular, así como también la influencia de sus disposiciones tridimensionales e interacciones. Una pregunta relacionada es cómo esta información es utilizada para controlar la estructura y función de células y tejidos. Estos temas involucran los campos de la biomecánica y la mecanotransducción. Las tensiones u otro tipo de estrés pueden inducir distintos patrones de expresión génica y crecimiento celular y alterar en gran medida el metabolismo celular y las respuestas al estímulo extracelular. Los canales de cationes mecanosensitivos no selectivos (NSC_{MS}), al menos algunos de los cuales parecen ser miembros del potencial transitorio de receptor, o TRP, la familia de canales catiónicos, son activados por el estiramiento de la membrana plasmática. Son participantes de importancia en la mecanotransducción, como los que están involucrados en censar el sonido en el oído, el cual es mediado, en parte, por cadherinas especializadas. La mayoría de las clases de moléculas analizadas en este capítulo (componentes de la MEC, receptores de adhesión, CAM, adaptadores intracelulares y el citoesqueleto) parecen cumplir funciones cruciales en las vías de señalización mecanosensitivas y de mecanotransducción. Futuras investigaciones nos brindarán una comprensión más sofisticada de las funciones de la organización tridimensional de las células y los componentes de la MEC y las fuerzas que actúan sobre ellos en condiciones normales y en condiciones patológicas en el control de las estructuras y actividades de los tejidos. Las aplicaciones de tal comprensión proporcionarán nuevos métodos para explorar la biología básica de la célula/tejido y tecnologías mejoradas para la investigación de nuevas terapias para enfermedades.

Aunque las uniones ayudan a cumplir un papel clave en la formación de tejidos estables y definen las formas y las propiedades funcionales de los epitelios, no son estáticas. La remodelación en términos de reemplazo de moléculas más viejas con moléculas recién sintetizadas está en marcha, y las propiedades dinámicas de las uniones abren la puerta a cambios más sustanciales cuando es necesario (la transición epitelial-mesenquimática durante el desarrollo, la cicatrización de heridas, la extravasación de leucocitos, etc.). La comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes a la relación entre estabilidad y los cambios dinámicos proporcionarán nuevos conocimientos a la morfogénesis, al mantenimiento de la integridad y la función tisular y la respuesta a (o la inducción de) patologías.

Numerosas cuestiones relacionan la señalización de las CAM y los receptores de adhesión. Tal señalización debe estar integrada con otras vías de señalización celular que son activadas por varias señales externas (p. ej., factores de crecimiento) de manera tal que la célula responda adecuadamente y de manera coordinada a numerosos diferentes estímulos internos y externos de manera simultánea. Parece ser que las pequeñas proteínas GTPasa participan en al menos algunas de las vías integradas asociadas con la señalización entre las uniones celulares. ¿Cómo se construyen los circuitos lógicos para permitir la comunicación entre diversas vías de señalización? ¿De qué manera estos circuitos integran la información de estas vías? ¿Cómo es la combinación de la señalización desde afuera hacia adentro y desde adentro hacia afuera mediada por las CAM y los receptores de adhesión en tales circuitos?

Se puede esperar un progreso cada vez mayor en la exploración de la influencia de la glucobiología (la biología de los oligo- y polisacáridos) en la biología celular. Ahora está clara la importancia de las secuencias GAG especializadas en el control de las actividades celulares, en especial de las interacciones entre algunos factores de crecimiento y

sus receptores. Con la identificación de los mecanismos biosintéticos por los cuales se generan estas estructuras complejas y el desarrollo de herramientas para manipular estructuras de GAG y evaluar sus funciones en sistemas cultivados y en animales intactos, se puede esperar un aumento drástico en nuestra comprensión de la biología celular de las GAG en los siguientes años. Todavía queda mucho por aprender acerca de la biosíntesis, las estructuras y las funciones de muchos otros glucos conjugados, como los azúcares O-ligados sobre los distroglucanos, que son esenciales para su unión a sus ligandos de la MEC. La nueva subespecialización de la *glucómica* ha florecido recientemente y contribuirá a nuestro futuro entendimiento de la glucología. La glucómica, de modo similar a la genómica y la proteómica, utiliza tecnologías punta, como la espectrometría de masa, que permite llevar a cabo análisis a gran escala de las estructuras y los cambios en la amplia variedad de moléculas que contienen azúcar en las células y los tejidos.

Una característica estructural de las CAM, los receptores de adhesión y las proteínas de la MEC es la presencia de múltiples dominios que imparten diversas funciones a una única cadena polipeptídica. En general, se acepta que tales proteínas multidominios surgen evolutivamente por el ensamblado de diferentes secuencias de DNA que codifican los distintos dominios. Los genes que codifican múltiples dominios proporcionan oportunidades para generar secuencias enormes y diversidad funcional mediante el corte y empalme alternativo y el uso de promotores alternativos dentro de un gen. Así, a pesar de que el número de genes independientes en el genoma humano parece ser sorprendentemente pequeño en comparación con otros organismos, se pueden producir muchas más proteínas diferentes que las pronosticadas a partir del número de genes. Tal diversidad parece ser muy adecuada a la generación de proteínas que intervienen en la especificación de conexiones adhesivas en el sistema nervioso, en especial en el cerebro. En efecto, diversos grupos de proteínas expresadas por las neuronas parecen tener dicha diversidad combinatoria en la estructura. Ellas incluyen las protocadherinas, una familia de cadherinas con muchas proteínas codificadas por gen (14-19 para los tres genes en los mamíferos); las neurexinas, que abarcan más de 1 000 proteínas codificadas por tres genes; y las Dscams, miembros de la superfamilia de las IgCAM codificadas por un gen de *Drosophila* que tiene el potencial de expresar 38 016 proteínas diferentes debido al corte y empalme alternativo. Un objetivo continuo para trabajo futuro será describir y comprender las bases moleculares de las adhesiones entre célula y célula y entre célula y matriz —el “cableado”— en el sistema nervioso y cómo este cableado permite en última instancia el control neuronal complejo y, a su vez, el intelecto requerido para entender la biología celular y molecular.

Palabras clave

proteínas adaptadoras 928
uniones de adherencia 934
receptores de adhesión 927
uniones de anclaje 934
lámina basal 933
cadherina 935
moléculas de adhesión
celular (CAM) 927
pared celular 968
colágeno 946
conexina 943

desmosoma 935
elastina 951
transición epitelial-
mesenquimática 938
epitelios 926
matriz extracelular (MEC) 927
colágeno fibrilar 951
fibronectina 957
uniones de hendidura 934
glucosaminoglucano (GAG) 951
hialuronano 956

moléculas de adhesión celular con
dominios de inmunoglobulina
(IgCAM) 965
integrina 939
laminina 947
metaloproteasas de la
matriz (MMP) 960
proteínas multiadhesivas
de la matriz 946

via paracelular 942
plasmodesmos 969
proteoglucanos 946
secuencia RGD 939
selectina 965
sindecano 956
unión estrecha 934

Revisión de los conceptos

1. Describa dos fenómenos que den origen a la diversidad de moléculas de adhesión como las cadherinas. ¿Qué fenómenos adicionales dan origen a la diversidad de las integrinas?
2. Se conoce que las cadherinas median las interacciones homófilas entre las células. ¿Qué es una interacción homófila y cómo puede demostrarse experimentalmente para las cadherinas E? ¿Qué componente de la matriz extracelular es necesario para las interacciones homófilas mediadas por las cadherinas, y cómo puede demostrarse este requerimiento?
3. Junto con su papel en la conexión de las membranas laterales de células epiteliales adyacentes, las uniones de adherencia cumplen una función en el control de la forma celular. ¿Qué estructura intracelular asociada y qué proteínas están involucradas en esta función?
4. ¿Cuál es la función normal de las uniones estrechas? ¿Qué puede sucederle a los tejidos cuando las uniones estrechas no funcionan adecuadamente?
5. Las uniones de hendidura entre las células del músculo cardíaco y entre las células del músculo liso miometral uterino forman una conexión que proporciona una comunicación rápida. ¿Cómo se llama esta conexión? ¿Cómo se regula positivamente la comunicación de las uniones de hendidura de las células del músculo liso miometral uterino para el momento del parto?
6. ¿Qué es el colágeno y cómo se sintetiza? ¿Cómo sabemos que el colágeno es necesario para la integridad tisular?
7. Explique cómo los cambios en la estructura de la integrina median la señalización desde adentro hacia afuera.
8. Compare las funciones y propiedades de cada uno de los tres tipos de macromoléculas que son abundantes en la matriz extracelular de todos los tejidos.
9. Muchos proteoglucanos tienen funciones de señalización celular. La regulación del comportamiento alimentario por los sindecanos en la región hipotalámica del cerebro es un ejemplo. ¿Cómo se logra esta regulación?
10. Usted ha sintetizado un oligopéptido que contiene una secuencia RGD rodeada por otros aminoácidos. ¿Cuál es el efecto de este péptido cuando se lo añade a un cultivo de células de fibroblasto crecido sobre una capa de fibronectinas absorbidas a la placa de cultivo tisular? ¿Por qué sucede esto?
11. Describa la principal actividad y la posible localización de los tres principales subgrupos de proteínas que remodelan/degradan la MEC en la remodelación tisular fisiológica o patológica. Identifique un trastorno patológico en el cual estas proteínas cumplan una función clave.

12. La coagulación de la sangre es una función crucial para la supervivencia de los animales. ¿De qué manera las propiedades multiadhesivas de la fibronectina llevan al reclutamiento de plaquetas en los coágulos sanguíneos?

13. ¿Cómo los cambios en las conexiones moleculares entre la matriz extracelular y el citoesqueleto dan origen a la distrofia muscular de Duchenne?

14. Para combatir una infección, los leucocitos se mueven rápidamente desde la sangre hacia el interior de los tejidos en los sitios de infección. ¿Cómo se denomina este proceso? ¿Cómo están involucradas las moléculas de adhesión en este proceso?

15. La estructura de una pared celular vegetal necesita aflojarse para acomodarse al crecimiento celular. ¿Qué moléculas de señalización controlan este proceso?

16. Compare los plasmodesmos en las células vegetales con las uniones de hendidura en las células animales.

Análisis de los datos

Los investigadores han aislado dos isoformas mutantes de cadherina E que hipotéticamente funcionan de manera distinta de las isoformas

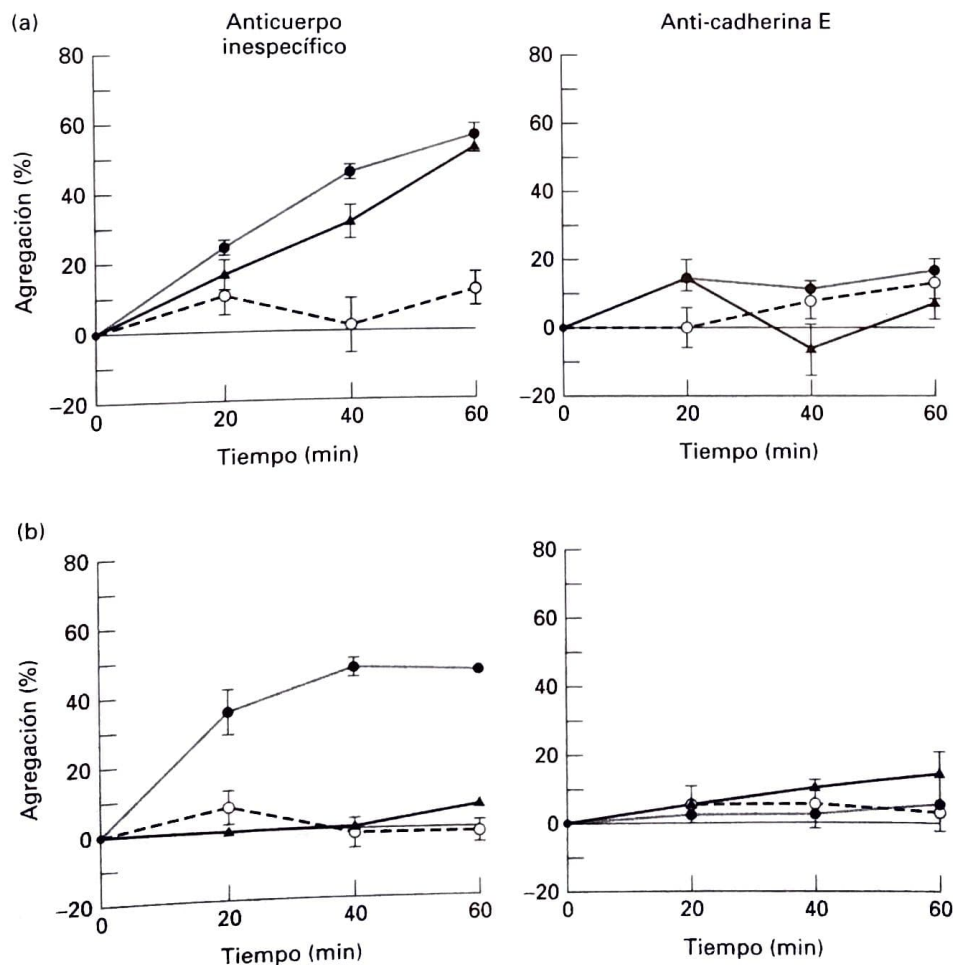
en la cadherina de tipo silvestre. Una línea celular de carcinoma mamario negativo de cadherina E fue transfectada con los genes A (parte a en la figura; triángulos), o B (parte b; triángulos) mutantes de cadherina E o el gen de cadherina E de tipo silvestre (círculos negros) y se la comparó con células sin transfectar (círculos abiertos) en un ensayo de agregación. En este ensayo, primero las células se disociaron mediante tratamiento con tripsina y luego se les permitió agregarse en solución durante un período de minutos. Las células en agregación de los mutantes A y B se presentan en los paneles a y b respectivamente. Para demostrar que la adhesión observada era mediada por cadherina, las células se pretrataron con un anticuerpo no específico (panel de la izquierda) o un anticuerpo anti-cadherina E que bloquea la función (panel de la derecha).

a. ¿Por qué las células transfectadas con el gen de cadherina E de tipo silvestre tienen mayor agregación que las células control, no transfectadas?

b. A partir de estos datos, ¿qué puede decirse acerca de la función de los mutantes A y B?

c. ¿Por qué la adición del anticuerpo monoclonal anti-cadherina E, pero no la de anticuerpo inespecífico, bloquea la agregación?

d. ¿Qué le sucedería a la capacidad de agregación de las células transfectadas con el gen de cadherina E de tipo silvestre si el ensayo fuese llevado a cabo en un medio bajo en Ca^{2+} ?



Referencias

Adhesión entre células y entre célula y matriz: panorama general

- Carthew, R. W. 2005. Adhesion proteins and the control of cell shape. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **15**(4):358-363.
- M. Cerejido, R. G. Contreras, and L. Shoshani. 2004. Cell adhesion, polarity, and epithelia in the dawn of metazoans. *Physiol. Rev.* **84**:1229-1262.
- Gumbiner, B. M. 1996. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* **84**:345-357.
- Hynes, R. O. 1999. Cell adhesion: old and new questions. *Trends Cell Biol.* **9**(12):M33-M337. Millennium issue.
- Hynes, R. O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**:673-687.
- Hynes, R. O. 2012. The evolution of metazoan extracellular matrix. *J. Cell Biol.* (in press)
- Hynes, R. O., and Q. Zhao. 2000. The evolution of cell adhesion. *J. Cell Biol.* **150**(2):F89-F96.
- Ingber, D. E. 2006. Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. *FASEB J.* **20**(7):811-827.
- Jamora, C., and E. Fuchs. 2002. Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. *Nature Cell Biol.* **4**(4):E101-E108.
- Juliano, R. L. 2002. Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, Cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **42**:283-323.
- Leahy, D. J. 1997. Implications of atomic resolution structures for cell adhesion. *Ann. Rev. Cell Devel. Biol.* **13**:363-393.
- Thiery, J. P., and J. P. Sleeman. 2006. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**:131-142.
- Vogel, V. 2006. Mechanotransduction involving multimodular proteins: converting force into biochemical signals. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **35**:459-488.
- Vogel, V., and M. Sheetz. 2006. Local force and geometry sensing regulate cell functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**(4):265-275.
- Uniones entre células y entre célula y ECM y sus moléculas de adhesión**
- The Cadherin Resource: http://calcium.uhnres.utoronto.ca/cadherin/pub_pages/classify/index.htm
- Anderson, J. M., and C. M. Van Itallie. 2009. Physiology and function of the tight junction. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**(2):a002584.
- Chen, C. S. 2008. Mechanotransduction—a field pulling together? *J. Cell Sci.* **121**(pt. 20):3285-3292.
- Chu, Y. S., et al. 2004. Force measurements in E-cadherin-mediated cell doublets reveal rapid adhesion strengthened by actin cytoskeleton remodeling through Rae and Cdc42. *J. Cell Biol.* **167**:1183-1194.
- Ciatto, C., et al. 2010. T-cadherin structures reveal a novel adhesive binding mechanism. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**(3):339-347.
- Clandinin, T. R., and S. L. Zipursky. 2002. Making connections in the fly visual system. *Neuron* **35**:827-841.
- Conacci-Sorrell, M., J. Zhurinsky, and A. Ben-Ze'ev. 2002. The cadherin-catenin adhesion system in signaling and cancer. *J. Clin. Invest.* **109**:987-991.
- Fuchs, E., and S. Raghavan. 2002. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nature Rev. Genet.* **3**(3):199-209.
- Gates, J., and M. Peifer. 2005. Can 1000 reviews be wrong? Actin, alpha-catenin, and adherens junctions. *Cell* **123**(5):769-772.
- Goodenough, D. A., and D. L. Paul. 2009. Gap junctions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**:a002576.
- Gumbiner, B. M. 2005. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**:622-634.
- Guttman, J. A., and B. B. Finlay. 2009. Tight junctions as targets of infectious agents. *Biochim. Biophys. Acta* **1788**(4):832-841.
- Harris, T. J., and U. Tepass. 2010. Adherens junctions: from molecules to morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**(7): 502-514.
- Hatzfeld, M. 2007. Plakophilins: multifunctional proteins or just regulators of desmosomal adhesion? *Biochim. Biophys. Acta* **1773**:69-77.
- Hobbie, L., et al. 1987. Restoration of LDL receptor activity in mutant cells by intercellular junctional communication. *Science* **235**:69-73.
- Hollande, F., A. Shulkes, and G. S. Baldwin. 2005. Signaling the junctions in gut epithelium. *Science* **205**(277):pe13.
- Hunter, A. W., R. J. Barker, C. Zhu, and R. G. Gourdie. 2005. Zonula occludens-1 alters connexin43 gap junction size and organization by influencing channel accretion. *Mol. Biol. Cell* **16**(12):5686-5698.
- Jefferson, J. J., C. L. Leung, and R. K. H. Liem. 2004. Plakins: goliaths that link cell junctions and the cytoskeleton. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **5**:542-553.
- Laird, D. W. 2006. Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem. J.* **394**(pt. 3):527-543.
- Lee, J. M., S. Dedhar, R. Kalluri, and E. W. Thompson. 2006. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J. Cell Biol.* **172**(7):973-981.
- Litjens, S. H., J. M. de Pereda, and A. Sonnenberg. 2006. Current insights into the formation and breakdown of hemidesmosomes. *Trends Cell Biol.* **16**(7):376-383.
- Moser, M., K. R. Legate, R. Zent, and R. Fassler. 2009. The tail of integrins, talin, and kindlins. *Science* **324**(5929):895-899.
- Müller, U. 2008. Cadherins and mechanotransduction by hair cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* **20**(5):557-566.
- Nakagawa, S., S. Maeda, and T. Tsukihara. 2011. Structural and functional studies of gap junction channels. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **21**(1):101-108.
- Oda, H., and M. Takeichi. 2011. Structural and functional diversity of Cadherin at the adherens junction. *J. Cell Biol.* **193**(7):1137-1146.
- Pierschbacher, M. D., and E. Ruoslahti. 1984. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* **309**(5963):30-33.
- Schock, F., and N. Perrimon. 2002. Molecular mechanisms of epithelial morphogenesis. *Ann. Rev. Cell Devel. Biol.* **18**:463-493.
- Smutny, M., and A. S. Yap. 2010. Neighborly relations: Cadherins and mechanotransduction. *J. Cell Biol.* **189**(7): 1075-1077.
- Tanoue, T., and M. Takeichi. 2005. New insights into fat Cadherins. *J. Cell Sci.* **118**(pt. 11):2347-2353.
- Tsukita, S., M. Furuse, and M. Itoh. 2001. Multifunctional strands in tight junctions. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **2**:285-293.
- Turner, J. R. 2009. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **9**(11):799-809.
- Vogelmann, R., M. R. Amieva, S. Falkow, and W. J. Nelson. 2004. Breaking into the epithelial apical-junctional complex—news from pathogen hackers. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**(1):86-93.
- Ye, F., et al. 2010. Recreation of the terminal events in physiological integrin activation. *J. Cell Biol.* **188**(1):157-173.
- Zaidel-Bar, R., and B. Geiger. 2010. The switchable integrin adhesome. *J. Cell Sci.* **123**(pt. 9):1385-1388.
- Zhang, Y., S. Sivasankar, W. J. Nelson, and S. Chu. 2009. Resolving Cadherin interactions and binding cooperativity at the single-molecule level. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**(1): 109-114.

La matriz extracelular I: la lámina basal

- Boutaud, A., et al. 2000. Type IV collagen of the glomerular basement membrane: evidence that the chain specificity of network assembly is encoded by the noncollagenous NCI domains. *J. Biol. Chem.* **275**:30716-30724.
- Durbeej, M. 2010. Laminins. *Cell Tissue Res.* **339**(1):259-268.
- Esko, J. D., and U. Lindahl. 2001. Molecular diversity of heparan sulfate. *J. Clin. Invest.* **108**:169-173.
- Hallmann, R., et al. 2005. Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol. Rev.* **85**:979-1000.
- Hohenester, E., and J. Engel. 2002. Domain structure and organisation in extracellular matrix proteins. *Matrix Biol.* **21**(2):115-128.
- Iozzo, R. V. 2005. Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **6**(8):646-656.
- Kanagawa, M., et al. 2005. Disruption of perlecan binding and matrix assembly by post-translational or genetic disruption of dystroglycan function. *FEBS Lett.* **579**(21):4792-4796.
- Kruegel, J., and N. Miosge. 2010. Basement membrane components are key players in specialized extracellular matrices. *Cell Mol. Life Sci.* **67**(17):2879-2895.
- Nakato, H., and K. Kimata. 2002. Heparan sulfate fine structure and specificity of proteoglycan functions. *Biochim. Biophys. Acta* **1573**:312-318.
- Perrimon, N., and M. Bernfield. 2001. Cellular functions of proteoglycans: an overview. *Semin. Cell Devel. Biol.* **12**(2):65-67.
- Rosenberg, R. D., et al. 1997. Heparan sulfate proteoglycans of the cardiovascular system: specific structures emerge but how is synthesis regulated? *J. Clin. Invest.* **99**:2062-2070.
- Sasaki, T., R. Fassler, and E. Hohenester. 2004. Laminin: the crux of basement membrane assembly. *J. Cell Biol.* **164**(7):959-963.

La matriz extracelular II: tejido conectivo

- Canty, E. G., and K. E. Kadler. 2005. Procollagen trafficking, processing and fibrillogenesis. *J. Cell Sci.* **118**:1341-1353.
- Comelli, E. M., et al. 2006. A focused microarray approach to functional glycomics: transcriptional regulation of the glycome. *Glycobiology* **16**(2):117-131.
- Couchman, J. R. 2003. Syndecans: proteoglycan regulators of cell-surface microdomains? *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **4**:926-938.
- Fields, G. B. 2010. Synthesis and biological applications of collagen-model triple-helical peptides. *Org. Biomol. Chem.* **8**(6):1237-1258.
- Kramer, R. Z., J. Bella, B. Brodsky, and H. M. Berman. 2001. The crystal and molecular structure of a collagen-like peptide with a biologically relevant sequence. *J. Mol. Biol.* **311**:131-147.
- Leitinger, B., and E. Hohenester. 2007. Mammalian collagen receptors. *Matrix Biol.* **26**(3):146-155.
- Mao, J. R., and J. Bristow. 2001. The Ehlers-Danlos syndrome: on beyond collagens. *J. Clin. Invest.* **107**:1063-1069.
- Orgel, J. P., T. C. Irving, A. Miller, and T. J. Wess. 2006. Microfibrillar structure of type I collagen in situ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**:9001-9005.
- Sakai, T., M. Larsen, and K. Yamada. 2003. Fibronectin requirement in branching morphogenesis. *Nature* **423**:876-881.
- Shaw, L. M., and B. R. Olsen. 1991. FACIT collagens: diverse molecular bridges in extracellular matrices. *Trends Biochem. Sci.* **16**(5):191-194.
- Shiomi, T., V. Lemaitre, J. D'Armiento, and Y. Okada. 2010. Matrix metalloproteinases, a disintegrin and metalloproteinases, and a disintegrin and metalloproteinases with thrombospondin motifs in non-neoplastic diseases. *Pathol. Int.* **60**(7):477-496.
- Weiner, S., W. Traub, and H. D. Wagner. 1999. Lamellar bone: structure-function relations. *J. Struct. Biol.* **126**:241-255.

Interacciones adhesivas en células móviles y no móviles

- Barresi, R., and K. P. Campbell. 2006. Dystroglycan: from biosynthesis to pathogenesis of human disease. *J. Cell Sci.* **119**(pt. 2):199-207.
- Bartsch, U. 2003. Neural CAMs and their role in the development and organization of myelin sheaths. *Front. Biosci.* **8**:D477-D490.
- Brummendorf, T., and V. Lemmon. 2001. Immunoglobulin superfamily receptors: cis-interactions, intracellular adapters and alternative splicing regulate adhesion. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**:611-618.
- Cukierman, E., R. Pankov, and K. M. Yamada. 2002. Cell interactions with three-dimensional matrices. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**:633-639.
- Even-Ram, S., and K. M. Yamada. 2005. Cell migration in 3D matrix. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**(5):524-532.
- Geiger, B., A. Bershadsky, R. Pankov, and K. M. Yamada. 2001. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**:793-805.
- Griffith, L. G., and M. A. Swartz. 2006. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**(3):211-224.
- Lawrence, M. B., and T. A. Springer. 1991. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* **65**:859-873.
- Nelson, C. M., and M. J. Bissell. 2005. Modeling dynamic reciprocity: engineering three-dimensional culture models of breast architecture, function, and neoplastic transformation. *Sem. Cancer Biol.* **15**(5):342-352.
- Reizes, O., et al. 2001. Transgenic expression of syndecan-1 uncovers a physiological control of feeding behavior by syndecan-3. *Cell* **106**:105-116.
- Rougon, G., and O. Hobert. 2003. New insights into the diversity and function of neuronal immunoglobulin superfamily molecules. *Annu. Rev. Neurosci.* **26**:207-238.
- Shimaoka, M., J. Takagi, and T. A. Springer. 2002. Conformational regulation of integrin structure and function. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **31**:485-516.
- Somers, W. S., J. Tang, G. D. Shaw, and R. T. Camphausen. 2000. Insights into the molecular basis of leukocyte tethering and rolling revealed by structures of P- and E-selectin bound to SLe(X) and PSGL-1. *Cell* **103**:467-479.
- Stein, E., and M. Tessier-Lavigne. 2001. Hierarchical organization of guidance receptors: silencing of netrin attraction by Slit through a Robo/DCC receptor complex. *Science* **291**:1928-1938.
- Xiong, J. P., et al. 2001. Crystal structure of the extracellular segment of integrin α V β 3. *Science* **294**:339-345.

Tejidos vegetales

- Bacic, A. 2006. Breaking an impasse in pectin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**(15):5639-5640.
- Delmer, D. P., and C. H. Haigler. 2002. The regulation of metabolic flux to cellulose, a major sink for carbon in plants. *Metab. Eng.* **4**:22-28.
- Iwai, H., N. Masaoka, T. Ishii, and S. Satoh. 2000. A pectin glucuronyltransferase gene is essential for intercellular attachment in the plant meristem. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:16319-16324.
- Kim, S., J. Dong, and E. M. Lord. 2004. Pollen tube guidance: the role of adhesion and chemotropic molecules. *Curr. Top. Dev. Biol.* **61**:61-79.
- Lee, D. K., and L. E. Sieburth. 2010. Plasmodesmata formation: poking holes in walls with ice. *Curr. Biol.* **20**(11):R488-R490.
- Lord, E. M., and J. C. Mollet. 2002. Plant cell adhesion: a bioassay facilitates discovery of the first pectin biosynthetic gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:15843-15845.
- Lord, E. M., and S. D. Russell. 2002. The mechanisms of pollination and fertilization in plants. *Ann. Rev. Cell Devel. Biol.* **18**:81-105.

Lough, T. J., and W. J. Lucas. 2006. Integrative plant biology: role of phloem long-distance macromolecular trafficking. *Annu. Rev. Plant Biol.* **57**:203-232.

Lucas, W. J., B. K. Ham, and J. Y. Kim. 2009. Plasmodesmata—bridging the gap between neighboring plant cells. *Trends Cell Biol.* **19**(10):495-503.

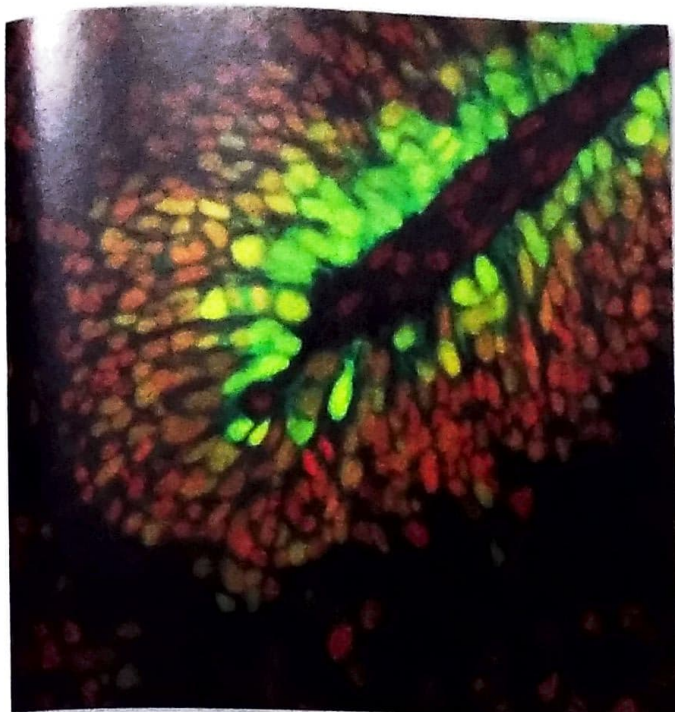
Pennell, R. 1998. Cell walls: structures and signals. *Curr. Opin. Plant Biol.* **1**:504-510.

Roberts, A. G., and K. J. Oparka. 2003. Plasmodesmata and the control of symplastic transport. *Plant Cell Environ.* **26**:103-124.

Somerville, C., et al. 2004. Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science* **306**(5705):2206-2211.

Whetten, R.W., J. J. MacKay, and R. R. Sederoff. 1998. Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**:585-609.

Zambryski, P., and K. Crawford. 2000. Plasmodesmata: gatekeepers for cell-to-cell transport of developmental signals in plants. *Ann. Rev. Cell Devel. Biol.* **16**:393-421.



Células nacientes en el cerebelo en desarrollo. Todos los núcleos están marcados en rojo; las células verdes se están dividiendo y migrando hacia las capas internas del tejido neural (Cortesía de Tal Razeh, Matthew Scott y Jane Johnson.)

Células madre, asimetría celular y muerte celular

Muchas descripciones de la división celular implican que la célula progenitora da lugar a dos células hijas que se asemejan y se comportan exactamente igual a aquella. En otras palabras, ellas implican que la división celular es **simétrica** y la progenie tiene propiedades similares a la célula progenitora. Pero si este fuera siempre el caso, ninguno de los cientos de tipos celulares diferenciados y tejidos funcionantes en los organismos multicelulares complejos podría formarse. Las diferencias entre las células pueden surgir cuando dos células hijas inicialmente idénticas divergen al recibir distintas señales ambientales y de desarrollo. Alternativamente, las dos células hijas pueden diferir de su “nacimiento”, con partes distintas de herencia de la célula progenitora (Fig. 21-1). Las células hijas producidas por tal división celular asimétrica puede diferir en tamaño, forma y composición de proteínas, o sus genes pueden estar en distintos estados de actividad o potencial actividad. Las diferencias en estas señales internas confieren diversos destinos en las dos células.

Durante el desarrollo temprano de los metazoos, se producen ejemplos notables de división celular asimétrica, que se analizarán en la primera sección de este capítulo. El desarrollo de un organismo nuevo comienza con el huevo, u **ovocito**, que contiene un conjunto de cromosomas de la madre, y el **espermatozoide**, que contiene un con-

junto de cromosomas del padre. Estos **gametos**, o células sexuales, son haploides debido a que ya han atravesado la meiosis (véase el Cap. 19). En un proceso llamado fecundación, se combinan para crear la célula única inicial, el cigoto, que tiene dos grupos de cromosomas y, por lo tanto, es diploide. Durante la embriogénesis, el cigoto sufre numerosas divisiones celulares, tanto simétricas como asimétricas, que en última instancia darán lugar a un organismo completo.

Tales células no especializadas, que pueden reproducirse a sí mismas como también generar tipos específicos de más células especializadas, se denominan **células madres**. Su nombre proviene de la imagen de un tallo vegetal que crece hacia arriba, y continua para formar más tallos, que también dan origen a las hojas y las ramas laterales. En este capítulo describiremos varios tipos de células madre que difieren en la variedad de tipos celulares especializados que pueden formar. El cigoto es la célula madre *totipotente* final debido a que tiene la capacidad de generar cada tipo celular en el cuerpo, como así también las células placentarias de sostén que son necesarias para el desarrollo embrionario.

Como se verá más adelante en el capítulo, muchas de las primeras divisiones del nematodo *C. elegans* son asimétricas, y cada célula hija da lugar a un grupo discreto de tipos celulares diferenciados. Por el contrario, el embrión murino pasa a través de un estadio de 8 células

CONTENIDO

21.1	Desarrollo temprano en metazoos y células madre embrionarias	979
21.2	Células madre y nichos en organismos multicelulares	986

21.3	Mecanismos de polaridad celular y división celular asimétrica	997
21.4	Muerte celular y su regulación	1006

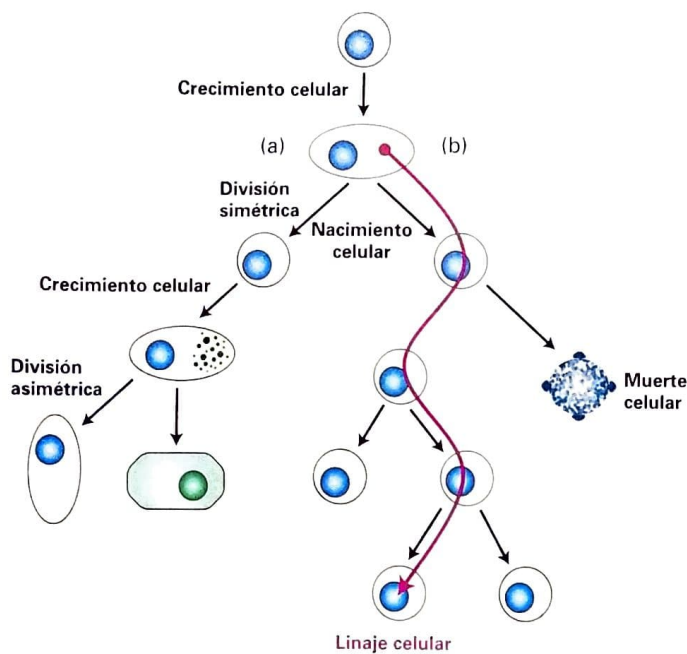


FIGURA 21-1 Esquema general del nacimiento, linaje y muerte de las células. Siguiendo el crecimiento, las células “nacen” como resultado de la división celular asimétrica. (a) Las dos células hijas resultantes de la división simétrica son esencialmente idénticas entre sí y a la célula progenitora. Luego, tales células hijas pueden tener distintos destinos si son expuestas a diferentes señales. Las dos células hijas resultantes de la división asimétrica difieren desde el nacimiento y, en consecuencia, tienen diferentes destinos. La división asimétrica comúnmente es precedida por la localización de moléculas reguladoras (puntos verdes) en una parte de la célula progenitora. (b) Una serie de divisiones celulares simétricas o asimétricas, llamadas un linaje celular, da lugar al nacimiento de los tipos celulares especializados encontrados en un organismo multicelular. El patrón del linaje celular puede estar bajo un fuerte control genético. La muerte celular programada se produce durante el desarrollo normal (p. ej., en la membrana interdigital que se desarrolla inicialmente cuando crecen los dedos) y también en respuesta a las infecciones o las toxinas. Una serie de acontecimientos programados específicos, llamados apoptosis, se activa en estas situaciones.

en el cual cada célula puede formar aún cada tejido (tanto embrionario como no embrionario); es decir, las ocho células son totipotentes. En la etapa de 16 células, esto ya no se cumple; algunas de las células ya se han comprometido a vías de diferenciación particulares. Un grupo de células denominado masa celular interna (MCI) dará origen en última instancia a todos los tejidos del embrión propiamente dicho, y otro grupo de células formará el tejido placentario. Como en la masa celular interna, las células que pueden generar todos los tejidos embrionarios pero no los extraembrionarios se denominan *pluripotentes*. Las células de la MCI pueden cultivarse en un medio definido y formar **células madres embrionarias (ES)**. Las células ES pueden cultivarse indefinidamente, y cada célula nueva permanece pluripotente y da lugar a todos los tejidos de un animal. Analizamos el uso de las células ES al descubrir la red transcripcional de expresión génica que subyace a la pluripotencialidad y también al uso de estas células en la formación de tipos específicos de células diferenciadas en cultivos para propósitos de investigación o, potencialmente, como “partes de reemplazo” para células enfermas o desgastadas en pacientes.

Durante muchos años, se pensó que la diferenciación animal era unidireccional, pero información muy reciente revela que la diferenciación puede revertirse experimentalmente; las células diferenciadas, especializadas, se pueden inducir para regresar hasta un estado indiferenciado. Estrictamente hablando, la introducción de solo un pequeño número de factores que controlan la pluripotencialidad de las células ES a tipos múltiples de células somáticas puede convertir, en condiciones definidas, al menos algunas de estas células somáticas a **células madre pluripotentes inducidas (iPS)**, que tienen propiedades aparentemente indistinguibles de las células madre embrionarias. Como se verá en la Sección 21.1, las células iPS son de suma utilidad en biología experimental y en medicina.

La formación de tejidos y órganos de trabajo durante el desarrollo de los organismos multicelulares depende en parte de los patrones específicos de división celular mitótica. Una serie de tales divisiones que se parece a un árbol genealógico se denomina *linaje celular*. Un linaje celular traza el orden de nacimiento de las células a medida que progresivamente se tornan más restringidas en sus potenciales de desarrollo y se *diferencian* en tipos celulares especializados como las células de la piel, las neuronas, o las células musculares (véase la Fig. 21-1).

Diversos tipos de células tienen tiempos de vida que son mucho menores al del organismo como un todo y, por ende, necesitan ser reemplazadas constantemente. Por ejemplo en los mamíferos, las células que recubren el intestino y las células de macrófagos viven solo unos pocos días. Por lo tanto, las células madre son importantes tanto durante el desarrollo como para el reemplazo de las células desgastadas en los adultos. A diferencia de las células ES, las células madre en el organismo adulto son células madre *multipotentes*: pueden dar origen a algunos tipos de células diferenciadas que se encuentran en el organismo pero no todas las formas de ellas. En la segunda sección de este capítulo analizaremos varios ejemplos de las células madre multipotentes, incluyendo aquellas que dan origen a las células germinales, a las células intestinales y a la variedad de tipos celulares que se encuentran en la sangre.

Ya hemos mencionado que la diversidad de células en un animal requiere la división celular asimétrica, donde las dos células hijas difieren en el destino. Este proceso requiere que la célula madre se torne asimétrica, o **polarizada**, antes de la división celular, de manera tal que el contenido de la célula se distribuya de manera desigual entre las dos hijas. Este proceso de polarización no solo es crucial durante el desarrollo, sino que también lo es para la función de prácticamente todas las células. Por ejemplo, el transporte de células epiteliales, como las que recubren el intestino, está polarizado con las superficies apicales de las células libres de cara hacia el lumen para absorber los nutrientes y sus superficies basolaterales en contacto con la matriz extracelular para transportar los nutrientes hacia la sangre (véanse las Figs. 11-30 y 20-1). Otros ejemplos incluyen las células que migran hacia un gradiente quimiotáctico (véase la Fig. 18-51) y las neuronas, con múltiples dendritas que se extienden desde un lado del cuerpo celular que recibe las señales y un único axón que se extiende desde el otro lado que transmite las señales hasta las células diana (véase el Cap. 22). Así, los mecanismos que utilizan las células para polarizarse son aspectos importantes y generales de sus funciones. No es sorprendente que estos mecanismos integren elementos de las vías de señalización celular (véanse los Caps. 15 y 16), la reorganización del citoesqueleto (véanse los Caps. 17 y 18) y el tráfico de membrana (véase el Cap. 14). En la tercera sección de este capítulo analizamos cómo las células se polarizan y cómo la división celular asimétrica es crucial para el mantenimiento de las células madre y sus funciones en la generación de células diferenciadas.

En general se piensa el destino celular en términos de los tipos celulares diferenciados que se forman. Un destino celular bastante diferente, la **muerte celular programada**, también es de suma importancia en la formación y el mantenimiento de muchos tejidos. Un sistema genético regulador preciso, con puntos de control y de equilibrio, controla la muerte celular así como otros programas genéticos controlan la división celular y la diferenciación. En la última sección de este capítulo, consideramos el mecanismo de muerte celular y su regulación.

Estos aspectos de la biología celular (nacimiento de la célula, establecimiento de la polaridad celular y la muerte celular programada) convergen con la biología del desarrollo y se encuentran entre los procesos más importantes respecto de la regulación por parte de vías de señalización analizadas en capítulos anteriores.

21.1 Desarrollo temprano en metazoos y células madre embrionarias

El principal objetivo de esta sección son las primeras divisiones celulares que se producen durante el desarrollo de mamíferos y las propiedades de las células madre embrionarias. Comenzamos con una explicación de cómo una única célula espermática puede fusionarse con un óvulo y generar así un cigoto con un genoma diploide a partir de estas dos células germinales haploides.

La fecundación unifica el genoma

Es notable que un espermatozoide de mamífero sea capaz de alcanzar y penetrar un óvulo. Por un lado, en los seres humanos cada espermatozoide compite con más de 100 millones de otros espermatozoides por un único ovocito. Es más, el espermatozoide debe nadar una distancia increíble para alcanzar el óvulo (si el espermatozoide fuera del tamaño de una persona, ¡la distancia viajada sería equivalente a varios kilómetros!). Una vez allí, el espermatozoide debe luchar para atravesar múltiples capas que rodean el huevo y que restringen la entrada. El espermatozoide es aerodinámico en cuanto a su capacidad para nadar y acelerar, pero solo unas pocas docenas alcanzarán el ovocito. El flagelo del espermatozoide humano (véase el [Cap. 18](#)) contiene alrededor de 9 000 dineínas motoras que flexibilizan los microtúbulos en el axonema de 50 μm .

El acrosoma, que se encuentra en la punta delantera del espermatozoide, es un compartimiento rodeado por membrana especializado para la interacción con el ovocito. La membrana del acrosoma se encuentra justo por debajo de la membrana plasmática en la cabeza del espermatozoide; el otro lado de la membrana del acrosoma se juxtapone con la membrana nuclear. Dentro del acrosoma se encuentran enzimas solubles, incluyendo hidrolasas y proteasas. En la proximidad del ovocito, durante la fecundación, el acrosoma sufre exocitosis y libera su contenido sobre la superficie del ovocito. Las enzimas digieren las múltiples capas de la superficie para comenzar el proceso de entrada del espermatozoide. Es una carrera, y el primer espermatozoide que lo logra desencadena una respuesta drástica por parte del ovocito que evita la *poliespermia*, la entrada de otros espermatozoides que podrían acarrear un exceso de cromosomas.

Como se muestra en la [Figura 21-2](#), una vez que llega al óvulo, un espermatozoide primero debe penetrar una capa de células cúmulo que rodean al ovocito y luego la *zona pelúcida*, una matriz gelatinosa extracelular compuesta en gran parte por tres glucoproteínas llamadas ZP1, ZP2, y ZP3. Después de que el primer espermatozoide se fusiona

exitosamente con la superficie del ovocito, comienza un flujo de calcio a través del ovocito en alrededor de 5-10 $\mu\text{m/s}$, que parte desde el sitio de entrada del espermatozoide. Uno de los efectos del flujo de calcio es causar que las vesículas localizadas justo por debajo de la membrana plasmática del óvulo, los *gránulos corticales*, liberen sus contenidos al exterior de la membrana plasmática y formen un blindaje de fecundación de la membrana que bloquee la entrada de otro espermatozoide. Por último, el núcleo del espermatozoide entra en el citoplasma del óvulo, y luego los núcleos del espermatozoide y del óvulo se fusionan para crear el núcleo del cigoto diploide.

Los ovocitos traen con ellos a la unión una dote considerable. Contienen múltiples DNA mitocondriales circulares cuya herencia es exclusivamente materna; en los mamíferos y en muchas otras especies no entra DNA mitocondrial en el ovocito. La herencia del DNA mitocondrial específica de las hembras se utiliza para trazar la herencia materna en la historia humana, por ejemplo, siguiendo a los seres humanos primitivos desde sus orígenes en África. El citoplasma del óvulo también está empaquetado con *mRNA materno*: los transcritos de los genes esenciales para las primeras etapas del desarrollo. No existe o hay muy poca transcripción durante la meiosis de los ovocitos y la primera segmentación del embrión; por ende, durante este tiempo el RNA del ovocito es crucial.

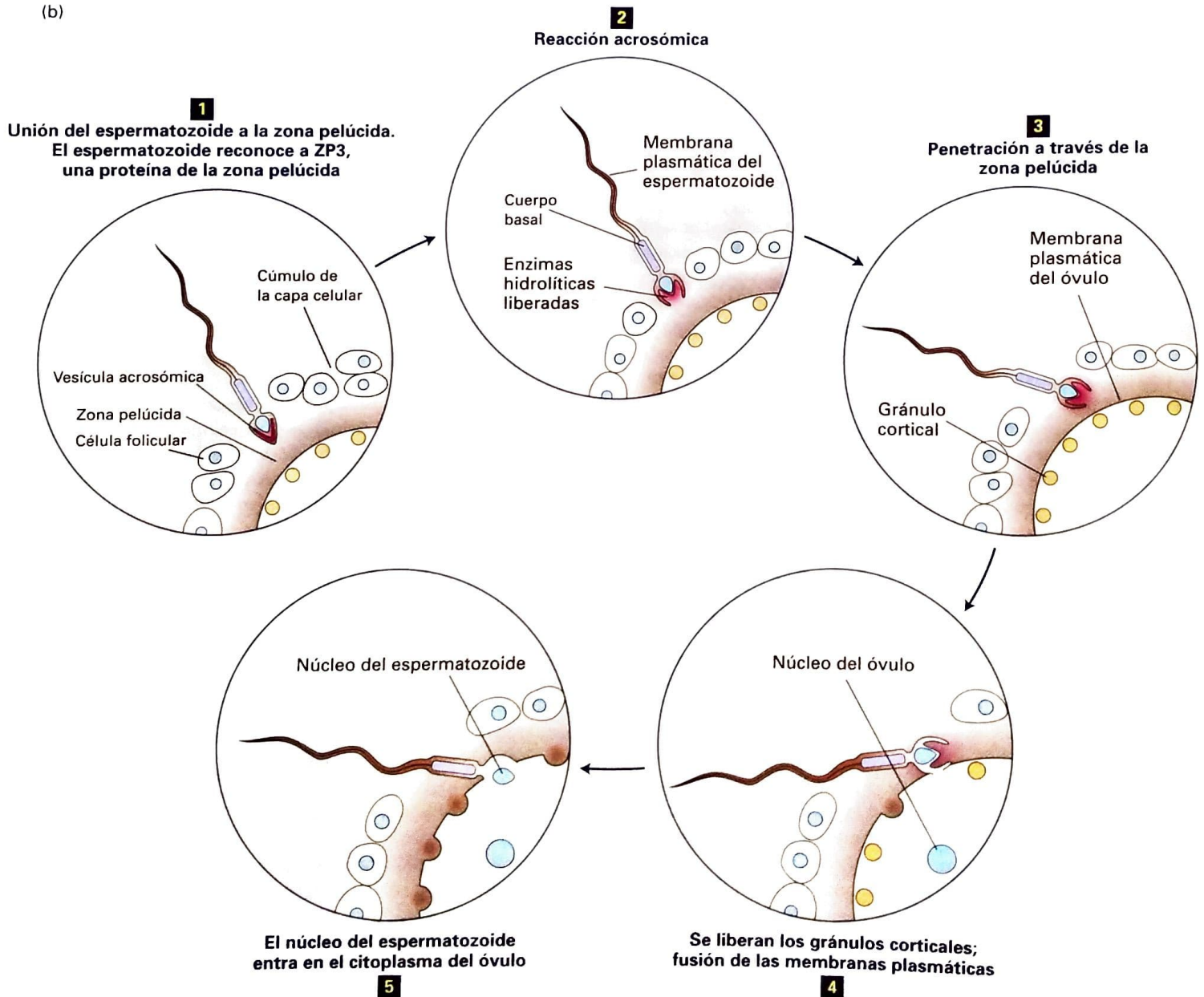
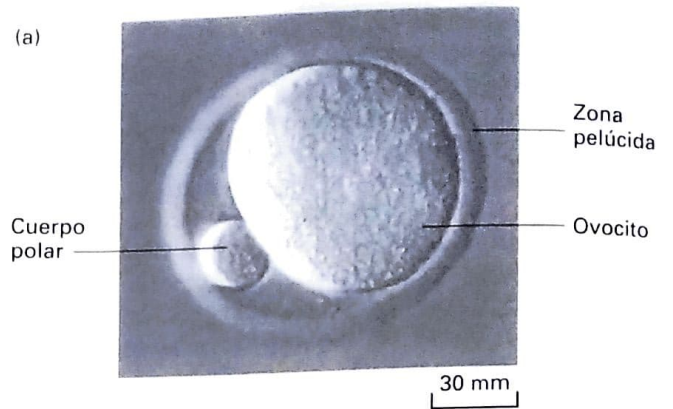
La segmentación del embrión de mamífero conduce a los primeros acontecimientos de diferenciación

El óvulo fecundado, o cigoto, no permanece en una única célula por mucho tiempo. La fecundación es rápidamente seguida por segmentación, una serie de divisiones celulares que requieren alrededor de un día cada una ([Fig. 21-3](#)); las divisiones por segmentación ocurren antes de que el embrión se implante en la pared del útero. En un principio, las células son bastante esféricas y se adhieren débilmente unas con otras. Como se demostró experimentalmente en las ovejas, cada célula en el estadio de ocho células es totipotente y tiene el potencial de dar origen a un animal completo cuando es implantada en el útero pseudoembarazado de un animal (uno tratado con hormonas para que el útero responda a los embriones).

Tres días después de la fecundación, el embrión de ocho células se divide nuevamente y forma la *mórula* de 16 células (del latín, mora pequeña), después de la cual las afinidades de la célula se incrementan sustancialmente y el embrión sufre *compactación*, un proceso que depende en parte de la molécula de superficie cadherina E (véase el [Cap. 20](#)). El proceso de compactación es conducido por la interacción aumentada entre célula y célula que inicialmente resulta en una masa sólida de células, la *mórula compacta*. En el siguiente paso, algunas de las adhesiones entre célula y célula disminuyen localmente, y el líquido comienza a fluir hacia el interior de una cavidad interna denominada *blastocèle*. Divisiones adicionales producen un embrión en estadio de **blastocisto**, compuesto por aproximadamente 64 células que se han separado en dos tipos de células: el **trofoectodermo (TE)**, que formará los tejidos extraembrionarios como la placenta, y la **masa celular interna (MCI)** (solo 10-15 células en un ratón), que da origen al embrión propiamente dicho ([Fig. 21-4a](#)). En el blastocisto, la MCI se encuentra a un lado del blastocèle, mientras que las células TE forman una esfera hueca alrededor de la MCI y el blastocèle. En este punto, las células TE se encuentran en una lámina epitelial, mientras que las MCI están en una masa laxa que puede describirse como **mesénquima**.

El mesénquima, un término que en general se aplica a las células derivadas del mesodermo, significa células organizadas en forma laxa y levemente adheridas.

FIGURA 21-2 Fusión de gametos durante la fecundación. (a) Los óvulos de mamífero, como los ovocitos murinos que se muestran aquí, están rodeados por un anillo de material traslúcido, la zona pelúcida, que proporciona una matriz de unión para el espermatozoide. El diámetro de un óvulo murino es ~ 70 μm , y la zona pelúcida es ~ 6 μm de espesor. El cuerpo polar es un producto no funcional de la meiosis. Barra de escala = 30 μm . (b) En la etapa inicial de la fecundación, el espermatozoide penetra una capa de células cúmulo que rodean al óvulo **(1)** hasta alcanzar la zona pelúcida. Las interacciones entre GalT, una proteína de la superficie del espermatozoide, y ZP3, una glucoproteína en la zona pelúcida, desencadenan la reacción acrosómica **(2)**, la cual libera enzimas desde la zona acrosómica. La degradación de la zona pelúcida por hidrolasas y proteasas liberadas durante la reacción acrosómica permite al espermatozoide comenzar a entrar en el óvulo **(3)**. Proteínas de reconocimiento específicas sobre las superficies del óvulo y el espermatozoide facilitan la fusión de sus membranas plasmáticas. La fusión y la posterior entrada del primer núcleo de espermatozoide en el citoplasma del óvulo **(4)** y **(5)** desencadenan la liberación de Ca^{2+} dentro del ovocito. Los gránulos corticales (naranja) que responden al Ca^{2+} surgen por fusión con la membrana del ovocito y liberación de enzimas que actúan sobre la zona pelúcida para evitar la unión de otros espermatozoides. (Parte [a] cortesía de Doug Kline, parte [b] adaptado de L. Wolpert y cols., 2001, *Principles of Development*, 2nd ed. Oxford Press, Figura 12-22.)



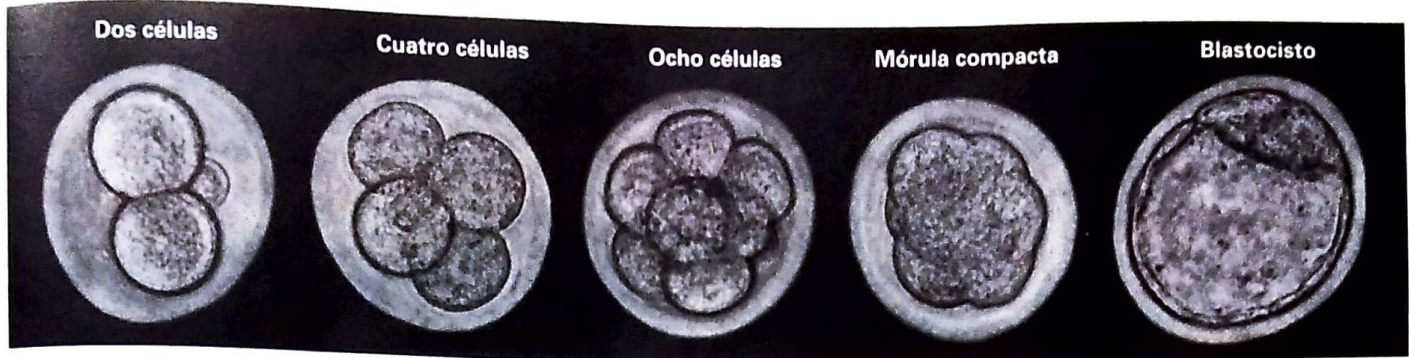


FIGURA 21-3 Divisiones por escisión en el embrión murino. Existe poco crecimiento celular durante estas tres divisiones, de manera tal que las células

se tornan progresivamente más pequeñas. Véase el texto para un análisis. (Derechos de autor Oxford University Press, J. Fleming)

El destino de una célula en el embrión temprano (trofoectodermo o masa celular interna) está determinado por la localización celular. Si un experimento se realiza para colocar una célula marcada ya sea sobre el lado externo o el interior de un embrión muy temprano, las células sobre el exterior tienden a formar los tejidos extraembrionarios, mientras que las insertadas sobre el lado interno tienden a formar los tejidos embrionarios (Fig. 21-4b, c). Las mediciones de la expresión génica de cada estadio del desarrollo temprano muestran cambios drásticos en los cuales se expresan los genes. Incluso estos embriones tempranos usan señales Wnt, Notch y TGF β para regular la expresión génica (véase el Cap. 16).

Tanto las células MCI como las TE son células madre: cada una comienza su propio linaje distintivo y se divide prolíficamente para producir diversas poblaciones celulares. Son las células madre MCI que trataremos a continuación.

La masa celular interna es la fuente de células madre embrionarias (ES)

Las células madre embrionarias (ES) pueden aislarse a partir de la masa celular interna (MCI) de embriones tempranos de mamíferos y crecer indefinidamente en cultivos cuando se adhieren a una capa de células alimentadoras (Fig. 21-5a). Como se mencionó en la introducción del capítulo, las células ES cultivadas son pluripotentes: pueden diferenciarse en una amplia variedad de tipos celulares de las tres capas germinales primarias, ya sea in vitro o después de la reinserción a un embrión huésped. Más específicamente, es posible inyectar células ES murinas en la cavidad blastocela de un embrión murino temprano y el agregado celular puede trasplantarse quirúrgicamente al útero de una hembra pseudo-embarazada. Las células ES participarán en la formación de la mayoría, si no de todos, los tejidos del ratón quimérico resultante (véase la Fig.

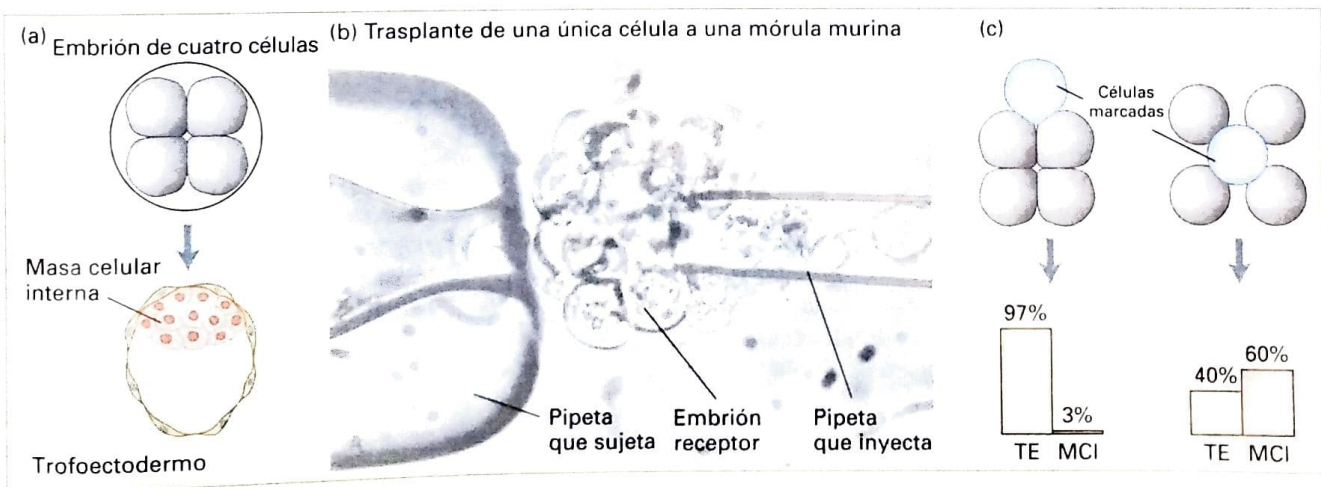


FIGURA EXPERIMENTAL 21-4 La localización celular determina el destino celular en el embrión temprano. (a) Un embrión de cuatro células se desarrolla normalmente en un blastocisto que consiste en células de trofoectodermo (TE) sobre el exterior y células de la masa interna (MCI) en el interior. (b) Para poder determinar si la posición afecta los destinos de las células, se realizaron experimentos de trasplantes con embriones murinos. Primero, a los embriones receptores en el estadio de mórula se les extrajeron células para hacer lugar a las células implantadas. Luego, los embriones en la etapa de mórula (16 células) se embebieron en un colorante que no se transfiere entre las células. Por último, las células marcadas de los embriones donantes se inyectaron en regiones internas y externas de los embriones

receptores, como se muestra en la microfotografía. El embrión receptor se mantiene en su lugar mediante un vacío suave aplicado a la pipeta que lo sostiene. (c) Los posteriores destinos de los descendientes de las células trasplantadas marcadas fueron monitoreados. Para mayor simplicidad, se describen células receptoras de cuatro células, aunque se utilizaron embriones en la etapa de mórula tanto para los donantes como para los receptores. Los resultados, resumidos en los gráficos, demuestran abrumadoramente que las células más externas forman células de trofoectodermo y las células internas tienden a convertirse en la masa celular interna pero también forman una parte considerable de trofoectodermo. (Partes [a] y [c] adaptado de L. Wolpert y cols., 2001. *Principles of Development*, 2nd ed., Oxford Press, Figura 3-12, parte [b] de R. L. Gardner and J. Nichols, 1991. *Human Reproduction* 6:25-35.)

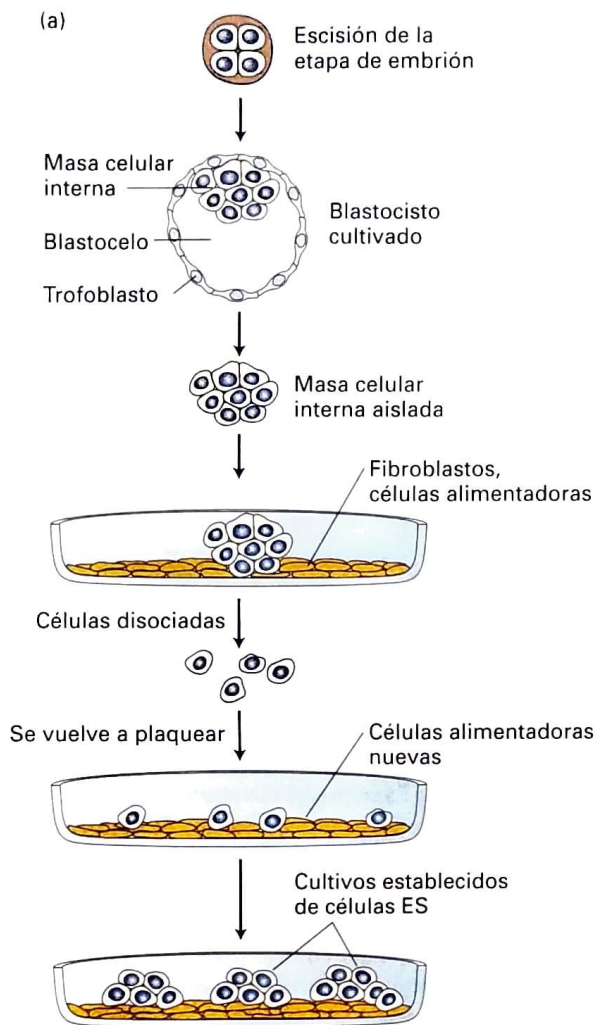
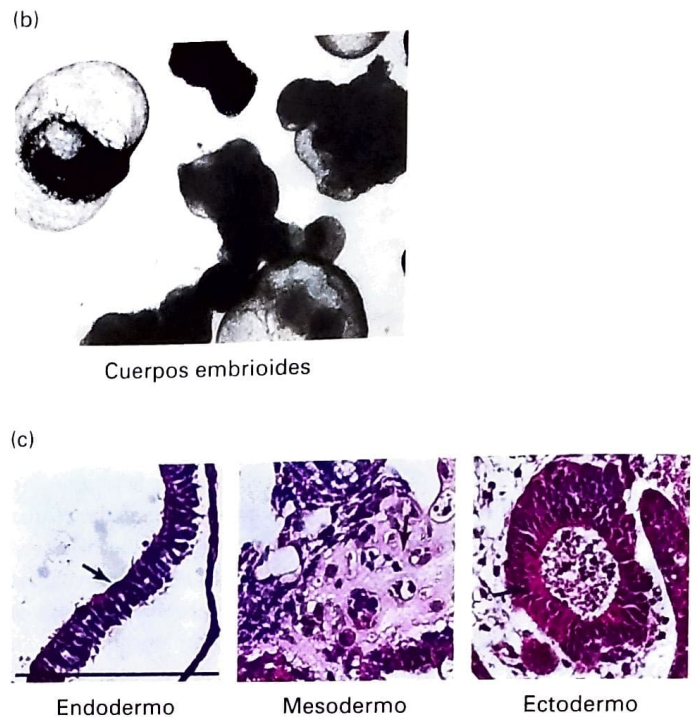


FIGURA EXPERIMENTAL 21-5 Las células madre embrionarias (ES) pueden mantenerse en cultivo y formar tipos celulares diferenciados.

(a) Se cultivan blastocistos murinos o humanos a partir de embriones en la etapa de escisión producidos por fertilización in vitro. La masa celular interna se separa de los tejidos extraembrionarios que la rodean y se siembra sobre una capa de células de fibroblastos que ayuda a nutrir las células embrionarias al proporcionarles hormonas proteicas específicas. Las células individuales se vuelven a plaquar y forman colonias de células ES, que pueden mantenerse durante muchas generaciones y almacenarse congeladas. Las células ES también pueden cultivarse sin una capa alimentadora de fibroblastos si se añaden citocinas específicas; el factor inhibidor de leucemia (LIF), por



ejemplo, mantiene el crecimiento de las células ES murinas al desencadenar la activación del factor de transcripción STAT3. (b) Las células madre embrionarias a las que se les permite diferenciarse en cultivos en suspensión forman agregados multicelulares llamados cuerpos embrioides (*parte superior*). Los recuadros inferiores (c) son secciones de cuerpos embrioides teñidos con hematoxilina y eosina que se formaron a partir de la masa celular interna durante la embriogénesis. Las flechas en las imágenes apuntan a los siguientes tipos de tejidos: (*izquierda*) epitelio intestinal (endodermo), (*parte media*) cartilago (mesodermo) y (*derecha*) las rosetas neuroepiteliales (ectodermo). Barra negra = 100 μ m. (Parte [a] adaptado de J. S. Odorico y cols., 2001, *Stem Cells*, **19**, 193-204; partes [b] y [c] cortesía de los Dres. Lauren Surfacto y Laurie Boyer.)

5-41). A menudo, las células ES inyectadas originarán los óvulos y los espermatozoides que, a su vez, pueden generar un ratón vivo normal. En experimentos más recientes, el blastocelo huésped es tratado con fármacos que bloquean la mitosis de forma tal que las células del blastocisto se convierten en tetraploides (cuatro copias de cada cromosoma), en contraste con las células ES diploides normales que son inyectadas al blastocisto. En este caso, todas las células en el ratón vivo que nacen después del trasplante del agregado de blastocisto derivan de las células ES donantes. Esto es evidencia contundente de que las células ES murinas únicas son en efecto pluripotentes. Debido a que estos experimentos de trasplante no pueden realizarse con células ES humanas, se carece de prueba formal de que sean pluripotentes.

Es importante destacar que tanto las células ES humanas como las murinas pueden diferenciarse para dar una amplia variedad de tipos

celulares en cultivo. Cuando se colocan en cultivos en suspensión, las células ES forman agregados multicelulares, llamados *cuerpos embrioides*, que se asemejan a embriones tempranos en la variedad de tejidos que forman. Después de que los cuerpos embrioides son transferidos a una superficie sólida, crecen y forman láminas celulares confluentes que contienen una variedad de tipos celulares diferenciados, incluyendo epitelio intestinal, cartilagos y células neurales (Fig. 21-5c). En otras condiciones, las células ES han sido inducidas a diferenciarse en cultivo a precursores de diversos tipos celulares, incluyendo células sanguíneas y epitelio pigmentado; así, las células ES han probado ser extremadamente útiles en estudios de identificación de factores que comprometen a una célula pluripotente a diferenciarse en un linaje particular.

¿Qué propiedades dan a estas células del embrión temprano su notable plasticidad? Como se verá en la siguiente sección, una variedad

de actores cumplen un papel: la metilación del DNA, los factores de transcripción, los reguladores de la cromatina y los micro-RNA, todos afectan los genes que se activarán.

Múltiples factores controlan la pluripotencialidad de las células ES

Durante las etapas más tempranas de la embriogénesis, a medida que el óvulo fecundado comienza a dividirse, tanto el DNA materno como el paterno se desmetila (véase el análisis de metilación del DNA en el Capítulo 7). Esto sucede en parte debido a una metiltransferasa de mantenimiento, la Dnmt1, que es transitoriamente excluida del núcleo, y en parte debido a las proteínas desmetilasas que activamente se eliminan o “borran” estas marcas de metilación durante el desarrollo temprano. Como resultado, el patrón de metilación es reinicializado durante las primeras divisiones celulares, con lo cual se borran marcas epigenéticas más tempranas y se crea una condición donde las células tienen mayor potencial para diversas vías de desarrollo. Los ratones genéticamente modificados que carecen de Dnmt1 mueren como embriones tempranos con el DNA drásticamente metilado. Las células ES preparadas a partir de tales embriones son capaces de dividirse en cultivo pero, en contraste con las células ES normales, no pueden sufrir diferenciación in vitro.

Las propiedades de las células ES también son muy dependientes de la acción de los factores de transcripción “maestros” producidos poco tiempo después de la fecundación. Los factores de transcripción Oct4, Sox2 y Nanog tienen funciones esenciales en el desarrollo temprano y son necesarias para la especificación de las células de la masa celular interna en el embrión y de células ES en cultivo. La expresión de Oct4 y Nanog es exclusiva para células pluripotentes, como las células de las MCI y las ES cultivadas. Sox2 se encuentra en las células pluripotentes, pero su expresión también es necesaria en las células madre neuronales multipotentes que dan origen exclusivamente a tipos celulares gliales y neuronales y que se describen en la siguiente sección. Estudios genéticos en el ratón sugieren que estos reguladores tienen funciones distintas pero pueden funcionar en vías relacionadas para mantener el potencial de desarrollo de las células pluripotentes. Por ejemplo, la interrupción de Oct 4 o Sox2 da como resultado la diferenciación inapropiada de células MCI y ES a trofoectodermo, las células que originan la placenta. Sin embargo, la expresión forzada de Oct 4 en las células ES conduce a un fenotipo que es similar a la pérdida de función Nanog. Por lo tanto, el conocimiento podría revelar sus funciones esenciales durante el desarrollo.

Los genes unidos por estos tres factores de transcripción se han identificado mediante experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina (véase el Cap. 7); cada proteína se encuentra en más de 1 000 localizaciones cromosómicas. Los genes diana codifican una variedad de proteínas, incluyendo las proteínas Oct4, Nanog, y Sox2 en sí mismas, que forman un asa reguladora como así también la de estos factores controla su propia expresión también se unen a otros (Fig. 21-6). Estos factores de transcripción también se unen a las regiones promotoras/amplificadoras de muchos genes que codifican proteínas y micro-RNA importantes para la proliferación y autorrenovación de células ES.

Los reguladores de la cromatina que controlan la transcripción génica (véase el Cap. 7) también son importantes en las células ES. En *Drosophila*, el grupo de proteínas Polycomb forma complejos para

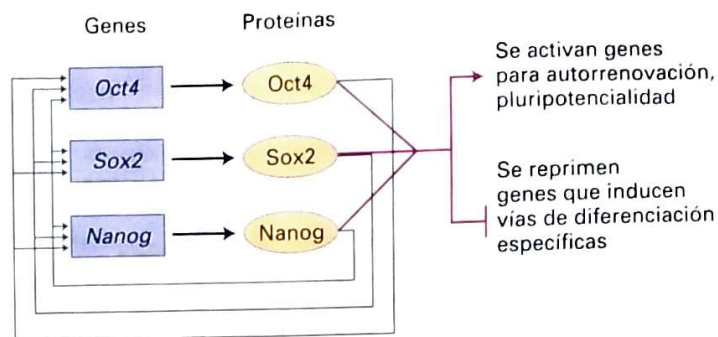


FIGURA 21-6 Red transcripcional que regula la pluripotencia de las células ES. Cada uno de los tres factores de transcripción “maestros”, Oct4, Sox2 y Nanog, se unen a su propio promotor como así también a los promotores de los otros dos (líneas negras) y forman un circuito autorregulador positivo que activa la transcripción de cada uno de estos genes. Estos factores de transcripción también se unen a las regiones promotoras/amplificadoras de muchos genes activos que codifican proteínas y micro-RNA importantes para la proliferación y autorrenovación de las células ES (líneas magenta). Estos factores también se unen a las regiones promotoras/amplificadoras de muchos genes que son silenciados en células ES indiferenciadas y que codifican proteínas y micro-RNA esenciales para la formación de muchos tipos celulares diferenciados (líneas grises). (Adaptado de L. A. Boyer y cols., 2006, *Curr. Opin. Genetics Dev.* 16:455-462.)

mantener los estados de represión génica que habían sido establecidos previamente por los factores de transcripción de unión al DNA. Dos complejos proteicos de mamífero relativos a las proteínas Polycomb, PRC1 y PRC2, son muy abundantes en las células ES. Los embriones murinos tempranos que carecen de componentes de PRC2 evidencian defectos de gastrulación, y las células ES que carecen de funciones PRC2 no pueden ser mantenidas en un estado indiferenciado. El complejo PRC2 de proteínas actúa mediante adición de grupos metilos a la lisina 27 de la histona H3, y de esta forma se altera la estructura de la cromatina para reprimir genes. (Nótese que aquí la metilación está sobre un aminoácido en una proteína, un tipo de regulación diferente de la metilación del DNA). En las células ES, tanto PRC1 como PRC2 silencian genes cuyas proteínas codificadas o micro-RNA (miRNA) podrían de otro modo inducir la diferenciación a tipos particulares de células diferenciadas; las proteínas Polycomb también mantienen estos genes en un estado epigenético de “preactivación” de modo tal que estén a punto de ser activados más tarde como parte de la ejecución apropiada de los programas de expresión génica específicos del desarrollo.

Muchos otros reguladores cumplen funciones importantes en el control de la expresión génica y el mantenimiento de la pluripotencialidad durante el desarrollo muy temprano. Por ejemplo, el gen que codifica el miRNA let-7 es transcrito en las células ES, pero el transcrito de RNA precursor no es cortado para formar el miRNA maduro, funcional. Las células ES expresan una proteína de unión a RNA regulada por el desarrollo, llamada Lin28, que se une al RNA precursor let-7 y evita su escisión. La expresión experimental del miRNA let-7 maduro en las células ES bloquea su capacidad para sufrir autorrenovación; por ende, la represión del procesamiento de let-7 por Lin28 es esencial para la pluripotencialidad.



La posibilidad de utilizar células madre embrionarias en forma terapéutica para reparar o reemplazar tejido dañado es alimentada por mucha investigación acerca de cómo inducir las a diferenciarse

en tipos celulares específicos. Por ejemplo, si las neuronas que producen el neurotransmisor dopamina pudieran ser generadas a partir de un cultivo de células madre, podría ser posible tratar a personas con la enfermedad de Parkinson que han perdido tales neuronas.

Al tratar exitosamente células ES con grupos de hormonas, es posible generar células productoras de insulina. Sin embargo, estas células solo producen una fracción de la insulina sintetizada por una célula beta del islote pancreático, y no secretan insulina normalmente en respuesta a cambios en la concentración de glucosa en el medio (véase la discusión en el Cap. 16). Recientemente, células ES humanas fueron desencadenadas a diferenciarse en un tipo de progenitor islote llamado *endodermo pancreático*; cuando estas células fueron trasplantadas a ratones, generaron células beta funcionales que procesaron de manera correcta la proinsulina a insulina (véase la Fig. 14-24) y secretaron normalmente insulina humana en respuesta a elevaciones en la glucosa en sangre. Gran parte del trabajo está dedicado a persuadir a estas células endodérmicas derivadas ES a convertirse en células beta normales en cultivos que pueden usarse para tratar a pacientes diabéticos. Sin embargo, es preciso responder muchas preguntas importantes antes de que sea factible el uso de células madre embrionarias humanas con fines terapéuticos. Por ejemplo, cuando las células ES indiferenciadas son trasplantadas a un animal experimental, forman teratomas, un tumor que contiene masas de tipos celulares indiferenciados; por lo tanto, es esencial asegurar que *todas* las células ES usadas para generar un implante hayan atravesado efectivamente la diferenciación y hayan perdido sus pluripotencialidades. ■

Aparte de sus posibles beneficios en el tratamiento de enfermedades, las células ES han probado ser inestimables en la producción de ratones mutantes útiles para el estudio de una amplia variedad de enfermedades, mecanismos del desarrollo, el comportamiento y la fisiología. Utilizando técnicas de DNA recombinante descritas en el Capítulo 5, es posible eliminar o modificar la función de un gen específico en las células ES (véase la Fig. 5-40). Luego, las células ES mutantes pueden emplearse para producir ratones con un silenciamiento génico o *knockout* (véase la Fig. 5-41). El análisis de los efectos causados por la delección o modificación de un gen en esta forma suele proporcionar pistas acerca del funcionamiento normal del gen y su proteína codificada.

La clonación animal demuestra que la diferenciación puede revertirse

Aunque diferentes tipos de células pueden transcribir distintas partes del genoma, la mayor parte del genoma es idéntico en todas las células. Segmentos del genoma se reordenan y se pierden durante el desarrollo de los linfocitos B y T a partir de los precursores hematopoyéticos (véase el Capítulo 23), pero la mayoría de las células somáticas parece tener un genoma intacto, equivalente al de la línea germinal. Existe evidencia de que al menos algunas células somáticas tienen un genoma completo y funcional que proviene de la producción exitosa de animales clonados mediante transferencia nuclear. En este procedimiento, a menudo llamado transferencia nuclear de célula somática (SCNT), el núcleo de una célula somática adulta es introducido en un óvulo al que se le ha eliminado el núcleo; el óvulo manipulado, que contiene el número diploide de cromosomas y es equivalente a un cigoto, luego es implantado en una madre sustituta. La única fuente de información genética para guiar el desarrollo del embrión es el genoma nuclear de la célula

somática donante. Sin embargo, la baja eficiencia de la generación de animales clonados por SCNT, en combinación con una alta frecuencia de enfermedades como la obesidad en los animales que son clonados, plantea cuestiones acerca de cómo muchas células somáticas adultas en efecto tienen un genoma funcional completo y si aquellos que lo hacen pueden ser completamente reprogramados a un estado indiferenciado pluripotente. Incluso el éxito, como el de la famosa oveja clonada "Dolly," tiene algunos problemas médicos. Aunque las células diferenciadas tienen un genoma físicamente completo, es claro que solo partes de este se encuentran transcripcionalmente activas (véase el Cap. 7). Por ejemplo, una célula podría tener un genoma intacto pero ser incapaz de reactivar adecuadamente genes específicos debido a los estados epigenéticos de la cromatina heredada.

Otra prueba de que el genoma de una célula diferenciada puede revertirse hasta tener la característica completa de potencial del desarrollo de una célula madre embrionaria proviene de experimentos donde las neuronas sensitivas olfatorias posmitóticas fueron genéticamente marcadas con proteína verde fluorescente (GFP, *green fluorescent protein*) y luego usadas como donantes de núcleos (Fig. 21-7). Cuando los núcleos de células olfatorias diferenciadas se implantaron en ovocitos enucleados murinos, una pequeña fracción de ellos se desarrolló en blastocistos que produjeron GFP. Los blastocistos se utilizaron para derivar líneas de células ES, que luego fueron usadas para generar embriones murinos. Estos embriones, derivados completamente a partir de los genomas de neuronas olfatorias, formaron ratones sanos verde fluorescentes. Por lo tanto, al menos en algunos casos, el genoma de una célula diferenciada puede ser reprogramado completamente para formar todos los tejidos de un ratón.

Las células somáticas pueden generar células madre pluripotentes inducidas (iPS)

Debido a la ineficiencia de la transferencia nuclear somática, es incierto si todos los tipos de células de mamífero retienen un genoma intacto y si ellas pueden ser inducidas a desdiferenciarse a un estado similar al de las células ES. Shinya Yamanaka utilizó vectores retrovirales para expresar una amplia variedad de factores de transcripción, de forma única o combinada, en fibroblastos murinos cultivados. Notablemente, encontró que tanto las células murinas como las humanas podían ser reprogramadas a un estado pluripotente, denominado **célula madre pluripotente inducida (iPS)**, similar al de una célula madre embrionaria, seguida por transducción con retrovirus que codifican solo cuatro factores: KLF4, SOX2, OCT4 y c-MYC. Nótese que dos de estos, Sox2 y Oct4, son dos de los reguladores transcripcionales maestros en las células ES analizados anteriormente. La expresión de combinaciones de estos y otros factores de transcripción induce la formación de iPS a partir de muchos tipos de células somáticas, incluyendo células B productoras de anticuerpo.

Se teorizó que, con el tiempo, la expresión forzada de estos genes activa la expresión de muchos genes celulares, incluyendo aquellos que codifican las proteínas pluripotentes Oct4, Nanog y Sox2 que, con el transcurso de varias semanas, reprograman las células somáticas a un estado similar al ES. Para establecer experimentalmente este punto, los RNA mensajeros sintéticos que codifican los cuatro factores de transcripción canónicos de Yamanaka, KLF4, SOX2, OCT4 y c-MYC, fueron transfectados repetidamente a células de queratinocitos cultivados (formadores de piel). Estas células cultivadas generaron células iPS

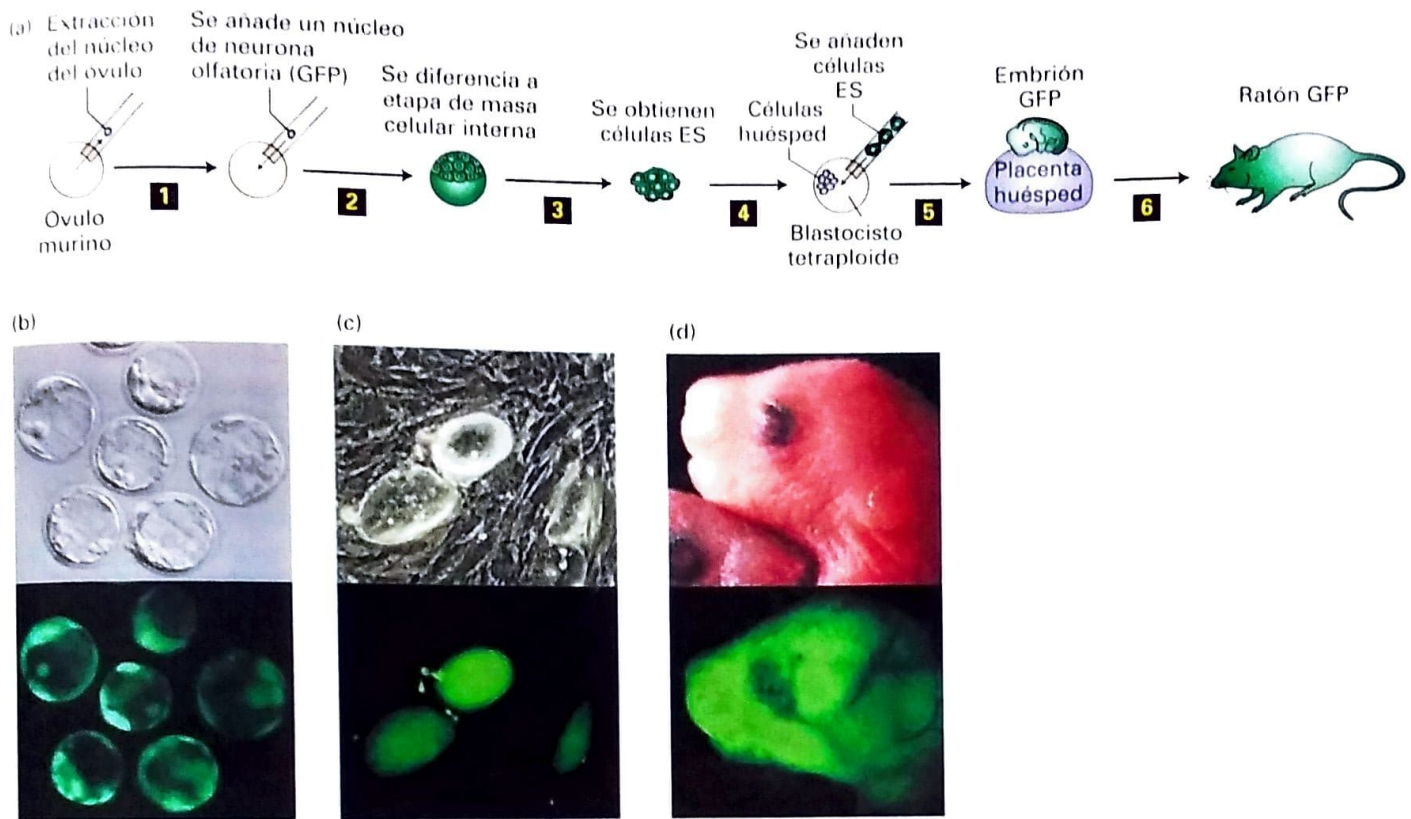


FIGURA EXPERIMENTAL 21-7 Los ratones pueden ser clonados mediante trasplante nuclear de células somáticas de neuronas olfatorias. (a) Estrategia para generar líneas de células ES clonadas usando núcleos de neuronas sensitivas olfatorias y la generación de ratones clonados.

1 Se aísla un núcleo de una neurona sensitiva olfatoria a partir de un ratón que expresa proteína verde fluorescente (GFP) solo en las neuronas olfatorias y se lo utiliza para reemplazar el núcleo de un óvulo murino; el cigoto resultante se diferenció en cultivo hasta la etapa de masa celular interna. **2** Las células de la masa celular interna, todas las cuales fueron clones de la neurona sensitiva olfatoria original expresaron GFP, se utilizaron para generar

líneas de células ES **3** y **4** estas células ES se inyectaron dentro de un blastocisto tetraploide. **5** Cuando el blastocisto se trasplantó al útero de un ratón pseudopregnado, las células tetraploides del blastocisto huésped pudieron formar la placenta (gris) pero no el embrión propiamente dicho, y **6** todas las células en el embrión propiamente dicho y en los ratones que nacieron expresaron GFP. (b) Imágenes de campo brillante (arriba) y de fluorescencia (abajo) de los blastocistos de transferencia nuclear y (c) las células ES que se aislaron a partir de las células de la masa celular interna. (d) Un ratón control de 12 horas de edad (arriba) y un ratón clonado a partir de neurona sensitiva olfatoria (abajo), todos cuyas células expresaron GFP. [De k. Eggan y cols., 2004, *Nature*, 428:44]

normales que no habían tenido trazas de cualquiera de los RNA mensajeros añadidos exógenamente, lo cual acreditó la reprogramación de los queratinocitos a células iPS al inducir solo la expresión de los genes celulares normales.

Al igual que con las células ES, las iPS únicas pueden ser introducidas experimentalmente a un blastocisto y formar todos los tejidos de un ratón, incluyendo las células germinales; esto corrobora el hecho de que las células somáticas en efecto pueden ser reprogramadas a un estado embrionario.



Debido a que las iPS pueden derivar de las células somáticas de pacientes con enfermedades difíciles de comprender, han probado ser inestimables en el descubrimiento de las bases de diversas afecciones. Consideremos la esclerosis amiotrófica lateral (ELA), una enfermedad mortal caracterizada por la degeneración de neuronas motoras somáticas en la médula espinal, el tronco cerebral y la corteza cerebral. En aproximadamente el 10% de los pacientes, la enfermedad es de herencia dominante (ELA familiar), pero en el 90% de los individuos no existe ligamiento genético aparente (ELA esporádico). En alrededor del 20% de los pacientes con ELA familiar, hay una mutación puntual en el gen que codifica la superóxido dismutasa 1 de Cu/Zn (SOD1).

Existe alguna evidencia de que la proteína SOD1 mutante forma agregados que pueden dañar las células, pero se desconoce si la forma mutante de SOD1 causa daño directamente a las neuronas motoras o a las células gliales circundantes (véase la Fig. 22-14).

En un estudio relevante, las células iPS derivadas de pacientes ancianos con la forma familiar de la enfermedad se diferenciaban exitosamente en cultivo a neuronas motoras, como así también a células gliales. Esto demuestra la factibilidad del aprovechamiento de la autorrenovación de las células iPS para generar un suministro potencialmente ilimitado de las células específicamente afectadas por la ELA. En un estudio separado para diseccionar la causa molecular de la ELA, se generaron neuronas motoras a partir de células ES o iPS humanas y cultivadas con astrocitos humanos primarios (un tipo de célula glial). Alrededor de la mitad de las neuronas motoras mueren si las células gliales expresan la forma mutante de SOD1, lo cual sugiere que, al menos en la forma familiar de la ELA, las células defectuosas son los astrocitos. En efecto, los astrocitos que expresan la forma mutante de SOD1 secretaron factores proteicos que fueron tóxicos para las neuronas motoras adyacentes. La determinación de la naturaleza de estos factores podría llevar a una terapia para la ELA, pero en cualquier caso, estos experimentos ilustran el valor de las células iPS y ES en la generación de modelos de cultivo de células de

enfermedades humanas que podrían ser utilizadas para la búsqueda de fármacos que pudieran tratar la afección. ■

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 21.1

Desarrollo temprano en metazoos y células madre embrionarias

- En la división celular asimétrica, se forman dos tipos diferentes de células hijas a partir de una célula madre. Por el contrario, ambas células hijas formadas por divisiones simétricas son idénticas pero muchas tienen destinos diferentes si son expuestas a distintas señales externas (véase la Fig. 21-1).
- Las proteínas especializadas de la superficie de óvulos y espermatozoides permiten que el núcleo de un único espermatozoide de mamífero entre en el citoplasma de un óvulo. La fusión del núcleo de un espermatozoide haploide y con el núcleo de un óvulo haploide genera un cigoto diploide.
- Las divisiones iniciales del embrión de mamífero producen células totipotentes equivalentes, pero divisiones posteriores producen el primer evento de diferenciación, la separación del epitelio de trofoblasto de la masa celular interna.
- La masa celular interna es la fuente del embrión propiamente dicho, como así también de las células madres (ES) embrionarias.
- Las células madre embrionarias cultivadas (células ES) son pluripotentes, capaces de dar origen a todos los tipos de células diferenciadas del organismo, con la excepción de los tejidos extraembrionarios. Ellas son útiles en la producción de ratones genéticamente alterados y ofrecen potencial para usos terapéuticos.
- La pluripotencialidad de las células ES es controlada por múltiples factores, incluyendo el estado de metilación del DNA, reguladores de la cromatina, ciertos micro-RNA y los factores de transcripción Oct4, Sox2 y Nanog.
- La clonación animal establece que puede revertirse la diferenciación celular.
- Las células madre pluripotentes (iPS) pueden formarse a partir de células somáticas mediante la expresión de combinaciones de factores de transcripción que son claves, incluyendo KLF4, SOX2, OCT4 y c-MYC.

21.2 Células madre y nichos en organismos multicelulares

Muchos tipos celulares diferenciados son recambiados en el cuerpo o tienen períodos de vida que son más cortos que otros del organismo. Las enfermedades y los traumatismos pueden llevar a la pérdida de células diferenciadas. Puesto que la mayoría de los tipos de célula diferenciada en general no se dividen, deben ser reabastecidos a partir de poblaciones de células madre cercanas. Los animales posnatales (adultos) contienen células madre para muchos tejidos, incluyendo la sangre, el intestino, la piel, los ovarios y los testículos, y el músculo. Incluso algunas partes del cerebro adulto, donde normalmente se produce poca división celular, tienen una población de células madre. En el músculo, estas células son más importantes en la cicatrización, puesto que se produce relativamente poca división celular en otros momentos. Algunos otros tipos celulares, como las células hepáticas (hepatocitos) y las células beta de los islotes pancreáticos, se reproducen sobre todo

por división de células ya diferenciadas, como se ejemplifica con la regeneración del hígado cuando se extirpan quirúrgicamente porciones grandes. Es controvertido si estos tejidos también contienen células madre que puedan generar estos tipos de células diferenciadas.

Las células madre originan tanto células madre como células diferenciadas

Las células madre, que dan origen a las células especializadas que componen los tejidos corporales, tienen tres propiedades claves:

- Pueden originar múltiples tipos de células diferenciadas; son *multipotentes*. En este sentido, son diferentes de las **células progenitoras**, que en general dan lugar a solo un único tipo de célula diferenciada. Una célula madre tiene la capacidad de generar una cantidad de tipos celulares diferenciados pero no todos; es decir, no es pluripotente como una célula ES. Por ejemplo, una célula madre sanguínea multipotente formará más de sí misma además de múltiples tipos de células sanguíneas, pero nunca una célula hepática o epitelial.
- Las células madre son indiferenciadas; en general, no expresan proteínas características de los tipos celulares diferenciados formados por sus descendientes.
- Por lo general, la cantidad de células madre de un tipo particular permanece constante durante un tiempo de vida individual. En ese sentido, suele decirse que las células madre son inmortales aunque una única célula madre no sobreviva durante la vida del animal.

Las células madre pueden exhibir diversos patrones de división celular, que se esquematizan en la Figura 21-8. Una célula madre puede dividirse simétricamente en dos para dar lugar a células madre hijas idénticas a sí mismas. De manera alternativa, una célula madre puede dividirse asimétricamente para generar una copia de sí misma y una célula madre hija que tiene más capacidades restrictivas, como dividirse durante un tiempo limitado o dar lugar a menos tipos de progenie en comparación con la célula madre progenitora. Por ejemplo, cada vez que una célula madre en el intestino se divide, una de las hijas se convierte en una célula madre idéntica a su progenitora, mientras que la otra célula hija se divide rápidamente y genera cuatro tipos de células intestinales diferenciadas, como se verá en breve en mayor detalle.

Las dos propiedades cruciales de las células madre que, juntas, las distinguen de todas las otras células son la capacidad para reproducirse a sí mismas indefinidamente, a menudo llamada *autorrenovación*, y la capacidad para, según sea necesario, dividirse asimétricamente para formar una célula madre hija idéntica a sí misma y una célula madre de potencial más restringido. Muchas divisiones de células madre son simétricas y producen dos células madre, pero en algún momento la progenie necesita diferenciarse. Así, la división mitótica de las células madre puede agrandar la población de células madre o mantener una población de células madre mientras que de manera constante se produce un flujo de células diferenciadas. Aunque algunos tipos de células progenitoras pueden dividirse de manera simétrica para formar más de sí mismas, solo lo hacen por períodos limitados.

Las células madre de diferentes tejidos ocupan nichos sustanciales

Las células madre necesitan el microambiente correcto. Además de las señales regulatorias *intrínsecas* (como la presencia de ciertas proteínas reguladoras), las células madre dependen de las señales hormonales

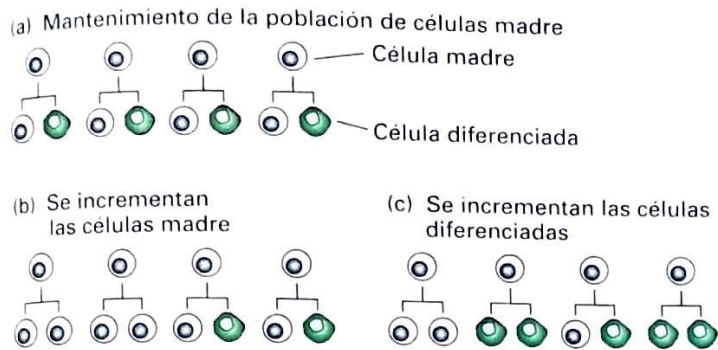


FIGURA 21-8 Patrones de diferenciación de células madre. Los patrones de división de células madre producen más células madre (azul) y las células que se diferencian (verde). Las divisiones de células madre cumplen tres objetivos: deben mantener la población de célula madre, a veces deben incrementar el número de células madre y, en el momento indicado, deben producir células que vayan a diferenciarse. (a) Las células madre pueden atravesar divisiones asimétricas, producir una célula madre y una célula diferenciada. Esto no incrementa la población de células madre. (b) Algunas células madre pueden dividirse simétricamente para aumentar su población, que puede ser útil en el desarrollo normal o durante la recuperación de lesiones, al mismo momento que otras se dividen asimétricamente como en (a). Las células pueden dividirse como en (b) mientras que al mismo tiempo las células madre producen dos progenies diferenciadas. (De S. J. Morrison y J. Kimble, 2006, *Nature* 441: 106S-1074.)

extrínsecas y de otras señales regulatorias provenientes de células circundantes para mantener el estatus de células madre. La ubicación en la que un destino de la célula madre puede mantenerse se denomina **nicho o microentorno de célula madre**, por analogía a un nicho ecológico (una localización que admite la existencia y la ventaja competitiva de un organismo particular). La combinación correcta de la regulación intrínseca y extrínseca, impartida por un nicho, creará y sustentará una población de células madre.

Con el objeto de investigar o utilizar las células madre, se las debe encontrar y caracterizar. Suele ser dificultoso identificar precisamente las células madre; estas son muy raras y en general carecen de formas distintivas e incluso no se dividen particularmente rápido. Las células madre pueden mantenerse en reserva, dividiéndose lentamente en todo caso, hasta que sean estimuladas por señales que transmiten la necesidad de células nuevas. Por ejemplo, el suministro inadecuado de oxígeno puede estimular a las células madre sanguíneas a dividirse, y las lesiones en la piel pueden estimular la división celular regenerativa, comenzando con la activación de las células madre. Algunas células madre, incluyendo aquellas que forman el epitelio continuo del intestino, están dividiéndose en forma continua, en general a una velocidad baja.

Las células germinales producen espermatozoides y ovocitos

La **línea germinal** es el linaje celular que produce los ovocitos y los espermatozoides. Se distingue de las células somáticas que constituyen todos los otros tejidos, pero que no se transmiten a la progenie. La línea germinal, al igual que los linajes de células somáticas, comienza con las células madre. Los nichos de célula madre se han definido bien en estudios de las células madre de la línea germinal (GSC) en *Drosophila* y *C. elegans*. Las células de la línea germinal están presentes en moscas y gusanos adultos, y se conoce bien la localización de las células madre.

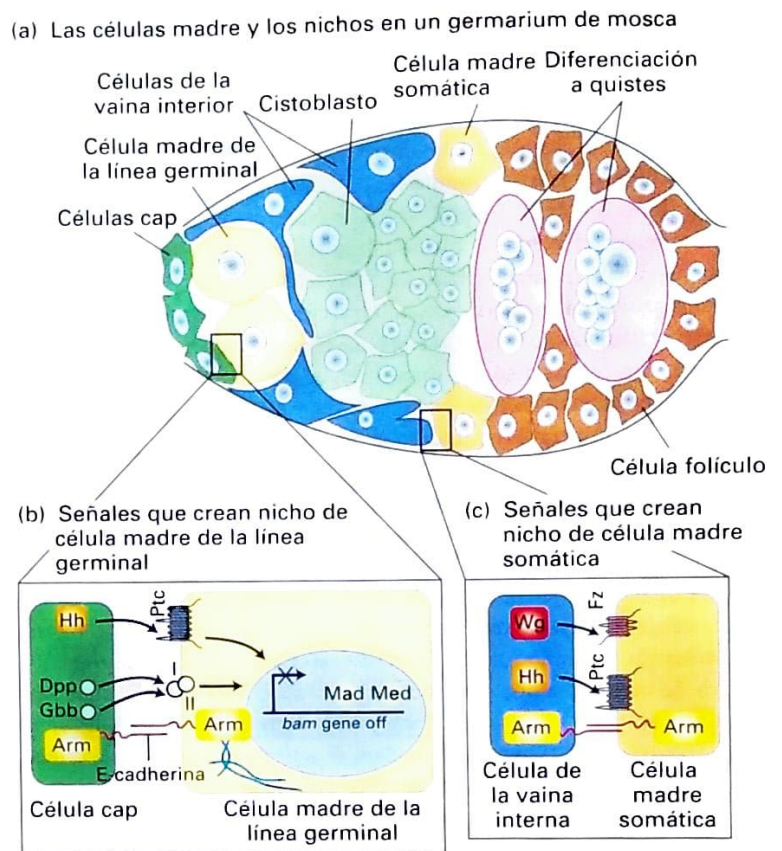


FIGURA 21-9 Un gerarium de *Drosophila*. (a) Sección transversal del gerarium que muestra las células madre de la línea germinal (amarillo) y las células madre somáticas (doradas) en sus nichos y las células progenie derivadas de ellas. Las células madre de la línea germinal producen citoblastos (verde), que sufren cuatro rondas de división mitótica para producir 16 células interconectadas, una de las cuales se convierte en ovocito; las células madre somáticas producen células foliculos (marrón) que formarán la cubierta del óvulo. Las células del casquete (verde oscuro) crean y mantienen el nicho para las células madre de la línea germinal, mientras que las células de la vaina interna (azul) producen el nicho para las células madre somáticas. (b) Vías de señalización que controlan las propiedades de las células madre de la línea germinal. Las moléculas de señalización (proteínas Dpp y Gbb de la familia del TGF- β como así también Hedgehog [Hh]) son producidas por las células cap. La unión de estos ligandos a los receptores sobre la superficie de una célula madre de la línea germinal, los receptores TGF- β I y II, y Ptc, respectivamente, da como resultado la represión del gen *bam* mediante dos factores de transcripción, Mad y Med, y un corepresor *Schnurri*. La represión de *bam* permite que las células madre de la línea germinal se renueven, mientras que la activación de *bam* estimula la diferenciación. La proteína transmembrana de adhesión celular cadherina E forma las uniones de adherencia homotípica entre las células de línea germinal y las células cap. Arm (armadillo) es la catenina- β de mosca y conecta las colas citoplasmáticas de la cadherina E al citoesqueleto de actina; tanto la cadherina E como Arm son importantes para mantener el nicho de células madre. (c) Vías de señalización que controlan las propiedades de las células somáticas. La señal Wnt Wingless (Wg) es producida por las células de vaina interna y recibida por el receptor Fruzzled (Fz) sobre una célula madre somática. Hh es producida de manera similar y recibida por el receptor Ptc. Ambos receptores señalan para controlar la transcripción que resulta en la autorrenovación de las células madre somáticas. (Adaptado de L. Li y T. Lee, 2005, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22:605.)

En el ovario de mosca, el nicho donde se forman los precursores de ovocitos y comienzan a diferenciarse se localiza junto a la punta del *germarium* (Fig. 21-9a). En esta localización, existen dos o tres células madre de la línea germinal al lado de unas pocas células cap (casquete), que crean el nicho al secretar dos proteínas de la familia de **factores de crecimiento transformante beta (TGF- β)** (Dpp y Gbb) y la proteína **Hedgehog (Hh)** (Fig. 21-9b). El concepto referido a estas señales de proteínas secretadas se introdujo en el Capítulo 16. Las células cap crean el microambiente debido a que las señales de clase TGF- β que envían reprimen la transcripción de un factor de diferenciación clave, la proteína llamada *Bam* (*Bag of marbles*), en las células madre germinales vecinas. Las células madre se mantienen en el nicho mediante proteínas transmembrana cadherina E de la superficie celular, que forma uniones de adherencia a través de interacciones homotípicas con moléculas de cadherina E similares sobre la célula cap. *Armadillo* (*Arm*), la catenina β , conecta las colas citoplasmáticas de la cadherina E al citoesqueleto de actina; como la cadherina E, *Arm* es importante en el mantenimiento del nicho de células madre.

Cuando una célula madre de la línea germinal se divide, una de las dos células hijas resultantes permanece adyacente a las células cap y es mantenida así como una célula madre, al igual que la célula progenitora. La otra célula hija se encuentra demasiado lejos de las células cap como para recibir las señales Dpp y Gbb derivadas de las células cap. En consecuencia, la expresión de *Bam* se activa y provoca que la célula germinal entre en el programa de diferenciación.

Las células madre somáticas separadas en el *germarium* producen células foliculares que formarán la cubierta del óvulo. Las células somáticas también tienen un nicho, creado por las células de la vaina interior, que producen la proteína Wingless (*Wg*) (una señal **Wnt** de volar) y la proteína *Hh* (Fig. 21-9c). La *Hedgehog* producida por las células cap también cumple una función. Así, dos poblaciones diferentes de células madre pueden funcionar en estrecha coordinación para producir partes distintas de un óvulo.

En los gusanos, los brazos largos similares a tubos de las gónadas tienen extremos donde una única célula llamada una célula del extremo distal crea un nicho de célula madre (Fig. 21-10). La proteína transmembrana Delta, producida por la célula del extremo distal, se une al receptor Notch sobre las células madre de la línea germinal adyacentes. En las células madre de la línea germinal de gusano, la vía de señalización Delta/Notch (véase la Fig. 16-35) reprime la inducción de productos génicos que estimulan la diferenciación que conduce la entrada en la meiosis (p. ej., diferenciación de la línea germinal) y estimula la división mitótica simétrica por autorrenovación que crea más células madre hijas. Por lo tanto, la meiosis está bloqueada por la señal Delta hasta que las células madre se muevan más allá del espectro de la señal desde la célula del extremo distal. Mutaciones que activan Notch en las células madre de la línea germinal, incluso en ausencia de señal Delta, causan un tumor de gónada con números masivos de células madre de la línea germinal extra, debido a mitosis excesiva y poca meiosis.

La identificación y la caracterización de las células madre de la línea germinal de *Drosophila* y de *C. elegans* fueron importantes debido a que demostraron de forma convincente la existencia de nichos de células madre y permitieron experimentos para identificar las señales formadoras de nichos que causan que las células se conviertan y permanezcan por autorrenovación como células madre. Así, un nicho de célula madre es un grupo de células y las señales que ellas producen, no solo una ubicación.

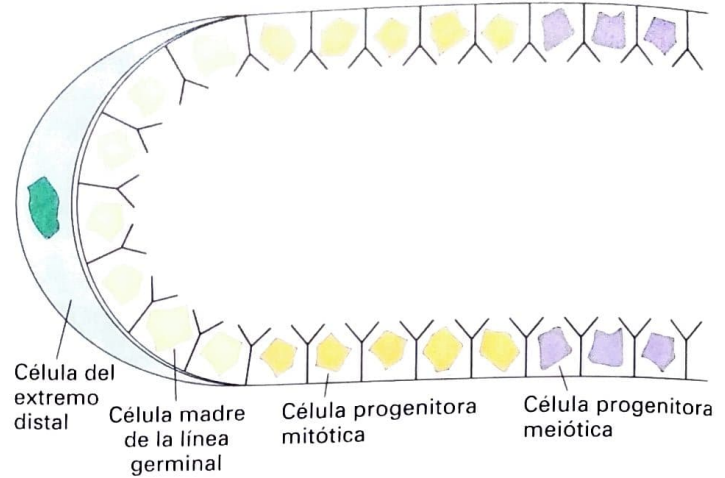


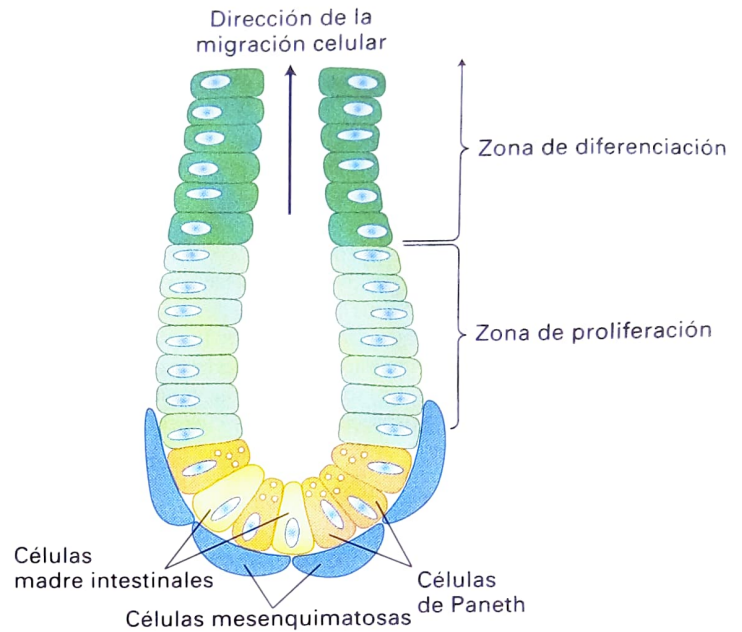
FIGURA 21-10 Células madre de la línea germinal en *C. elegans*. Una sección transversal de la punta de la gónada muestra a las células madre en sus nichos y la progenie derivada de ellas. La única célula de la punta distal (verde) crea y mantiene el nicho; expresa Delta sobre su superficie, que se une al receptor Notch sobre las células madre de la línea germinal. Las señales inducidas en estas células madre estimulan la mitosis simétrica, autorrenovante, que forma dos células madre de la línea germinal hijas. A medida que estas células madre se mueven hacia fuera más allá del alcance de la señal Delta, continúan dividiéndose pero son capaces de autorrenovarse por no más de unas pocas divisiones. Eventualmente, se convierten en células progenitoras mitóticas que forman las células germinales. Durante estas etapas, las células están solo parcialmente separadas por membranas (forma "Y") y, por ende, son un sincitio. (Adaptado de L. Li y T. Xie, 2005, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21:605-631)

La identificación de moléculas específicas que mantienen el estado de célula madre en *Drosophila* y *C. elegans* trajo una ventaja inesperada: alguna de estas moléculas también son usadas para formar nichos de células madre y controlar el destino de dichas células en los mamíferos. Por ejemplo, las células de la línea germinal en los testículos murinos son dependientes de una proteína de señalización (GDNF) de la familia TGF- β derivada de las células somáticas. Cada tubo seminífero contiene una pequeña cantidad de células madre de la línea germinal que se dividen asimétricamente para regenerarse ellas mismas y producir células espermatogénicas. Las espermatogonias proliferan y su progenie se convierte en espermatoцитos, que atraviesan un proceso de diferenciación extraordinario para formar un espermatozoide. El nicho es creado por la región especializada de una célula de Sertoli junto con una célula mieloide y una membrana basal producida por la célula mieloide, aunque todavía quedan por explorar muchos detalles de las señales moleculares.

Las células madre intestinales generan continuamente todas las células del epitelio intestinal

El revestimiento intestinal del intestino delgado es una mucosa de única célula gruesa (véase la Fig. 20-10) compuesta por tres tipos de células diferenciadas. Las células epiteliales más abundantes, los enterocitos absortivos, transportan nutrientes esenciales para la sobrevivencia desde el lumen intestinal al cuerpo (véase la Fig. 11-30). El epitelio intestinal es el tejido que se autorenewa más rápidamente en los mamíferos adultos; se recambia cada cinco días. Las células del epitelio intestinal se regeneran continuamente a partir de una población de células madre localizada en la parte profunda de la pared intestinal, en las fositas

FIGURA 21-11 Células madre intestinales. Dibujo esquemático de una cripta que muestra las células madre intestinales (amarillo), su progenie mitótica (verde claro) y el sitio de diferenciación terminal (verde oscuro). La base de la cripta es la localización de las células de Paneth (anaranjado) que proporciona una parte principal del nicho de célula madre y también secreta proteínas de defensa antibacterianas que forman poros en las membranas bacterianas y matan bacterias. Las células mesenquimatosas (azul) rodean la base de la cripta y también secretan proteínas como Wnt, que estimulan los destinos de célula madre y compensan las señales BMP que impulsan la diferenciación. (Adaptado L. Li and T. Xie, 2005, Stem cell niche: structure and function, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**:605-631 y T. Sato y cols., 2011, *Nature* **469**:415.)



llamadas *criptas* (Fig. 21-11). Los experimentos de pulso de marcado y seguimiento demostraron que las células madre intestinales producen células precursoras que proliferan y luego se diferencian a medida que ascienden por los laterales de las criptas para formar la capa superficial de las proyecciones intestinales digitiformes llamadas *vellosidades*, a través de las cuales se produce la absorción intestinal. El tiempo transcurrido desde el nacimiento de celular en las criptas hasta la pérdida de las células en la punta de las vellosidades es de solo 3 a 4 días (Fig. 21-12). Así, deben producirse cantidades enormes de células de forma continua para mantener el epitelio intacto. La producción de células nuevas está precisamente controlada: muy poca división podría eliminar las vellosidades y llevar a una degradación de la superficie intestinal; demasiada división podría crear un exceso de epitelio y también podría ser un paso hacia el cáncer.

Los experimentos como el descrito en la Figura 21-12 sugirieron que las células madre intestinales se localizaron en algún lugar cerca de la parte inferior de las criptas, cerca de las células intestinales diferenciadas llamadas células de Paneth. Pero estas células madre putativas no tienen características morfológicas particulares que revelen sus capacidades notables; ¿cuáles son las células madre intestinales reales y cuáles las células de soporte que forman el nicho?

Los experimentos genéticos anteriores habían demostrado que las señales Wnt eran esenciales para el mantenimiento de las células madre. Como evidencia para la importancia de las Wnts, la sobreproduc-

ción de catenina β (normalmente activada por señales Wnt; véase la Fig. 16-30) en las células intestinales llevó a un exceso de proliferación del epitelio intestinal. Por el contrario, el bloqueo de la función de la β -catenina por interferencia con factor de transcripción TCF activado por Wnt abole las células madre en el intestino. Por lo tanto, la señalización de Wnt cumple una función crucial en el nicho intestinal de células madre, como lo hace en la piel y otros órganos. En efecto, las mutaciones que activan inadecuadamente la transducción de la señal Wnt son contribuyentes importantes a la progresión del cáncer de colon, como se verá en el Capítulo 24.

Al analizar un panel de genes cuya expresión en el intestino fue inducida por la señalización Wnt, los investigadores se concentraron en Lgr5, que codifica un receptor acoplado a proteína G, debido a que solo se expresaba en un grupo pequeño de células en la base misma de las criptas. Lgr 5 se une a una clase de hormonas secretadas llamada R-

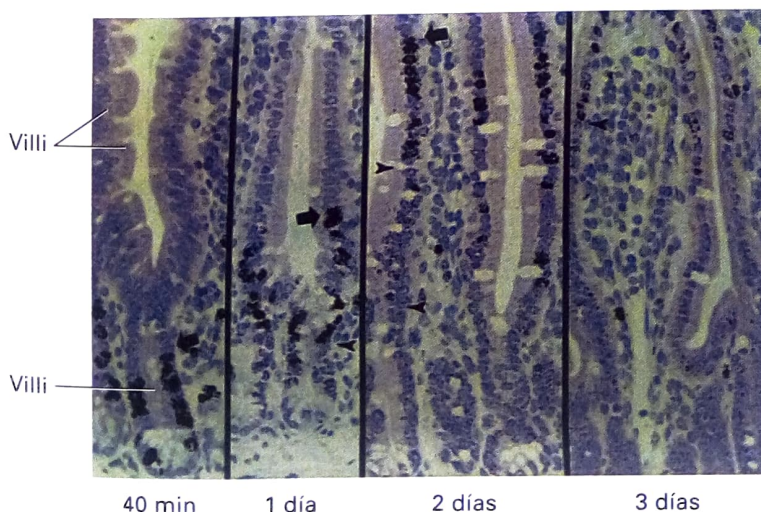


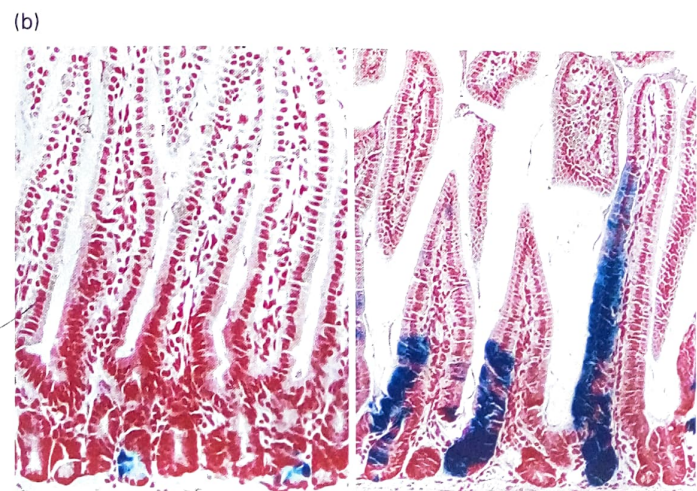
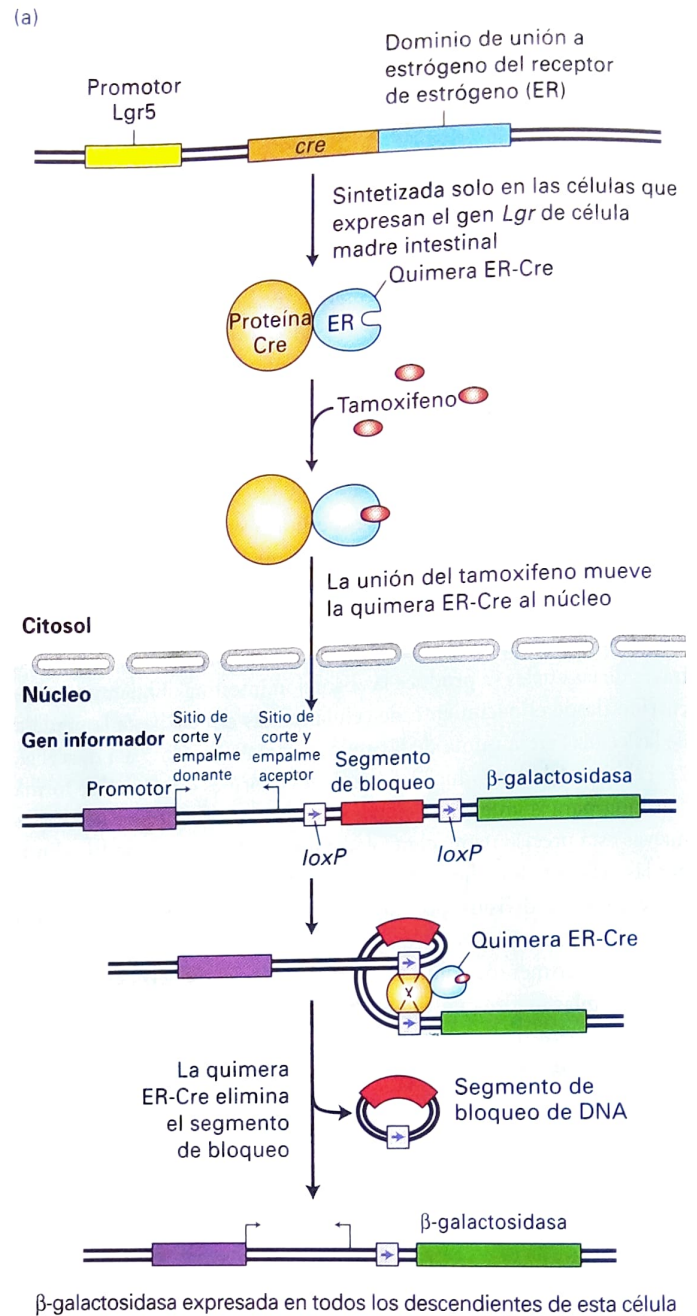
FIGURA EXPERIMENTAL 21-12 La regeneración del epitelio intestinal a partir de las células madre puede demostrarse en experimentos de pulso y caza. Los resultados de un experimento en el cual se añadió timidina marcada radioactivamente (el pulso) a un cultivo de tejido de epitelio intestinal. Las células en división incorporaron la timidina marcada en sus DNA recién sintetizados. La timidina marcada se eliminó por lavado y se reemplazó con timidina no marcada (la caza) después de un breve periodo; las células que se dividieron después de la caza no se marcaron. Estas microfotografías demuestran que, 40 minutos después del marcaje, las células marcadas se ven progresivamente más lejos del punto de nacimiento en la cripta. Las células en la parte superior son cubiertas. Este proceso asegura el reabastecimiento constante del epitelio intestinal con células nuevas. (Cortesía de C. S. Potten; de P. Kaur y C. S. Potten, 1986, *Cell Tiss. Kinet.* **19**:601.)

FIGURA EXPERIMENTAL 21-13 Estudios para trazar el linaje demuestran que las células *Lgr5*⁺ en la base de las criptas son células madre intestinales. (a) Esquema del experimento. Utilizando células ES genéticamente modificadas (véase la Fig. 5-40), los investigadores generaron una cepa de ratones en la cual una versión de la recombinasa Cre (véase la Fig. 5-42) se colocó bajo control del promotor *Lgr5*, y así la recombinasa Cre se produjo solo en las células, como las células madre intestinales, que expresan el gen *Lgr5*. Esta versión de recombinasa Cre contiene un dominio adicional del receptor de estrógeno (ER) que une el análogo de estrógeno tamoxifeno; al igual que el receptor de estrógeno y otros receptores nucleares como el receptor glucocorticoide (Fig. 7-44), la quimera ER-Cre fue retenida en el citosol a no ser que se haya añadido tamoxifeno. En presencia de tamoxifeno, ER-Cre se mueve hacia el interior del núcleo, donde puede interactuar con sitios *loxP* en el DNA cromosómico. La segunda cepa informadora de los ratones contenía un gen bacteriano β -galactosidasa, que estaba precedido por dos sitios *loxP*. El segmento de bloqueo de DNA entre estos sitios *loxP* evita la expresión del gen β -galactosidasa, y la β -galactosidasa solo podía ser expresada en células donde una recombinasa Cre activa había eliminado la secuencia entre los dos sitios *loxP*. Los dos ratones se cruzaron, y se identificó la descendencia que contenía ambos transgenes marcadores. En estos ratones, la β -galactosidasa se expresó solo en las células en las cuales el gen ER-Cre que controla *Lgr5* y únicamente después de la adición del análogo de estrógeno, el tamoxifeno, a los ratones. Por lo tanto, solo las células que expresan *Lgr5*, y todos sus descendientes, expresarían el gen de la β -galactosidasa. (b) Los resultados del experimento. Un día después de añadir tamoxifeno a estos ratones, las únicas células que expresaron β -galactosidasa (medida por la cepa histoquímica azul) fueron las células madre intestinales que expresan *Lgr* en la base de las criptas (izquierda). Cinco días después del tamoxifeno, las células azules adicionales, los descendientes epiteliales de las células madre intestinales, fueron vistas migrando hasta los laterales de las vellosidades. Algunas de las células madre azules permanecieron en la base de la cripta. (Parte [b] de N. Barker y cols., 2007, *Nature* 449:1003.)

espondina y activa las vías de señalización intracelular que potencian la señalización de Wnt. Estudios que trazan el linaje demostraron que, en efecto, los descendientes de estas células que expresan *Lgr* dan origen a todas las células epiteliales intestinales (Fig. 21-13). Este experimento utilizó ratones genéticamente modificados en los cuales una versión de la recombinasa Cre (véase la Fig. 5-42), una quimera del receptor de estrógenos (ER)-Cre, se ubicó bajo el control del promotor *Lgr*; así, la recombinasa quimera ER-Cre se producía solo en las pocas células madre putativas que expresaban *Lgr5* en la parte inferior de las criptas. La versión de la Cre usada en el estudio ha sido alterada de manera tal que normalmente reside en forma inactiva en el citosol y solo es transferida al núcleo después de la adición de un análogo de los estrógenos (Fig. 21-13a). Allí, la Cre escinde un fragmento de DNA y activa la expresión de un gen informador β -galactosidasa en estas células. Es importante destacar que todos los descendientes de estas células expresarán también esta enzima. Inmediatamente después de la adición del análogo de los estrógenos, las únicas células que expresan β -galactosidasa son las células madres en las criptas. Pero después de unos pocos días, todas las células epiteliales descendientes también expresaron β -galactosidasa (Fig. 21-13b), lo cual demuestra que, en efecto, *Lgr5* es un marcador de las células madre intestinales.

En estudios posteriores, se aislaron células madre que expresan *Lgr5* a partir de criptas intestinales y se cultivaron sobre una matriz extracelular (véase la Fig. 20-22) que contiene colágeno tipo IV y laminina que normalmente subyace al epitelio intestinal y lo sostiene. Estas células generan estructuras similares a vellosidades que contienen los cuatro tipos de células diferenciadas encontrados en el epitelio intestinal.

En estudios posteriores, se aislaron células madre que expresan *Lgr5* a partir de criptas intestinales y se cultivaron sobre una matriz extracelular (véase la Fig. 20-22) que contiene colágeno tipo IV y laminina que normalmente subyace al epitelio intestinal y lo sostiene. Estas células generan estructuras similares a vellosidades que contienen los cuatro tipos de células diferenciadas encontrados en el epitelio intestinal.



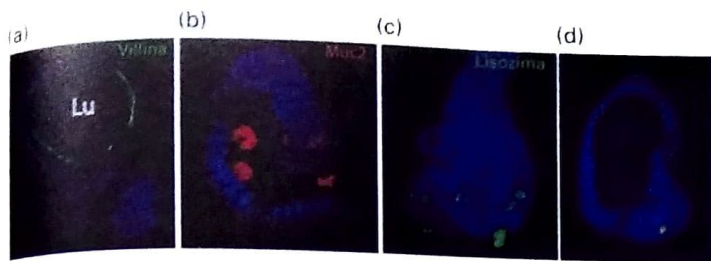
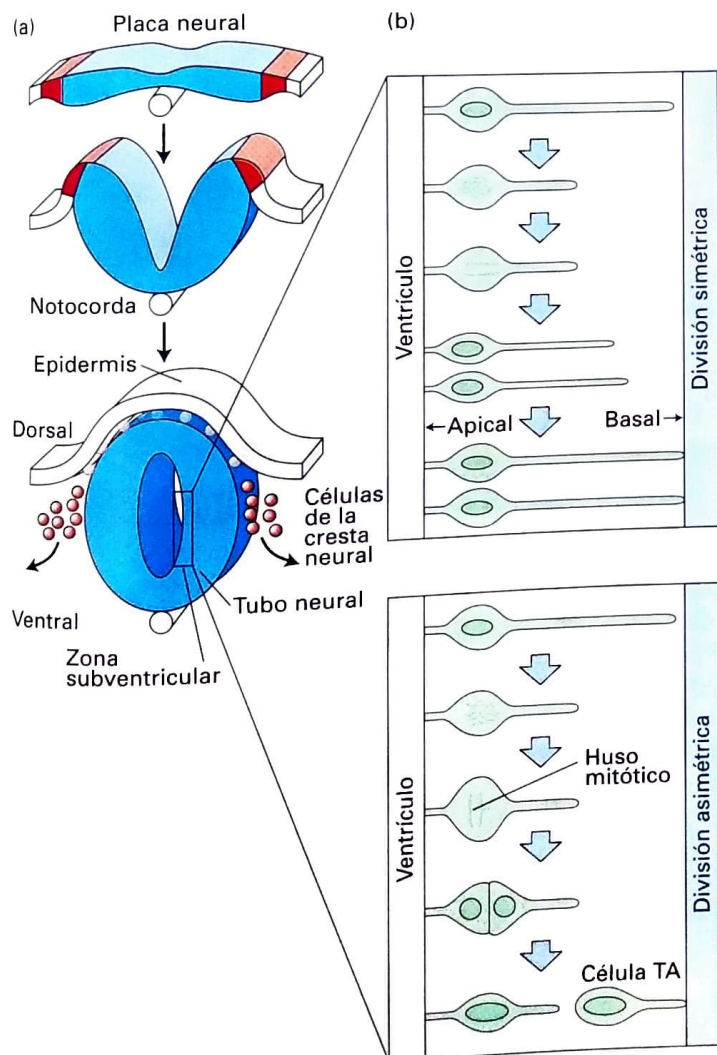


FIGURA EXPERIMENTAL 21-14 Las células madre intestinales que expresan *Lgr5* construyen estructuras de cripta -vellosidades en cultivos sin células nicho- Las células que expresan *lgr5* a partir de criptas intestinales se colocaron en cultivos de una matriz extracelular tipo 4 (véase la Fig. 20-22). Después de dos semanas, formaron láminas epiteliales que se asemejan en estructura a las vellosidades. La tinción de estos organoides para proteínas marcadoras específicas mostró que contenían los cuatro tipos de células epiteliales diferenciadas: (a) vilina, verde, una proteína marcadora para los enterocitos absortivos que se localizan cerca de la superficie apical (luminal, Lu) de estas células; (b) Muc2, en rojo, células calciformes; (c) lisozima, verde, células de Paneth y (d) cromogranina A, verde, células enteroendocrinas. Los organoides también se tiñeron con DAPI (azul) para revelar los núcleos. (De T. Sato y cols., 2009 *Nature* 459:262.)

tinal maduro (Fig. 21-14). Tomados en conjunto, estos experimentos establecen que la expresión del gen *Lgr5* define las células madre intestinales y demuestra que estas células se localizan en la base de las criptas intestinales diseminadas entre las células de Paneth terminalmente diferenciadas (véase la Fig. 21-11).

Las células de Paneth producen diversas proteínas antibacterianas que protegen al intestino de las infecciones; sorprendentemente, evidencia reciente sugiere que las células de Paneth también constituyen una parte importante del nicho para las células madre intestinales. Las células de Paneth cultivadas producen Wnt y también otras hormonas, como el EGF y una proteína Delta, esenciales para el mantenimiento de las células

madre intestinales. El cocultivo de las células madre intestinales con las células de Paneth mejora marcadamente la formación de las estructuras similares a vellosidades, y manipulaciones genéticas en ratones que causaron una reducción del número de células de Paneth ocasionaron una reducción concomitante en las células madre intestinales. Por lo tanto, las células de Paneth, que son células progenie de las células madre intestinales, también constituyen la mayoría (si no es que todo) del nicho para el mantenimiento de las células madre intestinales.



Las células madre neurales forman las células nerviosas y las gliales en el sistema nervioso central

El gran interés en la formación del sistema nervioso y en el hallar mejores formas de prevenir o tratar enfermedades neurodegenerativas ha tornado la caracterización de las células madre neurales en un objetivo importante. Las primeras etapas del desarrollo neuronal de vertebrados involucra el laminado de un tubo de ectodermo (la capa celular que recubre el exterior del embrión) que se extiende a lo largo de la longitud del embrión desde la cabeza hasta la cola (Fig. 21-15a).

FIGURA 21-15 Formación del tubo neural y división de las células madre neurales. (a) Temprano en el desarrollo de los vertebrados, una parte del ectodermo se enrolla y se separa del resto de las células. Este forma la epidermis (gris) y el tubo neural (azul). Cerca de la interfase entre las dos, se forman las células de la cresta neural y luego migran para contribuir a la pigmentación de la piel, la formación nerviosa, el esqueleto craneofacial, las válvulas cardíacas, las neuronas periféricas y otras estructuras. La notocorda, un bastón de mesodermo por el cual somos denominados (cordados), proporciona señales que afectan el destino celular en el tubo neural. El interior del tubo neural se convertirá en una serie de cámaras llenas de líquido llamadas ventrículos. Las células madre localizadas adyacentes a los ventrículos, descritas como en la zona subventricular (SVZ), se dividirán para formar neuronas que migran radialmente hacia afuera para formar las capas del sistema nervioso. (b) Las células madre en la zona ventricular pueden dividirse simétricamente (*parte superior*) para originar dos células madre, lado a lado, ambas en contacto con el ventrículo. Alternativamente, las células madre pueden dividirse para producir una hija que es una célula madre capaz de autorrenovación y otra hija, llamada célula de amplificación transitoria (TA), que comienza a migrar y a diferenciarse (*parte inferior*). Una diferencia clave entre los dos patrones de división es la orientación del huso mitótico. (Adaptado de L. R. Wolpert y cols., 2001, *Principle of Development*, 2d ed., Oxford University Press.)

Este tubo neuronal formará la médula espinal y el cerebro. Inicialmente, este ensanchamiento del tubo es una única capa de células, y estas células, las células madre neurales embrionarias (NSC), darán origen al sistema nervioso central completo. El interior del tubo neuronal forma los compartimientos llenos de líquido llamados *ventrículos*, y el revestimiento del tubo neural, donde ocurre la mayoría de la división celular, se denomina *zona subventricular* (ZSV). La ZSV tiene propiedades de un nicho de célula madre.

Se llevaron a cabo experimentos de marcaje y traza para determinar cómo nacen las células y dónde van después de su nacimiento. Las células madre neurales embrionarias que recubren el ventrículo pueden dividirse simétricamente y producir dos células madre hijas de lado a lado (Fig. 21-15b). De manera alternativa, pueden dividirse asimétricamente y producir una célula que permanece como célula madre y otra que migra radialmente hacia afuera. Las células que migran suelen denominarse *células de amplificación transitoria* (TA) debido a que se dividen rápidamente múltiples veces para formar los precursores neuronales llamados neuroblastos. Una vez formadas, las células TA y los neuroblastos migran radialmente hacia afuera y forman sucesivas capas de tejido neural de una forma de adentro hacia afuera. En contraste con las células TA y los neuroblastos, las células madre permanecen en contacto con el ventrículo (véase la Fig. 21-15b). Por ende, las células recién formadas atraviesan las capas de células preexistentes antes de ocupar una residencia en el exterior.

Los experimentos de traza con virus han demostrado que un neuroblasto puede producir dos hijas, una neurona y una célula glial. El experimento se realizó preparando una biblioteca de retrovirus, cada una con una única secuencia de DNA, de manera tal que cualquier célula infectada por un único virus podría dar origen a un clon de células que llevan toda esa secuencia particular de DNA del virus. De esta forma, todas las células que derivan de un único precursor NSC o TA podrían ser identificadas como un clon (Fig. 21-16). Los resultados del experimento fueron sorprendentes. Primero, se encontró que algunas neuronas migraron distancias laterales considerables, abandonando la migración radial hacia la capa cortical más externa. Segundo, en algu-

nos casos, una única neurona y una única célula glial compartieron secuencias de DNA viral. Evidentemente, un precursor neuronal había sido infectado y luego se había dividido una vez para dar origen a dos tipos de células bastante distintos.

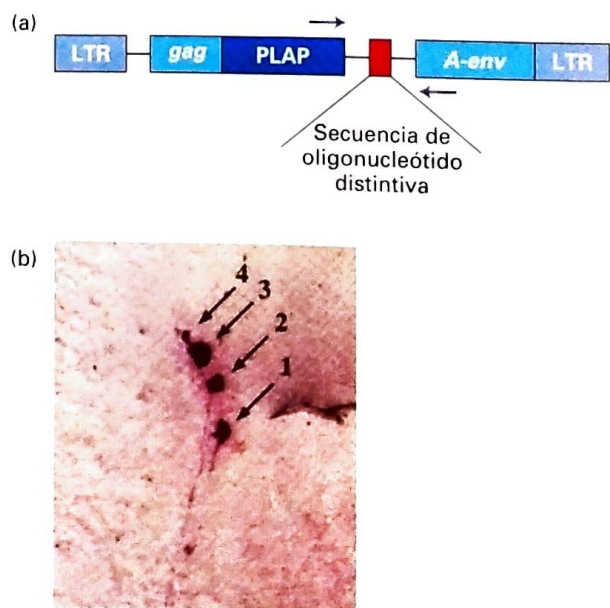
Durante muchos años, se creyó que en el adulto no se formaban células nerviosas nuevas. En efecto, la mayoría de las células del cerebro de mamíferos detienen su división en la edad adulta, pero algunas células en la zona subventricular y en una región cercana al hipocampo siguen actuando como células madre para generar neuronas nuevas (Fig. 21-17). De manera similar a otros tipos de células madre, estas células madre neurales están funcionalmente definidas por su capacidad para autorrenovarse y diferenciarse en linajes neurales, incluyendo neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Para identificar y caracterizar las células neurales, las células aisladas de la zona subventricular se cultivaron con factores de crecimiento como FGF2 o EGF. Algunas de las células sobrevivieron y proliferaron en un estado indiferenciado, es decir, podían autorrenovarse. En presencia de otras hormonas, estas células indiferenciadas originaron neuronas, astrocitos u oligodendrocitos. El establecimiento exitoso de células multipotentes y que se autorrenuevan del cerebro adulto proporciona una fuerte evidencia para la presencia de poblaciones de células madre.

Algunas de las NSC en la zona subventricular tienen propiedades de astrocitos, como la producción de proteína ácida fibrilar glial (GFAP). Pero estas NSC pueden dividirse asimétricamente para reproducirse a sí mismas y para producir células de amplificación transitoria que a su vez se dividen para formar precursores neurales (neuroblastos). El nicho subventricular es creado por señales en su mayoría desconocidas a partir de células endoteliales que forman una capa justo por dentro del tubo neural (revistiendo el ventrículo) y por células endoteliales que forman los vasos sanguíneos en la vecindad (véase la Fig. 21-17). Las células endoteliales, y la lámina basal que forman, están en contacto directo con las NSC y se cree que son esenciales en la formación del nicho de célula madre neural. Cada célula madre neural extiende un único cilio a través de la capa de células endoteliales hasta contactar directamente el ventrículo. Aunque se desconoce la función del cilio,

FIGURA EXPERIMENTAL 21-16 La infección por retrovirus puede utilizarse para trazar el linaje celular.

(a) Genoma viral genéticamente modificado. Las repeticiones terminales largas (LTR) son repeticiones retrovirales estándares. Las proteínas virales necesarias para la infección son codificadas en los genes *gag* y *A-env*. PLAP es un gen introducido para una fosfatasa alcalina. La detección de esta enzima por tinción histoquímica se utiliza para determinar qué células portan un virus. La secuencia de oligonucleótido, sintetizada por la provisión de nucleótidos al azar, es diferente en cada virus y puede ser amplificada por PCR mediante el uso de cebadores para secuencias que están en todos los virus (flechas azules) y luego, secuenciada. Se creó una biblioteca de más de 10^5 virus diferentes. Debido a que estos virus carecen de genes necesarios para la reproducción de nuevos viriones en células infectadas, cada virus defectuoso puede infectar una célula solo una vez, integrarse en forma estable en el genoma, y se expresa en esa célula y en todos sus descendientes. (b) Sección de tejido que muestra las células infectadas con virus defectuosos. El DNA de cada clon teñido de las células puede ser extraído y amplificado por PCR para determinar la secuencia del virus infectado. Las células descendientes a partir de la misma célula inicialmente infectada tendrán la misma secuencia de oligonucleótidos, mientras que los acontecimientos de infección separados tendrán secuencias diferentes. (De J. A. Golden y cols., 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

92:5704.)



(a) Sección transversal de todo el cerebro en desarrollo

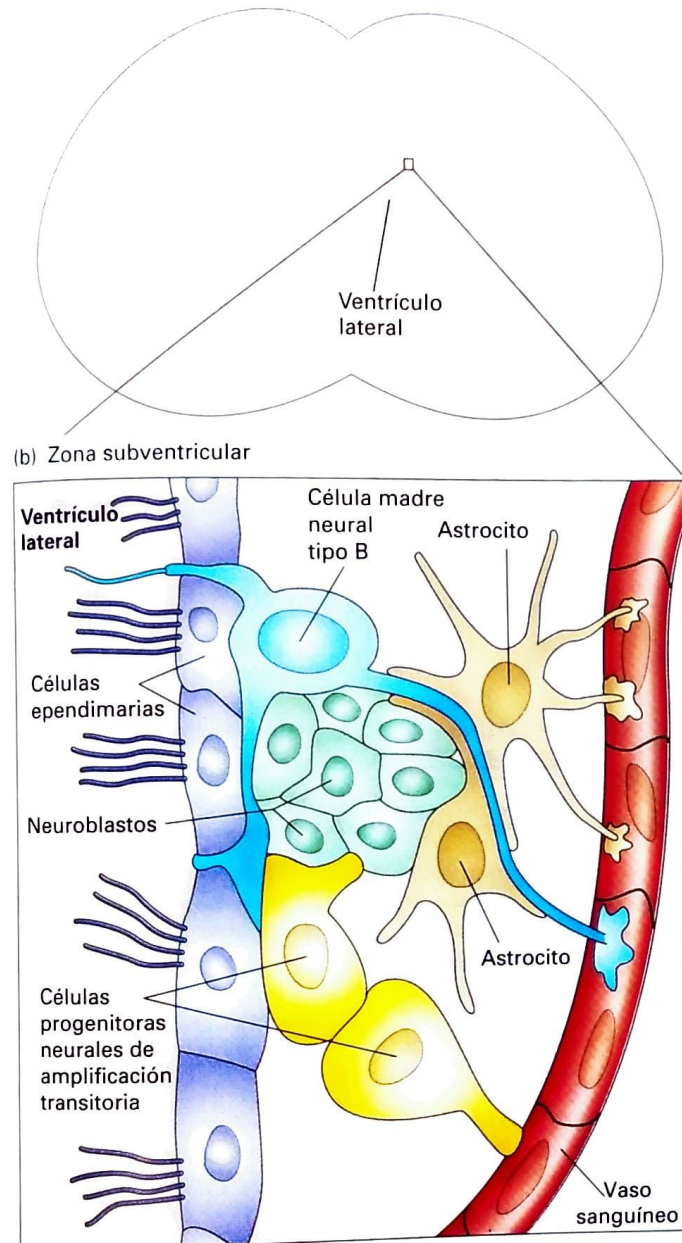


FIGURA 20-17 Nicho de célula madre neural en el cerebro adulto.

(a) Sección transversal del sistema nervioso en desarrollo que muestra los ventrículos laterales, un espacio lleno de líquido dentro del tubo neural. La zona que rodea al ventrículo, llamada la zona subventricular, es el sitio de las células madre neurales a partir del cual emergen los precursores neurales. (b) Tanto en el cerebro embrionario como en el adulto, los diferentes tipos de células madre neurales están localizados en la zona subventricular y se clasifican por su capacidad de autorrenovación y diferenciación, posiblemente representando sus transiciones lineales durante la neurogénesis. Las células madre neurales tipo B expresan el marcador astrocito, la proteína ácida fibrilar glial (GAPF) y se exponen en el ventrículo y contactan los vasos sanguíneos a través de los cilios y los extremos basales, respectivamente. Las células tipo B tienen el potencial de producir células progenitoras neurales en división activa (amplificación transitoria) y estas, subsecuentemente, generan los neuroblastos que se diferenciarán en neuronas. (Adaptado de H. Suh y cols., 2009, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 25:253)

en los animales adultos. Los diversos tipos de células sanguíneas derivan todos de un único tipo de *célula madre hematopoyética (HSC)* multipotente que da origen a células madre progenitoras linfoides y mieloides más restrictivas capaces de autorrenovación limitada (Fig. 21-8). Después de que se forman las HSC, numerosos factores de crecimiento extracelular llamados **citocinas** regulan la proliferación y la diferenciación de las células precursoras para varios linajes de células sanguíneas. Cada rama del árbol genealógico celular tiene diferentes reguladores de citocinas, lo cual permite un control exhaustivo de la producción de tipos celulares específicos. Si se necesitan todas las células sanguíneas, por ejemplo después de una lesión de sangrado, pueden producirse múltiples citocinas. Si se necesita solo un tipo de célula, por ejemplo cuando una persona está viajando a una altitud elevada, el riñón sintetiza **eritropoyetina** y estimula la proliferación y la diferenciación terminal de los precursores de CFU-E pero no de otros tipos de precursores. La eritropoyetina activa diversas vías de transducción de señales intracelulares, lo que lleva a cambios en la expresión génica que promueven la formación de eritrocitos (véanse las Figs. 16-10 y 16-12). De manera similar, G-CSF, una citosina diferente, estimulará la proliferación y la diferenciación de los progenitores bipotentes macrófagos/granulocitos GM-CFC a granulocitos, mientras que M-CSF estimula la producción de macrófagos a partir de la misma célula precursora.

El linaje hematopoyético se elucidó originalmente al inyectar los diversos tipos de células precursoras en ratones cuyas células precursoras habían sido aniquiladas por irradiación. Al observar qué células sanguíneas fueron restauradas en estos experimentos trasplantados, los investigadores pudieron inferir qué precursores o células terminalmente diferenciadas (p. ej., eritrocitos, monocitos) surgieron a partir de un tipo particular de precursor.

Al igual que otras células madre, las HSC residen en un nicho. Un tipo de célula principal en el nicho de la médula ósea es el osteoblasto, las células formadoras de hueso que se localizan en la superficie ósea. Un ligando similar a Delta y proteínas como el factor de célula madre (SCF), producidas por las células del nicho, señalan a los receptores de Notch y SCF en la superficie de HSC. Varios otros pares de factores de crecimiento-receptor también estimulan las HSC, y probablemente otros tipos de células participan en la formación del nicho HSC.

es irresistible considerarlo como una posible antena que recibe señales que de otro modo podrían ser inaccesibles para la célula. Las señales que crean el nicho no están completamente caracterizadas, pero existe evidencia para una combinación de factores, incluyendo los FGF, los BMP, IGF, VEGF, TGF α y BDNF. Las BMP parecen favorecer la diferenciación de los astrocitos sobre la diferenciación neural, un ejemplo del control de la determinación del destino celular que debe permanecer en adecuado equilibrio.

Las células madre hematopoyéticas forman todas las células sanguíneas

Otro tejido continuamente reabastecido es la sangre, cuyas células madre se localizan en el hígado embrionario y en la médula ósea

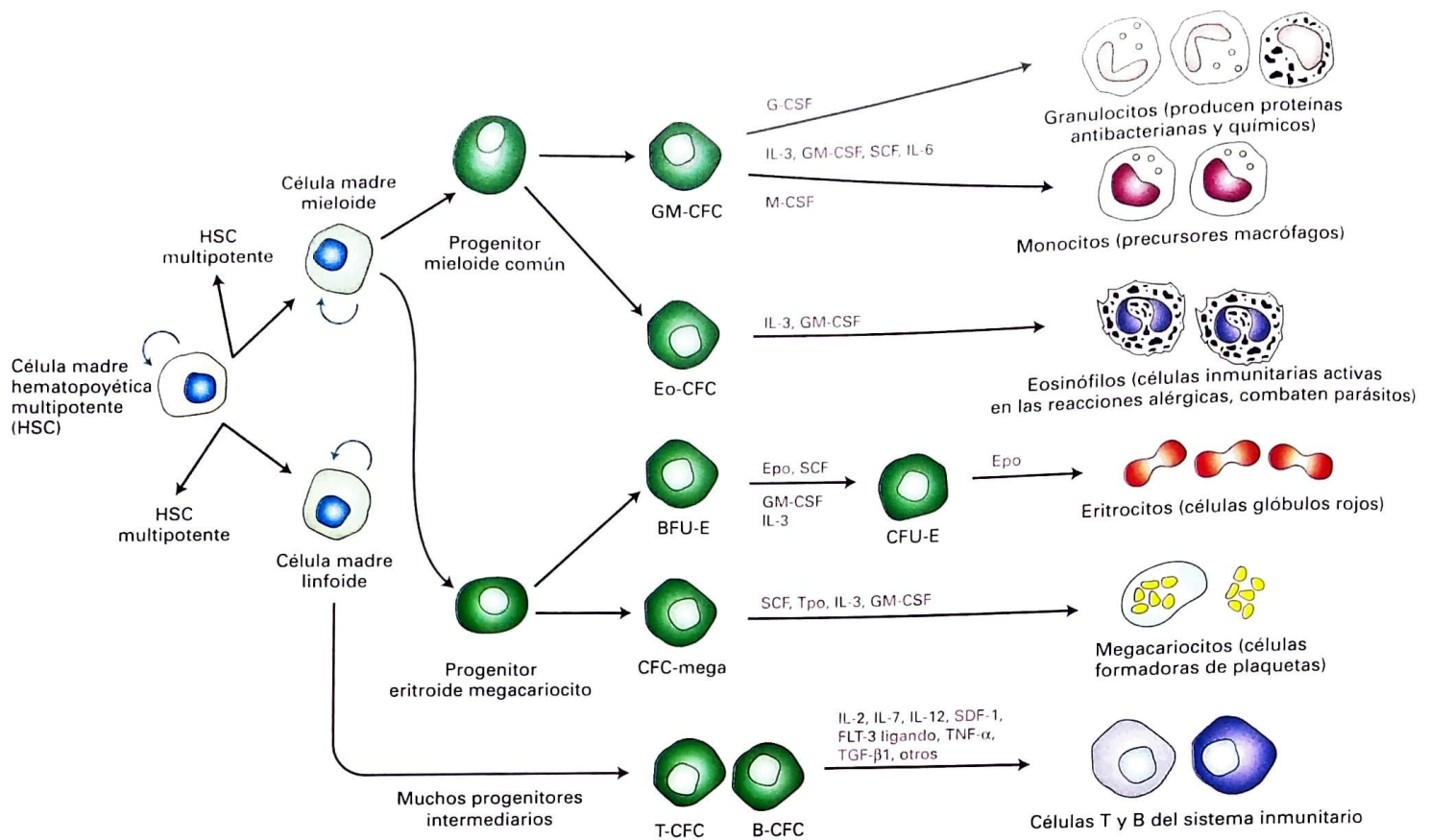


FIGURA 20-18 Formación de las células sanguíneas a partir de células madre hematopoyéticas en la médula ósea. Las células madre hematopoyéticas multipotentes que repueblan a largo plazo pueden dividirse simétricamente para autorregenerarse (flechas curvas azules) o asimétricamente para formar una célula hija que es multipotente como la célula madre progenitora y otra célula hija con capacidad de autorrenovación. En última instancia, esta hija genera células madre mieloides y linfoides; aunque estas células multipotentes son capaces de autorrenovación limitada, están comprometidas a uno de los dos principales linajes hematopoyéticos. Dependiendo de los tipos y cantidades de citocinas presentes, las células madre mieloides y linfoides sufren ciclos rápidos de división celular y generan diferentes tipos de células progenitoras (verde oscuro). Estos progenitores se denominan multipotentes o unipotentes en el sentido en que pueden dar origen a varias o a un único tipo de células sanguíneas diferenciadas,

respectivamente; responden a una o a unas pocas citocinas específicas. Estos progenitores son detectados por sus capacidades para formar colonias que contienen los tipos celulares diferenciados mostrados a la derecha, medidos como células formadoras de colonia (CFC). Las colonias son detectadas por el plaqueo de las células progenitoras en un medio viscoso, formado por un polímero tal como metilcelulosa, tal que todas las células hijas diferenciadas permanezcan localizadas y así puedan formar una colonia. Se indican algunas de las citocinas que avalan este proceso (marcas rosas). GM = granulocito-macrófago; Eo = eosinófilo; E = eritrocito; mega = megacariocito; T = célula T; B = célula B; CFU = unidad formadora de colonia; CSF = factor estimulador de colonia; IL = interleucina; SCF = factor célula madre; Epo = eritropoyetina; Tpo = trombopoyetina. (Adaptado de M. Socolovsky y cols., 1998, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* **95**:6573, y N. Navenstein y cols., 2011, *Cell* **144**:296)

Las células madre hematopoyéticas fueron detectadas y cuantificadas por experimentos de trasplantes de médula ósea (Fig. 21-19). El primer paso en estos experimentos fue la separación de tipos diferentes de precursores hematopoyéticos. Esta clasificación es posible debido a que las células madre hematopoyéticas y cada tipo de progenitor producen combinaciones únicas de las proteínas de la superficie celular que pueden servir como marcadores específicos del tipo de célula. Si extractos de médula ósea son tratados con anticuerpos marcados con fluorocromo para estos marcadores, las células con diferentes marcadores de superficie pueden separarse en un clasificador celular activado por fluorescencia (véanse las Figs. 9-2 y 9-3). Notablemente, tales experimentos de trasplante revelaron que una única HSC es suficiente para restaurar el sistema sanguíneo completo de un ratón irradiado. Después del trasplante, la célula madre ocupa la residencia en un nicho o microambiente en la médula ósea y se divide para formar más células madre y también progenitores de los diferentes linajes sanguíneos.

 El primer trasplante de médula ósea se realizó en 1959, cuando una paciente con leucemia terminal (mortal) fue irradiada para destruir sus células cancerosas. Ella fue transfundida con células de médula ósea de su hermana gemela; así, se evitó una respuesta inmunitaria y la paciente entró en remisión durante tres meses. Este comienzo pionero, que fue galardonado con el premio Nobel de Medicina en 1990, condujo a los tratamientos actuales que pueden llevar a una cura completa de muchos cánceres. Las células madre en la médula trasplantada pueden generar todos los tipos de células sanguíneas funcionales, y los trasplantes son útiles en los pacientes con ciertas enfermedades sanguíneas hereditarias, incluyendo muchas enfermedades sanguíneas como el trastorno de la hemoglobina anemia falciforme, y en pacientes con cánceres que hayan recibido irradiación y quimioterapia. Tanto la quimioterapia como la irradiación destruyen las células de médula ósea, como así también las células cancerosas. ■

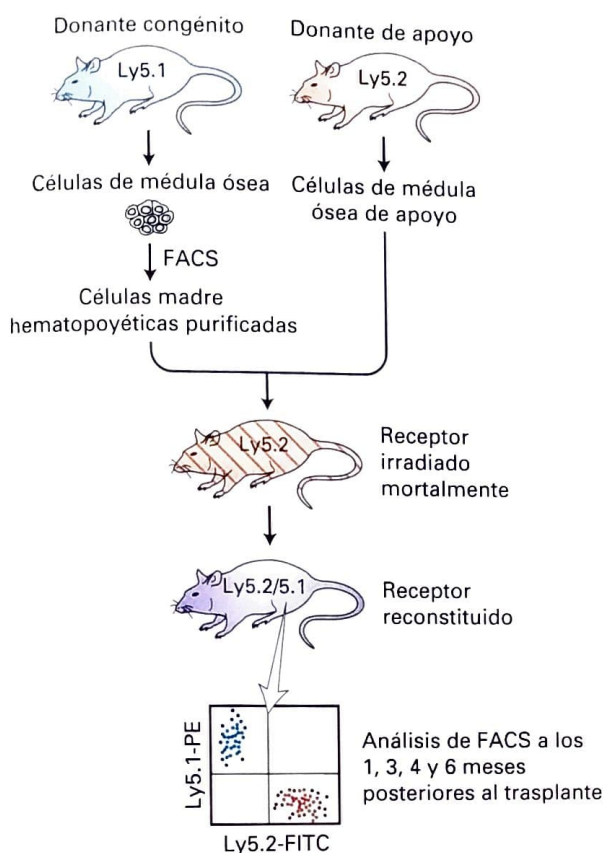


FIGURA EXPERIMENTAL 21-19 Análisis funcional de las células madre hematopoyéticas mediante trasplante de médula ósea. Las dos cepas de ratones son genéticamente idénticas excepto por el gen que codifica una proteína, llamada Ly5, que se encuentra en la superficie de todas las células sanguíneas nucleadas, incluyendo los linfocitos T y B, los granulocitos y los monocitos. Las proteínas codificadas por los dos alelos del gen, Ly5.1 y Ly5.2, pueden ser detectadas por anticuerpos monoclonales específicos. Un ratón receptor Ly5.2 es irradiado mortalmente, luego inyectado dentro de las células madre purificadas a partir de una cepa Ly5.1. Debido a que a las células madre les toma semanas o meses producir células sanguíneas diferenciadas, el ratón receptor morirá a menos que reciba células progenitoras de médula ósea a partir de un ratón genéticamente idéntico (llamada células de “soporte”) que producirán células sanguíneas maduras durante las primeras semanas después del trasplante. A intervalos después del trasplante, se toma sangre o médula ósea y se la hace reaccionar con un anticuerpo monoclonal azul fluorescente contra Ly5.1 y un anticuerpo monoclonal rojo fluorescente contra Ly5.2. Las células sanguíneas maduras que son descendientes de la célula madre donante son detectadas por análisis FACS, vista aquí como células que fluorescen en azul y no en rojo. Estas células pueden ser almacenadas y teñidas con anticuerpos fluorescentes específicos para proteínas marcadoras que se encuentran en diferentes tipos de células sanguíneas maduras para demostrar que una célula madre es en efecto pluripotente, en el sentido que puede generar todos los tipos de células linfoides y mieloides. (Cortesía del Dr. Chengcheng [Alec] Zhang)

La frecuencia de las células hematopoyéticas es de alrededor de 1 célula por 10^4 células de la médula ósea o hepáticas embrionarias. Durante la vida embriogénica, las células madre suelen dividirse simétricamente y producir dos células madre hijas (véase la Fig. 21-18); esto permite que el número de células madre se incremente con el tiempo y se produzca la gran cantidad de células progenitoras que se precisan para sintetizar todas las células sanguíneas necesarias antes del nacimiento. En los animales adultos, las células madre hematopoyéticas son en gran parte quiescentes, “descansando” en el estadio G_0 en el nicho de células madre de la médula ósea. Cuando se necesitan más células sanguíneas, una o más de estas células sufre división asimétrica

y se forma una célula madre como el progenitor y una célula de proliferación rápida que genera los progenitores ilustrados en la Figura 21-18.

Probablemente usted ya haya notado que todos los reguladores moleculares de las células madre son proteínas familiares (véanse los Caps. 15 y 16) en lugar de ser reguladores específicos que se especializan en el control de la célula madre. Cada tipo de señal se utiliza repetidamente para controlar los destinos celulares y el desarrollo. Estos sistemas de señalización son ancestrales, de al menos quinientos millones de años de antigüedad y para los cuales han surgido nuevos usos como células, tejidos, órganos, y animales que han evolucionado nuevas variaciones.

Los meristemos son nichos para las células madre en las plantas



Al igual que en sus contrapartidas (los animales multicelulares), la producción de todos los tejidos y órganos en las plantas se basa en pequeñas poblaciones de células madre. Como las células madre animales, estas células madre están definidas por su capacidad para sufrir autorrenovación y también para atravesar la división asimétrica a fin de generar células hijas que produzcan tejidos diferenciados. Las células madre vegetales residen en microambientes especializados, los nichos de célula madre, donde las señales extracelulares son producidas para mantener a las células madre en un estado multipotente. Pero puesto que las señales que pasan entre las células madre y las de sostén son muy diferentes en estos dos reinos, las células madre y los nichos en las plantas y los animales probablemente evolucionaron por caminos distintos.

Las células madre vegetales se localizan en nichos denominados **meristemos**, que pueden persistir durante miles de años en especies de larga vida, como los pinos de conos erizados. El cuerpo axial de la planta está definido por dos meristemos primarios que se establecen durante la embriogénesis, el **meristemo apical del brote** y el **meristemo apical de la raíz**. Al contrario de los animales, muy pocos tejidos u órganos son específicos durante la embriogénesis vegetal. En su lugar, los órganos como las hojas, las flores e incluso las células germinales se generan continuamente a medida que la planta crece y se desarrolla. La parte de la planta que se encuentra por encima del suelo deriva de los meristemos del brote y la parte por debajo del suelo lo hace de los meristemos apicales de la raíz. La identidad de célula madre es mantenida por la posición celular, en lugar de por el linaje, y las señales intercelulares como las hormonas, los péptidos de señalización móvil y los miRNA.

Las células madre pluripotentes de división lenta se localizan en el ápice del meristemo apical del brote, con más células hijas multipotentes de división rápida de “amplificación transitoria” sobre la periferia. Los descendientes de las células madre del brote están dispuestos en la periferia del meristemo y se reclutan para formar primordios de órganos nuevos, incluyendo hojas y tallos. La división cesa a medida que todas las células adquieren características de tipos celulares específicos, y la mayoría del crecimiento de órganos se produce por la expansión y la elongación celular. Se pueden formar nuevos nichos de células madre del brote en las axilas de los primordios foliares, que luego crecen para formar ramas laterales (Fig. 21-20a). A su vez, los meristemos florales dan origen a los cuatro órganos florales (sépalos, estambres, carpelos y pétalos) que forman las flores. A diferencia de los meristemos apicales del brote, los meristemos florales gradualmente se vacían a medida que dan lugar a los órganos florales.

Los genes necesarios para la identidad, el mantenimiento y la diferenciación celular de la célula madre han sido definidos por búsquedas genéticas para mutantes que presenten meristemos más grandes, más pequeños o sin reposición, y más recientemente, mediante perfiles de expresión génica

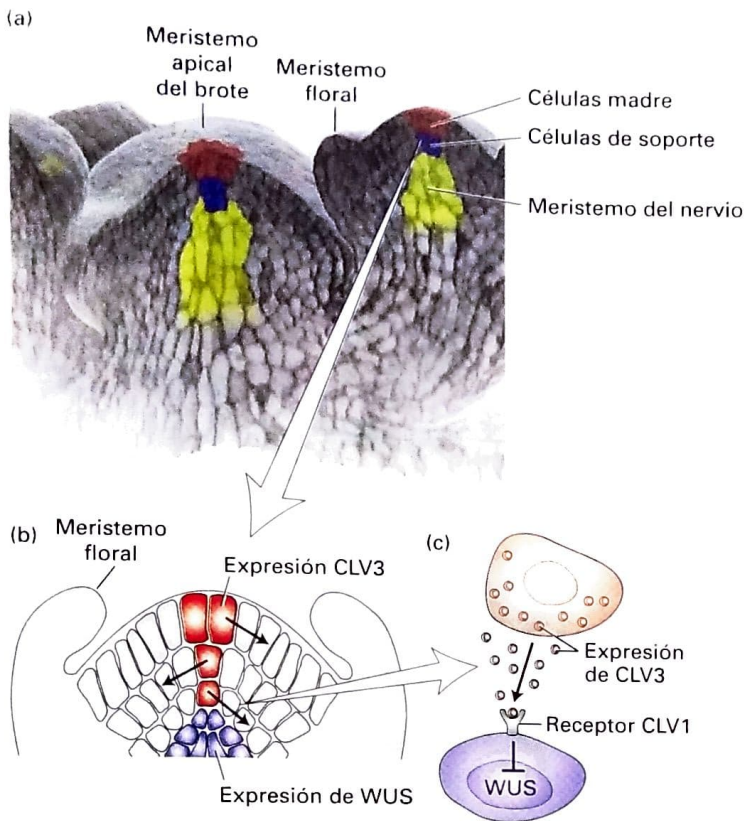


FIGURA 21-20 Estructura física y redes reguladoras en los meristemos apical del brote de *Arabidopsis*. El meristemo apical del brote reproductivo produce brotes, hojas y más meristemo. La producción floral se produce cuando el meristemo cambia desde la producción de hoja/brote a la producción floral, acompañada por un incremento en la cantidad de células de meristemo que forman los meristemos florales, como se muestra aquí. (a) Imágenes tridimensionales de meristemos de brote y meristemos florales basadas en la reconstrucción de imágenes confocales. Las regiones clave de los meristemos están marcadas en colores: rojo para las células madre, violeta para las células de soporte que producen las señales de mantenimiento de célula madre y amarillo para el meristemo marginal. (b) Sección transversal a través del ápice del meristemo y que muestra la expresión de CLV3 en las células madre (rojo) y la expresión de WUS en las células de soporte (violeta). Las células madre producen hijas por división asimétrica en la dirección de las flechas. (c) La proteína CLV3 secretada (esferas rojas) reprime la transcripción de WUS en las células de soporte; el receptor CLV1 y las proteínas asociadas están marcadas. (Parte [a] de Robert Sablowski, 2011, *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**, parte [b] y [c] de Ben Scheres, 2007, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8** 345.)

de poblaciones de células de meristemo aislados. Un determinante del meristemo apical del brote es un gen de factor de transcripción homeodominio llamado *WUSCHEL* (*WUS*). *WUS* es necesario para el mantenimiento de la población de células madre, pero se expresa en las células de soporte que subyacen a las células madre, lo cual sugiere que estas células son análogas a un nicho de células madre en los animales metazoos (Fig. 21-20b). El *WUS* estimula la expresión de *CLAVATA3* (*CLV3*) en las células madre. El *CLV3* codifica un péptido secretado pequeño que a su vez se une al receptor *CLV1* sobre las células de soporte y regula negativamente la expresión de *WUS*. Así, una retroalimentación negativa entre *WUS* y *CLV3* mantiene el tamaño de la población de células madre (Fig. 21-20c). Otras señales, como la hormona vegetal citocinina, también son importantes en la regulación de la expresión de *WUS*. El mantenimiento y la función del meristemo apical de la raíz son en muchos aspectos conceptualmente similares, aunque los genes específicos y las hormonas involucradas son distintos.

Las plantas tienen una capacidad sorprendente para la regeneración. El jardinero hogareño estará familiarizado con la capacidad de los cortes de hoja o tallo de formar raíces con pocos alicientes más allá de un vaso de agua y una ventana soleada. Los experimentos realizados a mediados del siglo pasado demostraron que células únicas aisladas a partir de raíces de zanahoria pueden regenerar plantas enteras cuando son colocadas sobre un medio que contenga la mezcla adecuada de nutrientes y hormonas. Desde entonces, una diferencia principal citada a menudo entre las células vegetales y animales era que todas las células vegetales son totipotentes. Sin embargo, con la capacidad para generar células iPS a partir de las células animales diferenciadas y más recientemente el análisis cuidadoso de las células que contribuyen a la regeneración vegetal, se sugiere que el tejido regenerado surge a partir de poblaciones preexistentes de células madre en lugar de a través de un proceso de dediferenciación, y esta distinción se torna borrosa. ■

CONCEPTOS CLAVES de la Sección 21.2

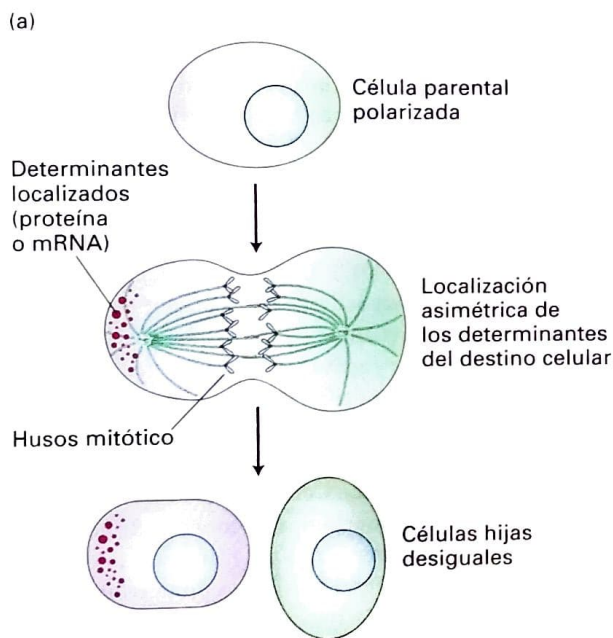
Células madre y nichos en organismos multicelulares

- Las células madre son multipotentes e indiferenciadas; pueden sufrir una autorrenovación tal que sus cantidades permanezcan constantes o se incrementen en el transcurso del tiempo de vida del organismo.
- Las células madre multipotentes se forman en nichos o microambientes que proporcionan señales para mantener una población de células madre no diferenciadas. El nicho debe mantener las células madre sin permitir su proliferación en exceso y debe bloquear la diferenciación.
- Las células madre evitan diferenciarse mediante controles específicos que funcionan en el nicho. Concentraciones altas de β -catenina, un componente de la vía Wnt, han sido implicadas en la preservación de células madre en la línea germinal y en el intestino al dirigir la células hacia la división por autorrenovación en lugar de hacia estados diferenciados.
- Las células de la línea germinal originan los óvulos o los espermatozoides. Por definición, todas las otras células son somáticas.
- En las gónadas del gusano y la mosca, una o unas pocas células forman el nicho de células madre y envían señales directamente a las células madre adyacentes. Las células hijas que no pueden contactar las células de nicho sufren proliferación y diferenciación para formar células germinales (véanse las Figs. 21-9 y 21-10).
- Las poblaciones de células madre asociadas con el epitelio intestinal, el cerebro y muchos otros tejidos regeneran células tisulares diferenciadas que están dañadas, desgastadas o que envejecieron (véanse las Figs. 21-11, 21-15 y 21-18).
- Las células madre intestinales residen en la base de las criptas intestinales, adyacentes a las células de Paneth, que forman parte del nicho y están marcadas por la expresión del receptor Lgr5.
- Las células madre neurales se encuentran en la zona subventricular del cerebro tanto durante el desarrollo como en la edad adulta y generan tanto células nerviosas como gliales (véase la Fig. 21-17).
- En el linaje de las células sanguíneas, se forman y proliferan diversos tipos de precursores bajo el control de citocinas diferentes (véase la Fig. 21-18). Esto permite al cuerpo inducir específicamente el reabastecimiento de algunos, o todos, los tipos necesarios.

• Las células madre vegetales persisten durante la vida de la planta en el meristemo. Las células del meristemo pueden originar una amplia variedad de tipos de células y estructuras (véase la Fig. 21-10).

21.3 Mecanismos de polaridad celular y división celular asimétrica

Ya hemos analizado la importancia de la división asimétrica en la generación de la diversidad celular durante el desarrollo y también cuando las células madre se dividen para originar una célula madre y una célula diferenciada. ¿Qué mecanismos subyacen la capacidad de las células para tornarse asimétricas antes de la división celular para dar origen a las células con distintos destinos? La asimetría celular es un concepto mencionado antes, con el nombre de **polaridad** celular; por lo tanto, primero revisaremos lo que significa para una célula estar polarizada.



La polaridad celular (capacidad de las células para organizar sus estructuras internas, lo que da como resultado cambios en la forma celular y regiones de la membrana plasmática con composiciones proteicas y lipídicas diferentes) se ha analizado en diversos capítulos. Por ejemplo, hemos analizado cómo las células epiteliales polarizadas tienen un dominio apical con microvellosidades abundantes separadas del dominio basolateral por uniones estrechas (véanse las Figs. 17-1 y 20-9). Para funcionar en el transporte epitelial, se requiere que estas células tengan diferentes proteínas transportadoras en las membranas apical y basolateral (Fig. 11-30). Como se indicó antes, no solo las células epiteliales sino esencialmente todas las células en el cuerpo están polarizadas para proporcionar sus funciones fisiológicas. Si una célula polarizada se divide y da origen a dos células hijas diferentes, se dice que han atravesado **división celular asimétrica** (Fig. 21-21a). Así, el establecimiento de la polaridad celular es una parte integral para lograr la división celular asimétrica (una célula debe tornarse polarizada antes de dividirse para poder originar dos células hijas diferentes).

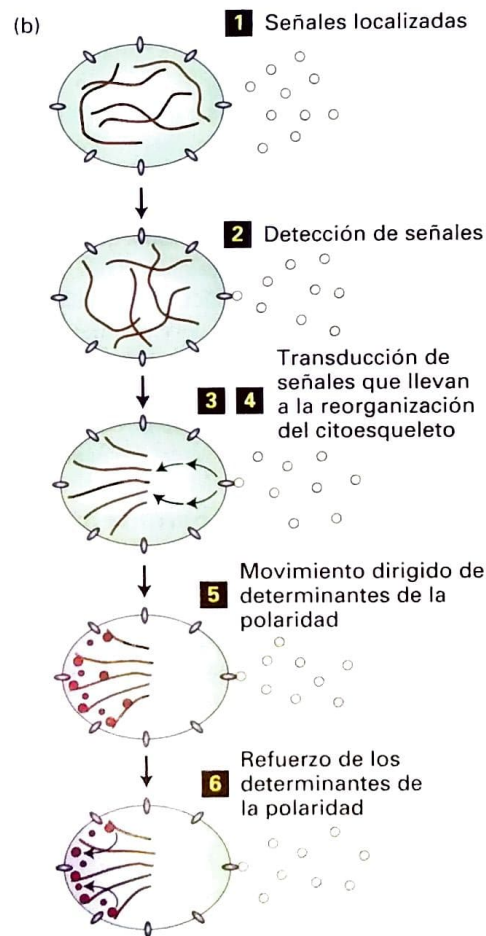


FIGURA 20-21 Características generales de la polaridad celular y la división celular asimétrica. (a) La polaridad celular requiere determinantes específicos, incluyendo mRNA, proteínas y lípidos, para ser localizados específicamente en una célula. Si el huso mitótico se posiciona de manera tal asimétricamente durante la división celular, las dos células hijas tendrán diferentes determinantes de destino celular. Sin embargo, si el huso mitótico no está orientado adecuadamente, los determinantes no se segregarán correctamente y las células hijas podrían tener el mismo destino (no se muestra). (b) Jerarquía general de los pasos en la generación de una célula polarizada. Para conocer en qué orientación se polariza, las células se exponen a una señal espacial (1). Las células necesitan tener receptores u

otros mecanismos para medir la señal (2). Después de detectar la señal, las vías de transducción de señal (3) regulan el citoesqueleto (microtúbulos y microfilamentos, dependiendo del sistema) para reconocerlos de la manera polarizada adecuada (4). El citoesqueleto polarizado proporciona el marco para el transporte del tráfico de membrana de orgánulos y complejos macromoleculares, incluyendo determinantes del destino y de la polaridad, en la célula (5). En muchos casos, la polaridad está reforzada por el retorno de los determinantes de polaridad que se han movido desde el sitio de polarización. En casos donde los determinantes son proteínas de membrana, este ciclo de refuerzo involucra la captación por endocitosis y la distribución a los sitios de polarización (6).

La polarización celular y la asimetría antes de la división celular siguen una jerarquía común

La polarización de una célula, si se polariza con o sin división celular, sigue un patrón general, esquematizado en la Figura 21-21b. Para poder saber en qué dirección se polariza o se torna asimétrica, una célula debe disponer de señales específicas que le proporcionen información espacial (paso 1). Como veremos, tales señales pueden ser factores solubles localizados o señales de otras células o de la matriz extracelular. Para ser receptivas a estas señales, las células tienen receptores adecuados sobre sus superficies u otra maquinaria para percibir las señales (paso 2). Una vez que se han detectado las señales, la célula tiene que responder adecuadamente mediante procesamiento de la señal entrante en información espacial a fin de definir la orientación de la polaridad (paso 3). En general, el siguiente paso involucra la reorganización local de los elementos del citoesqueleto, en especial microfilamentos y microtúbulos (paso 4). Ahora que la célula tiene asimetría estructural, los motores moleculares dirigen el tránsito de los factores de polaridad que, dependiendo del sistema, pueden ser proteínas citoplasmáticas o proteínas de membrana sintetizadas por la vía secretora hasta sus localizaciones adecuadas (paso 5). Como veremos, en el caso de muchas células polarizadas, la polaridad a menudo puede ser reforzada o mantenida a través de la concentración de los determinantes de polaridad mediante el movimiento de ellos desde sitios de menor concentración de regreso al sitio polarizado (paso 6).

En la siguiente sección, analizaremos una única célula que exhibe asimetría (una célula de levadura durante el apareamiento). En las últimas secciones, regresaremos a las células animales, en las cuales las proteínas de polaridad conservada son instrumentales en la interpretación de las señales de polaridad y en la generación de asimetría celular antes de la división celular. Luego se describirá cómo estas proteínas de la polaridad son utilizadas para polarizar células epiteliales; por último, se analizarán aspectos de la división asimétrica en las células madre.

El tráfico de la membrana polarizada permite a las levaduras crecer asimétricamente durante el apareamiento

Una de las formas más simples y mejor estudiadas de la asimetría celular se produce cuando las células de levadura de gemación se aparean (véase la Fig. 16-23). Las levaduras pueden existir en un estado haploide (una copia única de cada cromosoma) o diploide (dos copias de cada cromosoma). El estado haploide puede existir en cualquiera de los dos tipos de apareamiento ("sexos"), denominados α o a . El estado preferido de la levadura en la naturaleza es el diploide; por ende, las células a siempre buscan aparearse con células α para restaurar dicho estado. Cada tipo de célula haploide secreta una feromona de apareamiento específica (las células a secretan el factor a y las células α secretan el factor α) y cada una expresa sobre su superficie un receptor que mide la feromona del tipo de apareamiento opuesto. Por lo tanto, las células a tienen un receptor para el factor α y las células α tienen un receptor para el factor a . Cuando se colocan células de tipo de apareamiento opuesto cerca una de otra, los receptores de cada tipo celular unen y detectan la señal de feromona de la otra célula y determinan su concentración espacialmente más elevada para poder conocer en qué dirección aparearse. Cuando las células detectan el factor de apareamiento opuesto, ocurren dos procesos importantes. Primero, sincronizan sus ciclos celulares al detenerse en G_0 de manera tal que, cuando ellas se

aparean, los dos genomas haploides se encuentren en la misma etapa del ciclo celular. Segundo, dirigen el crecimiento celular en la dirección de la feromona para ensamblar una proyección de apareamiento denominada "shmoo" (caricatura con forma de bolo). Si las células de tipo de apareamiento opuesto con esta prolongación se tocan, se fusionarán en los extremos shmoo y luego se juntarán los núcleos haploides para restaurar el estado diploide. En condiciones de abundancia de nutrientes, proliferan las células de levadura diploides. Sin embargo, en condiciones de inanición, sufrirán meiosis para formar las esporas haploides resistentes al estrés. Cuando los nutrientes retornan, las esporas germinan y las células haploides proliferativas pueden crecer y luego aparearse para restaurar el estado diploide.

Al buscar mutantes de levadura que no pueden formar esa proyección shmoo en respuesta a la feromona de apareamiento opuesto, los investigadores identificaron cómo es necesario el crecimiento asimétrico para que se produzca la formación de shmoo (Fig. 21-22). Como era de prever, este mecanismo inicialmente involucra una vía de transducción de señal que establece un citoesqueleto polarizado que, a su vez, guía el tráfico de membrana hacia la ubicación apropiada para el crecimiento asimétrico. La activación del receptor del factor de apareamiento (una proteína G típica-acoplada a receptor) (véase la Fig. 15-15) resulta en la acumulación y la activación localizada de la pequeña GTPasa Cdc42 en la región del citoplasma cercana a la fuente de feromona (Fig. 21-22, paso 1). Como se describió en el Capítulo 17, pequeñas GTPasas de la familia Rho, de la cual la Cdc43 es un miembro, regula el ensamblaje del citoesqueleto de actina (véanse las Figs. 17-42 y 17-43). Esta GTPasa existe como la forma inactiva Cdc42-GDP y puede ser activada por un factor específico de intercambio de nucleótido de guanina (GEF) a la forma activa Gdc42-GTP. En la forma activa, se une y activa las moléculas efectoras. Durante el apareamiento, la activación del receptor lleva al reclutamiento localizado y a la activación del GEF para la Cdc42, y proporciona así Cdc42-GTP activa localizada. Esta Gdc42-GTP lleva a la activación local de una proteína formina (paso 2). Como hemos analizado en el Capítulo 17, las proteínas forminas nucleas el ensamblaje de filamentos de actina polarizados, con el extremo (+) del filamento que permanece unido a la formina (véase la Fig. 17-13). Esto proporciona las pistas para el transporte de vesículas secretoras por un motor de miosina V en los extremos (+) de los filamentos para el crecimiento localizado y, por ende, la formación de las shmoo (paso 3). Nótese que este mecanismo requiere la acumulación de proteínas de polaridad, las cuales incluyen a la Cdc42-GTP, y que permanezcan concentradas en la punta shmoo en crecimiento. Para asegurar que esta polaridad se mantenga durante el crecimiento shmoo, se cree que existe un ciclo endocítico dirigido. En este ciclo, la Cdc42 que se ha difundido y se mueve alejándose del sitio de polarización es internalizada por endocitosis y transportada de regreso al extremo shmoo, lo cual refuerza así la polaridad (paso 4).

Las proteínas Par dirigen la asimetría celular en el embrión nematodo

El gusano nematodo, *Caenorhabditis elegans*, ha proporcionado un poderoso sistema modelo para comprender el desarrollo. La razón por la cual se lo seleccionó para estudio es que el animal es transparente, tiene un ciclo de vida rápido, excelente genética y el linaje de células desde el embrión de una única célula hasta el adulto de 959 células somáticas es invariable (Fig. 21-23a, c). Un aspecto crucial de

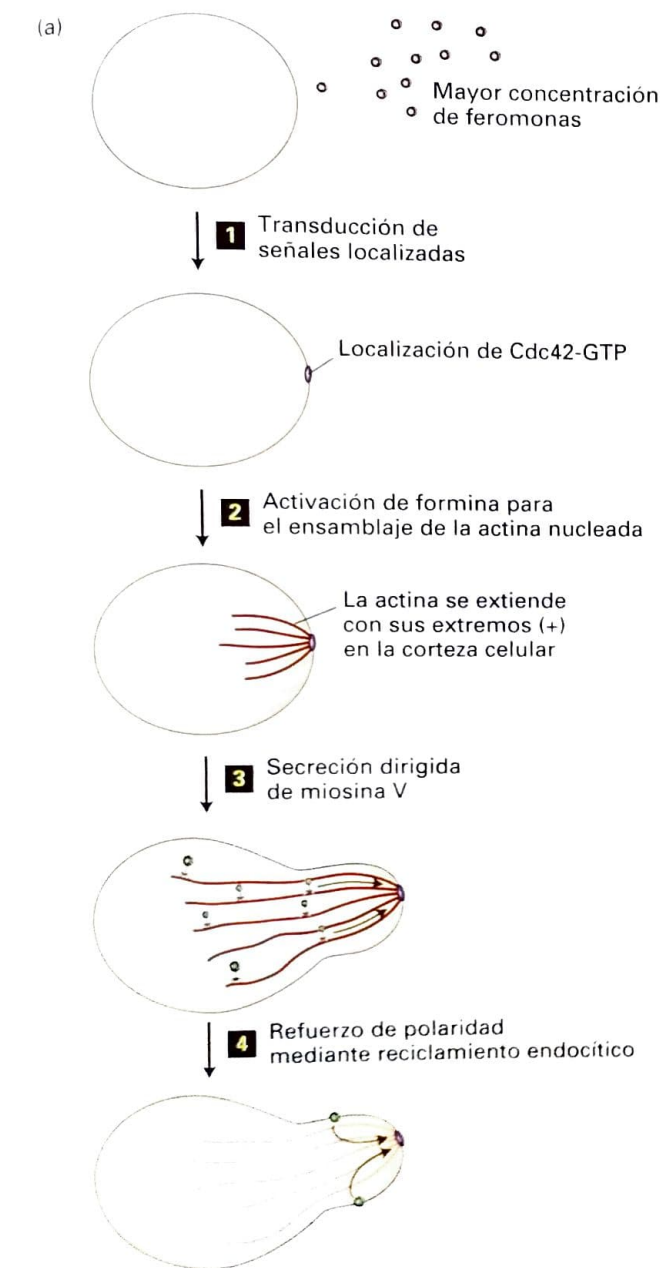


FIGURA 21-22 Mecanismos de formación de las prolongaciones shmoo en levaduras.

(a) La célula de levadura haploide necesita crecer en dirección de la mayor concentración de factor de apareamiento, de manera tal que tiene un receptor sobre su superficie que le indica a la célula la dirección de mayor concentración. Esta señal induce la localización y activación de la pequeña GTPasa, Cdc42, para generar una concentración de Cdc42-GTP en este sitio (1). La GTP Cdc42 activa localmente una formina hasta nuclear y elongar los filamentos de actina a partir de este sitio (2). Debido a que las forminas se unen al extremo (+) de los filamentos de actina, este extremo está orientado hacia el Cdc42-GTP y hacia la mayor concentración del factor de apareamiento. Un motor de miosina V transporta vesículas secretoras a lo largo del filamento de actina, lo que da como resultado el crecimiento de los shmoo (3). La polaridad del shmoo está reforzada por un ciclo endocítico que constantemente retorna los factores de polaridad que se difunden, como Cdc42, a lo largo de los filamentos de actina hasta el sitio de polarización (4). (b) Imagen por microscopía óptica DIC de una célula de levadura formando un shmoo.

(De http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Shmoo_yeast_5_cervevisiae.jpg)

este linaje es la primera división celular, donde la célula P0 (el huevo fecundado, o cigoto) da origen a las células AB y P1 mediante una división celular asimétrica, y cada una de estas células origina diferentes linajes. Se conoce mucho acerca de esta primera división asimétrica, en la cual nos fijaremos.

Antes de la primera división celular, el cigoto es asimétricamente visible: los complejos citoplasmáticos llamados gránulos P están concentrados en el extremo posterior de la célula (Figs. 21-23b). Resulta que, durante las siguientes divisiones celulares, estos gránulos P siempre se concentran en células que finalmente se convertirán en línea germinal, donde en última instancia cumplen una función importante en el desarrollo de la línea germinal. Como se mencionó antes, la primera división asimétrica de la célula P0 origina la célula P1 y la célula AB más grande. A continuación, en la etapa de dos células, los husos mitóticos están dispuestos en ángulos rectos entre sí de manera tal que las consiguientes divisiones celulares también están en ángulos rectos entre sí (Fig. 21-24a). Para comenzar a comprender cómo se produce esta primera división asimétrica esencial, se identificaron mutaciones en seis genes diferentes que dan como resultado una primera división simétrica. Puesto que los gránulos P no se particionan de manera correcta en estos mutantes, los genes identificados en este estudio se denominaron partición defectuosa, o genes *par*. En estos mutantes, los gránulos P no se localizan adecuadamente en preparaciones para la segunda división (Fig. 21-24a). Un indicio clave provino cuando se localizaron los productos de los genes *par*, llamados las proteínas Par. En los cigotos de tipo silvestre, muchas de las proteínas Par se localizaban ya sea en la corteza de la mitad anterior de la célula o en la corteza de la mitad posterior. Por ejemplo, Par3 (como parte de un complejo más grande, comprende Par3, Par6 y aPKC [una proteína cinasa C atípica]) localizada anteriormente, mientras que Par2 y Par1 se localizan en la parte posterior (Fig. 21-24b). Un trabajo posterior ha demostrado que existen interacciones antagonistas entre estos complejos proteicos; es decir, si el complejo Par3, Par6, aPKC se localiza en una región, se excluye a Par2 y viceversa. Esto se demuestra por el hallazgo de que el complejo Par3, Par6, aPKC se disemina sobre toda la corteza en los mutantes *par3* o *par6*. La naturaleza molecular de este antagonismo no se comprende por completo, pero parte de esta es mediada por la proteincinasa aPKC, que fosforila a Par2 para inhibir su capacidad de unirse a la corteza anterior.

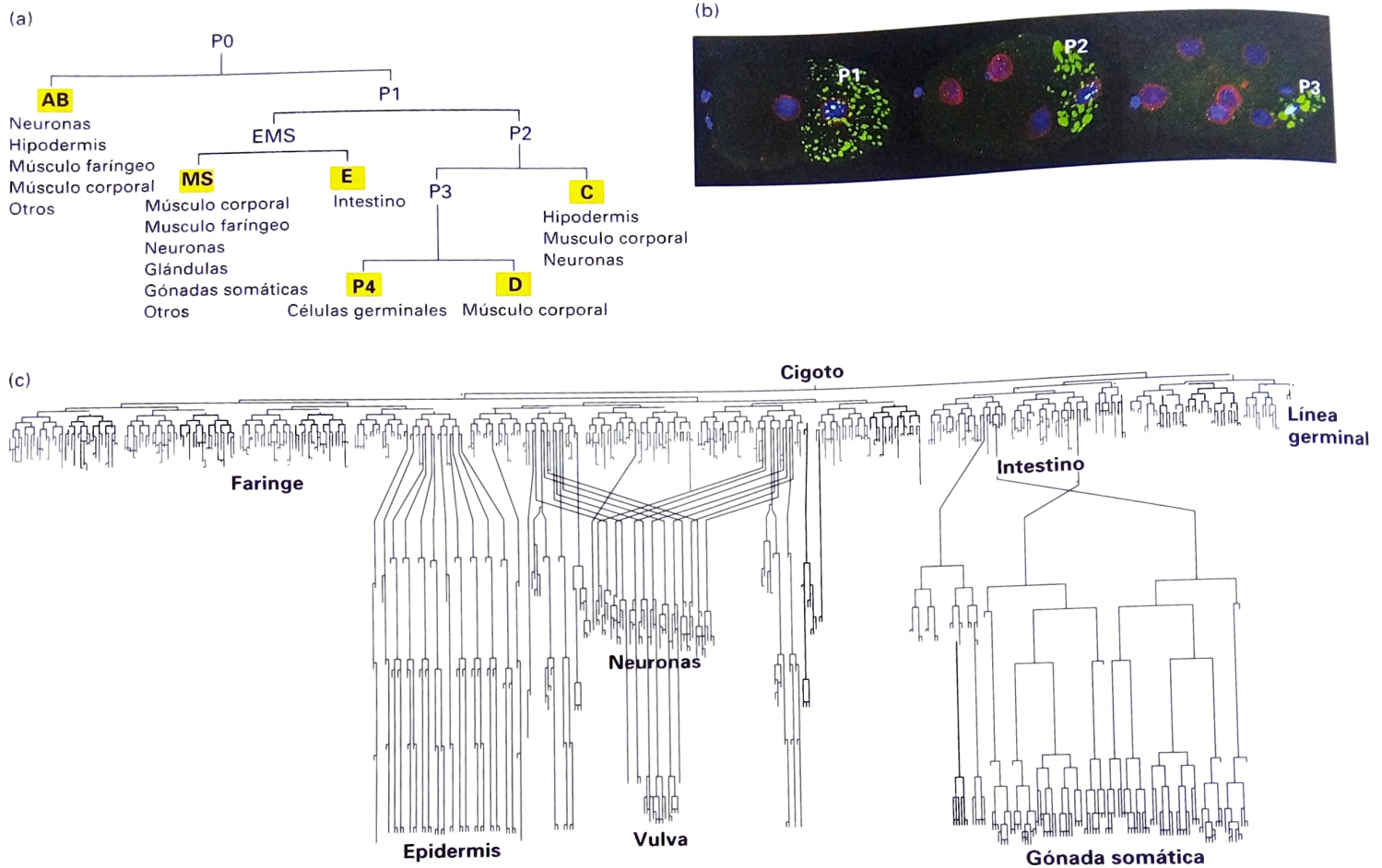
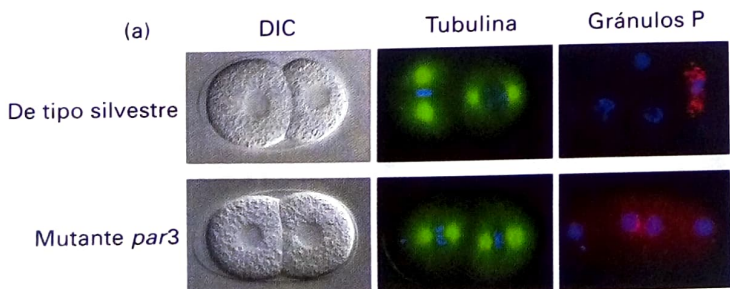


FIGURA 21-23 Linaje celular en el gusano nematodo *C. elegans*. (a) Patrón de las primeras pocas divisiones, comenzando con P0 (el cigoto) y llegando a la formación de las seis células fundadoras (resaltadas en amarillo). La primera división se denomina así porque da origen a la mayoría del endodermo y el mesodermo. El linaje P4 da origen a las células de la línea

germinal. (b) Microfotografías de embriones de dos, cuatro y ocho células con DNA teñido en azul, la envoltura nuclear en rojo y gránulos P en verde. Se indican las células P1, P2 y P3, que darán origen a la línea germinal. (c) El linaje completo del cuerpo entero del gusano, que muestra algunos de los tejidos formados. (Parte [b] de Susan Strome y Dustin Updike.)



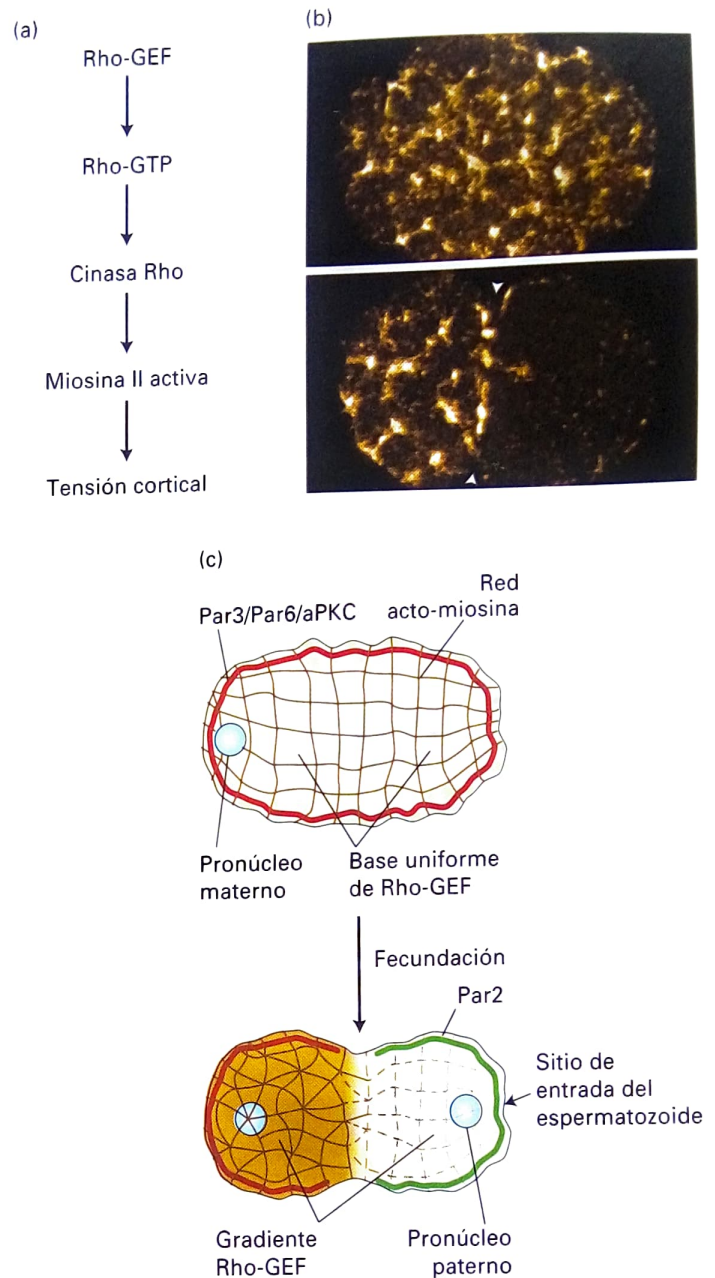
(b)



FIGURA EXPERIMENTAL 21-24 Las proteínas Par se localizan asimétricamente en el embrión de gusano de una célula. (a) Imágenes DIC de embriones de tipo silvestre y mutante *par3*. Nótase que, en las células de tipo silvestre, la célula AB es más grande que la célula P1, mientras que en el mutante *par3* también tiene

un defecto en la orientación del huso y la segregación del gránulo P (rojo). El DNA se tiñe de azul. (b) Localización complementaria del complejo Par anterior (Par3, Par6, aPKC) (rojo) y determinantes posteriores (verde) en el embrión de una célula. (Partes [a] y [b] cortesía de Diane Morton y Kenneth Kemphues.)

FIGURA 21-25 Mecanismos de segregación del complejo Par anterior en un embrión de gusano de una célula. (a) Antes de la fecundación, la corteza celular está bajo tensión debido a la actividad de Rho-GEF, el factor de intercambio para la pequeña GTPasa, Rho. Rho-GTP activa a Rho cinasa, que fosforila la cadena ligera reguladora de la miosina II para activarla. Junto con los filamentos de actina, la miosina II activa mantiene tensión en la corteza celular. (b) La localización de la miosina II antes (*parte superior*) y después de la fecundación (*parte inferior*). El asterisco marca la región de entrada del espermatozoide. (c) Antes de la fecundación, a medida que el Rho-GEF se activa uniformemente, la corteza está bajo tensión a partir de la miosina II activa, y el complejo Par anterior (Par3/Par6/aPKC) está distribuido uniformemente alrededor de la corteza. Con la fecundación del espermatozoide, el Rho-GEF se reduce localmente, de manera tal que la actina-miosina II se contrae hacia el futuro extremo anterior, moviendo el complejo anterior Par con él. Una vez que el complejo anterior está localizado, los factores tales como Par2 se asocian con la corteza celular posterior. (Parte [b] de E. Munro y cols., 2004, *Dev. Cell* 7:413-424; recuadro [c] modificado de D. St. Johnston y J. Ahringer, 2010, *Cell* 141:757-774.)



¿Qué define la orientación de la asimetría en el embrión de una célula? Resulta que la asimetría está definida por el sitio de entrada del espermatozoide, que se convierte en el extremo posterior. Antes de la entrada del espermatozoide, la corteza completa del huevo se encuentra bajo tensión proporcionada por una red de actina que contiene miosina II activa (Fig. 21-25). Como se analizó en el Capítulo 17, la miosina II puede formar filamentos bipolares que tiran de los filamentos de actina para generar tensión, como también se observa en el músculo y el anillo contráctil. La actividad de la miosina II está regulada por una vía de transducción de señales que involucra la pequeña GTPasa Rho (véase la Fig. 17-42). En el huevo no fecundado, Rho se mantiene en su estado activo Rho-GTP mediante la distribución uniforme de su activador, el factor de intercambio de nucleótido Rho-GEF. Rho-GTP activa la cinasa Rho, que fosforila la cadena ligera de la miosina II para activarla (Fig. 21-25a). La entrada del espermatozoide produce la pérdida local de Rho-GEF, necesaria para mantener a Rho activa. Por ende, la entrada del espermatozoide define la región posterior mediante el agotamiento del factor Rho-GEF, lo que de esta manera disminuye la miosina II activa. Con esta reducción local en la actividad contráctil, la red de actomiosina se contrae hacia la parte anterior (Fig. 21-25b) y, a medida que realiza esto, arrastra (de una forma desconocida) el complejo anterior que contiene Par3, Par6 y aPKC hacia ese extremo (Fig. 21-25c). Con la eliminación del complejo anterior, Par2 ahora puede ocupar la corteza posterior y se establece la asimetría celular.

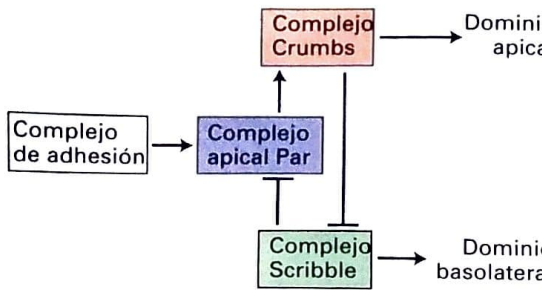
Resulta que otro componente, Cdc42, es necesario para mantener la asimetría inicial inducida por la contracción actomiosina. La forma activa de esta GTPasa, la Cdc42-GTP, une Par6 y es necesaria para el mantenimiento del complejo en el extremo anterior, aunque el mecanismo para esta localización aún no está claro. Un trabajo reciente también ha implicado un ciclo de refuerzo endocítico, como el analizado para la formación de la prolongación shmoo de levadura, para mantener la polaridad. Por lo tanto, los pasos para responder a una señal, establecer la asimetría y mantenerla son características conservadas en ambos sistemas.

Las proteínas Par y otros complejos de polaridad están involucrados en la polaridad de la célula epitelial

En los invertebrados, las células epiteliales polarizadas utilizan señales de células adyacentes y de la matriz extracelular para orientar sus ejes de polarización. El proceso de polarización es bastante similar en las células epiteliales de los vertebrados y la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*. Gran parte de nuestro conocimiento proviene del sistema de la mosca debido a la facilidad con que se pueden aislar y analizar los mutantes.

Las búsquedas genéticas en la mosca han descubierto múltiples genes necesarios para la generación de polaridad celular epitelial. El

(a)



(b) Microvellosidades (c)

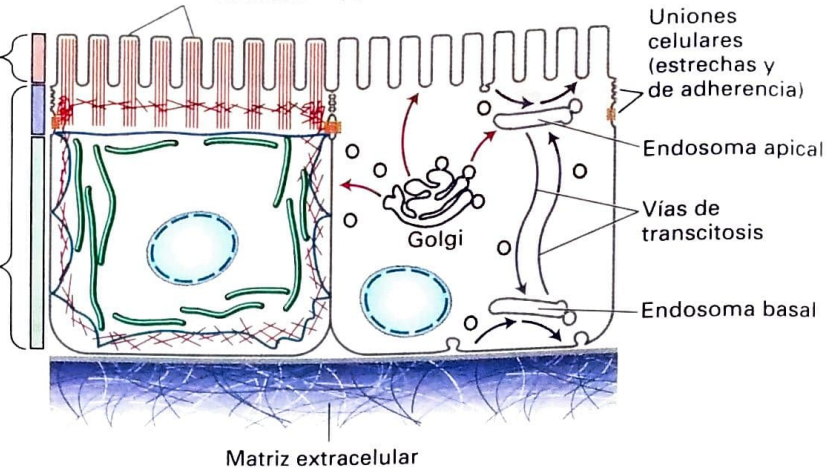


FIGURA 21-26 El establecimiento de la polaridad en las células epiteliales. (a) La determinación de la polaridad en las células epiteliales también es conducida por el complejo Par apical. Las interacciones antagonistas e intrincadas del complejo Par con el complejo basal Scribble y el complejo Crumbs apical conducen al establecimiento y mantenimiento de la polaridad de célula epitelial. La localización de diferentes complejos en los dominios de membrana está indicada por las barras coloreadas, con el complejo Scribble en asociación con la membrana lateral, el complejo

Par apical con la región en las uniones celulares y el complejo Crumbs inmediatamente apical al complejo Par. La polaridad epitelial funcional es mantenida tanto por (b) un citoesqueleto polarizado como por (c) las vías de tráfico de membrana. En la vía biosintética, las proteínas y los lípidos destinados para los dominios basolateral y apical se almacenan en el complejo de Golgi y son transportadas a sus respectivas superficies (flechas rojas). Las vías endocíticas (flechas azules) regulan la abundancia de proteínas y lípidos sobre cada superficie y las clasifica entre superficies por transcitosis.

análisis de los fenotipos de los mutantes y las proteínas codificadas por estos genes ha identificado tres grupos principales de proteínas: el complejo de Par3, Par6 y aPKC (en este sistema conocido como *complejo Par apical*), los complejos Crumbs y el complejo Scribble. Por análisis extensivo de los efectos de estos complejos el uno sobre el otro cuando faltan los componentes individuales, se ha logrado una interpretación general de sus contribuciones a la polarización de la célula epitelial, aunque una comprensión molecular detallada aún está en progreso (Fig. 21-26a).

El primer paso conocido en la polarización de la célula epitelial es la interacción entre células adyacentes, que en las células de vertebrado es a través de la nectina, una molécula de adhesión celular en la superfamilia de Ig, y una proteína de unión llamada JAM-A. Estas interacciones indican a las células reclutar el complejo Par y ensamblar uniones estrechas y de adherencia (véase la Fig. 20-1). El complejo Par es reclutado de forma más apical que el complejo Scribble, y el complejo Scribble define la superficie basolateral. En ausencia del complejo Par, las células no pueden polarizarse, y es, como en el embrión de nematodo, el regulador maestro de la polaridad celular. En ausencia del complejo Scribble, el dominio apical se expande en gran medida, mientras que en ausencia de Crumbs, se reduce en gran medida. Esto ha llevado a la idea de que existen relaciones antagónicas entre estos complejos, con el complejo Crumbs apical que antagoniza con el complejo Scribble basolateral (véase la Fig. 21-26a). Así como en el caso del embrión de gusano, la asimetría está mediada por los complejos que funcionan antagónicamente uno con otro.

En una manera que se comprende solo parcialmente, esta disposición de proteínas de polaridad reorganiza el citoesqueleto, con organizaciones distintivas de los microfilamentos que constituyen las membranas apical y basolateral. Los microtúbulos son más bien inusuales en su distribución, con microtúbulos laterales que orien-

tan sus extremos (–) hacia el dominio apical y otros que corren perpendicular a los microtúbulos laterales debajo de las microvellosidades y también a lo largo de la base de la célula (Fig. 21-26b); se desconoce cómo se establecen estos ordenamientos. El tráfico de membrana también está polarizado (Fig. 21-26c). Las proteínas de membrana recién sintetizadas destinadas a las membranas apicales y basolateral son clasificadas y empaquetadas en diferentes vesículas de transporte en la red trans-Golgi (TGN) y luego, transportadas hacia la superficie apropiada. Además, las vías endocíticas tanto de las superficies basolateral como apical transportan proteínas mal clasificadas utilizando un conjunto complejo de endosomas de clasificación.

En las búsquedas genéticas para componentes adicionales importantes para la polaridad celular epitelial en la mosca, se encontraron componentes del tráfico de endocitosis. Por ejemplo, uno de tales mutantes afecta el tráfico de la proteína transmembrana apical Crumbs, de manera tal que cuando la endocitosis está comprometida, la concentración de Crumbs sobre la superficie se eleva y el dominio apical se expande. Por lo tanto, la polaridad epitelial involucra la respuesta a señales espaciales y la reorganización del citoesqueleto que proporciona un marco tanto para la vía secretora como para el tráfico de membrana endocítico a fin de establecer y mantener el estado de polaridad.

La vía de polaridad celular plana orienta las células dentro del epitelio

Hasta ahora, solo hemos analizado la asimetría en una dimensión, pero en muchos casos las células están polarizadas en al menos dos direcciones (de arriba hacia abajo y de adelante hacia atrás). Tal

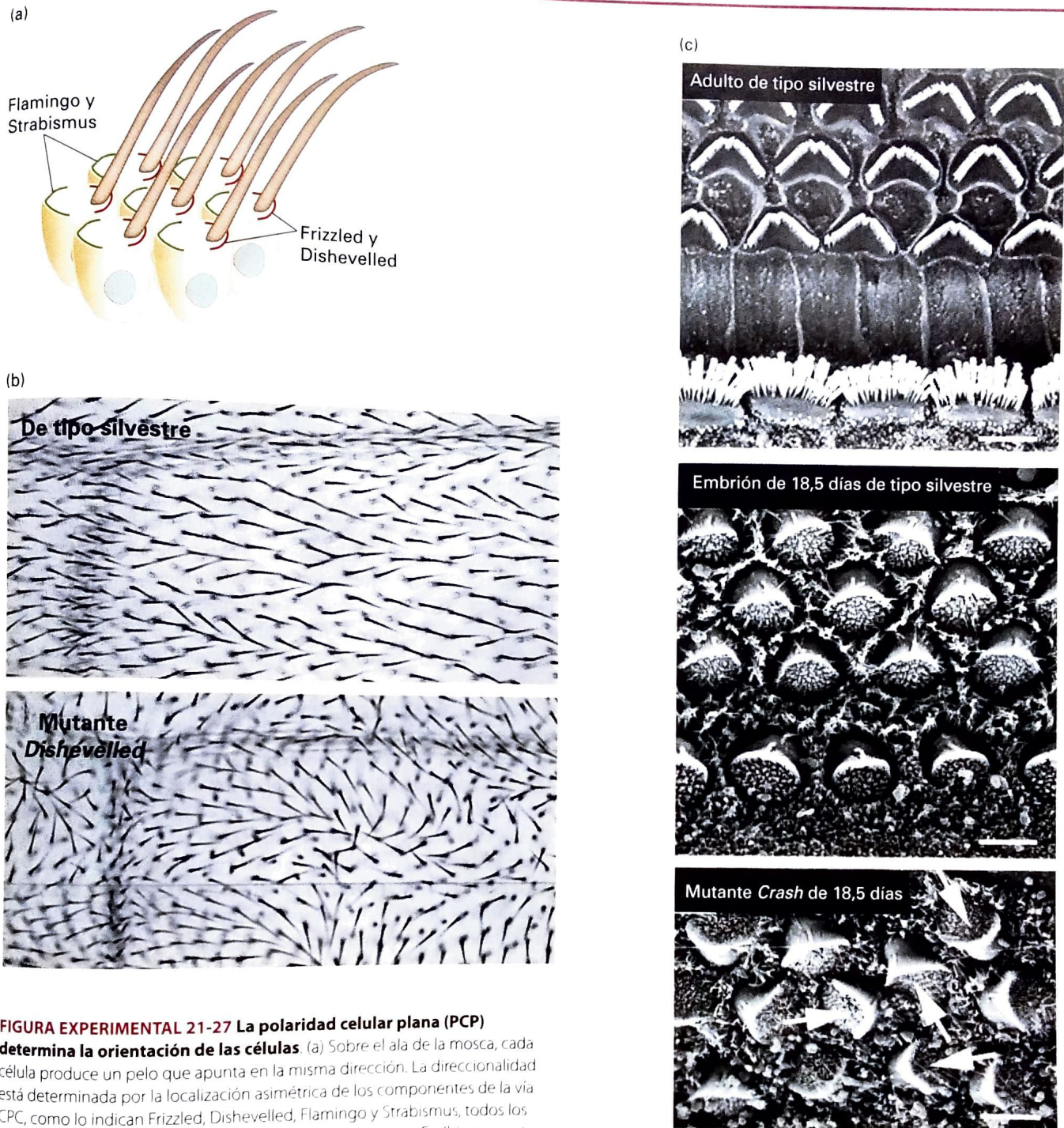
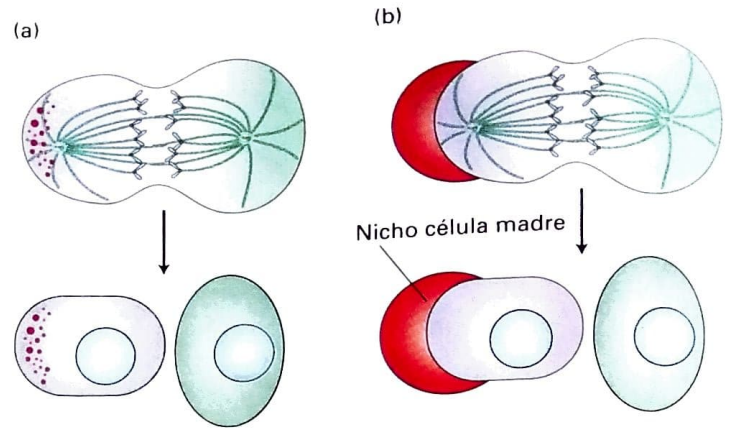


FIGURA EXPERIMENTAL 21-27 La polaridad celular plana (PCP) determina la orientación de las células. (a) Sobre el ala de la mosca, cada célula produce un pelo que apunta en la misma dirección. La direccionalidad está determinada por la localización asimétrica de los componentes de la vía CPC, como lo indican *Frizzled*, *Dishevelled*, *Flamingo* y *Strabismus*, todos los cuales son necesarios para orientar el pelo adecuadamente. En (b) se muestran ejemplos de la distribución de los pelos en una mosca de tipo silvestre y el mutante *Dishevelled*. Nótese que, en el mutante, las células del ala parecen normales excepto los pelos que no están orientados de manera correcta. (c) Las células ciliadas sensitivas del oído interno de vertebrados tienen una disposición en forma de V de los esterocilios sobre sus superficies. En el adulto y en el embrión de 18 días, todas las células están orientadas exactamente de la misma forma. En un mutante murino *Crash* (el homólogo de vertebrado de *Flamingo*) defectuoso en PCP, las células en el embrión de 18 días parecen normales, pero sus orientaciones relativas están interrumpidas (flechas). (Partes [a] y [b] modificadas de J. D. Axelrod y C. J. Tomlin, 2011, *Wiley Interdisc. Revs. Sys Biol Med* **3**:588-605, parte [c] de M. Fanto y cols., 2004, *J. Cell Sci.* **117**:527-533.)

como las escamas en los peces, las plumas de las aves o los pelos en su brazo, está claro que los grupos de células que dan origen a estas estructuras deben estar organizados en un esquema de adelante hacia atrás, además de arriba hacia abajo. Este tipo de polaridad se denomina *polaridad celular plana (PCP)*. Un ejemplo bien estudiado a partir de la mosca es el único pelo que apunta hacia atrás sobre cada célula del ala de la mosca (Fig. 21-27a). Como hemos visto, la mosca

FIGURA 21-28 Dos formas en que se pueden inducir a las células madre a dividirse asimétricamente. (a) En respuesta a una señal externa, la célula se polariza y los determinantes del destino (puntos rojos) comienzan a segregarse en la división celular, y dejan una célula madre y una célula diferenciada. (b) Las células madre que interactúan en un nicho de células madre (objeto rojo curvo) orientan sus husos mitóticos para dar origen a una célula madre asociada con el nicho y a una célula diferenciada distante de él. (De S. J. Morrison y J. Kimble, 2006, *Nature* 441:1068-1074)



constituye un sistema particularmente dócil a la disección genética. Este análisis ha demostrado que cada célula responde a la dirección plana de su vecina, y se han identificado los componentes que afectan específicamente la PCP. Es probable que la polaridad plana general de un epitelio esté determinada por un gradiente de algunos ligandos. Este gradiente polariza todas las células en el epitelio de la misma manera con una clase de proteínas, por ejemplo aquellas codificadas por los genes *Frizzled* y *Dishevelled*, a uno de los lados de cada célula y un segundo grupo, por ejemplo aquellos codificados por los genes *Flamingo* y *Strabismus*, por el otro (Fig. 21-27a). Cuando los componentes de la vía PCP se interrumpen, por ejemplo en un mutante *Dishevelled*, el epitelio está perfectamente intacto, pero los pelos están mal orientados (Fig. 21-27b).

El ordenamiento complementario de los componentes PCP significa que la proteína de membrana *Strabismus* sobre el lado de una célula estará adyacente a la proteína *Frizzled* sobre la célula adyacente; en efecto, estas dos proteínas interactúan, y esta interacción es probablemente la más importante en la coordinación de la PCP a través de un epitelio. Esta distribución asimétrica del cableado de proteínas de la PCP conduce, en un esquema desconocido, el crecimiento del pelo con la orientación adecuada. Aunque hemos encontrado a *Frizzled* como un receptor transmembrana y a *Dishevelled* como una proteína adaptadora en el contexto de la vía Wnt (véase la Fig. 16-30), sus funciones en la vía de la polaridad celular plana no parecen involucrar a Wnt pero sí a otros ligandos.

Otro ejemplo claro de la polaridad celular plana es el de las células ciliadas sensoriales del oído interno que le permiten a usted percibir los sonidos. Estas células tienen una disposición ordenada de estereocilios en un patrón con forma de V, y cada célula se orienta de manera precisa como su vecina. En un ratón con un defecto en el gen de la polaridad celular *Crash* (el homólogo de vertebrado de *Flamingo* en la mosca), la disposición ordenada de los estereocilios dentro de cualquier célula dada está preservada, pero las orientaciones relativas de las células unas respecto de otras están interrumpidas (Fig. 21-27c), y estos tipos de defectos pueden dar como resultado sordera.

Las proteínas Par también están involucradas en la división celular asimétrica de las células madre

Hemos visto que las células madre a menudo dan origen a una célula madre hija y a una diferenciada. ¿Cuáles son las señales que establecen estas divisiones celulares asimétricas? Se han encontrado dos tipos de mecanismos (Fig. 21-28). En uno de ellos, los determinantes del destino celular son segregados hacia un extremo de la

célula antes de la división celular, en respuesta a señales externas. Esto involucra las proteínas Par apical, que ya hemos visto que son instrumentales en la primera división celular asimétrica del embrión de nematodo y en el establecimiento de la polaridad celular epitelial. En el segundo mecanismo, la célula madre se divide con una orientación reproducible de manera tal que permanece asociada con el nicho de célula madre, mientras que la hija es colocada lejos del nicho y puede entonces diferenciarse. Esta es la situación que ya hemos encontrado en el ovario de *Drosophila*, donde las células cap forman un nicho para las células madre de línea germinal (véase la Fig. 21-9).

Un ejemplo particularmente bien comprendido de la división asimétrica de las células madre es la formación de neuronas y células gliales en el sistema nervioso central de la mosca *Drosophila* (Fig. 21-29). En este sistema, la célula madre neuroblasto surge a partir del ectodermo neurogénico, que es una capa epitelial típica con superficies basal y apical. La célula neuroblasto se agranda (paso 1) y se mueve basalmente hacia el interior del embrión, pero permanece en contacto con el epitelio ectodermo (paso 2). La célula ahora se divide asimétricamente (paso 3) para dar lugar a una célula madre neuroblasto y a una célula madre ganglionar (paso 4). Esta última ganglionar solo puede dividirse una vez y dar origen a dos células, ya sea células madre o gliales. El neuroblasto, que es una célula madre por el mantenimiento en asociación con el nicho de ectodermo neurogénico, puede dividirse repetidamente y originar muchas células madre ganglionares y, por ende, neuronas y células gliales (paso 5); por lo tanto, puede poblar el sistema nervioso central. Así, el acontecimiento clave es la capacidad del neuroblasto de dividirse asimétricamente (Fig. 21-29b). Una vez más, el proceso implica la acumulación asimétrica del complejo apical Par (Par3, Par6, aPKC) y su posicionamiento en el lado apical de la célula (Fig. 21-29c). Luego, otros factores son posicionados en el aspecto basal de la célula y se establece el huso mitótico de manera tal que la división celular segregue los determinantes de la polaridad. Uno de estos determinantes localizados basalmente se llama Miranda, una proteína que se asocia con factores que controlan la proliferación y la diferenciación (Fig. 21-29c). Así, en la división asimétrica, Miranda y sus factores asociados son segregados lejos de la célula madre neuroblasto y hacia la célula madre ganglionar.

VIDEO: Asimetría del huso mitótico en la división celular de neuroblastos de *Drosophila*

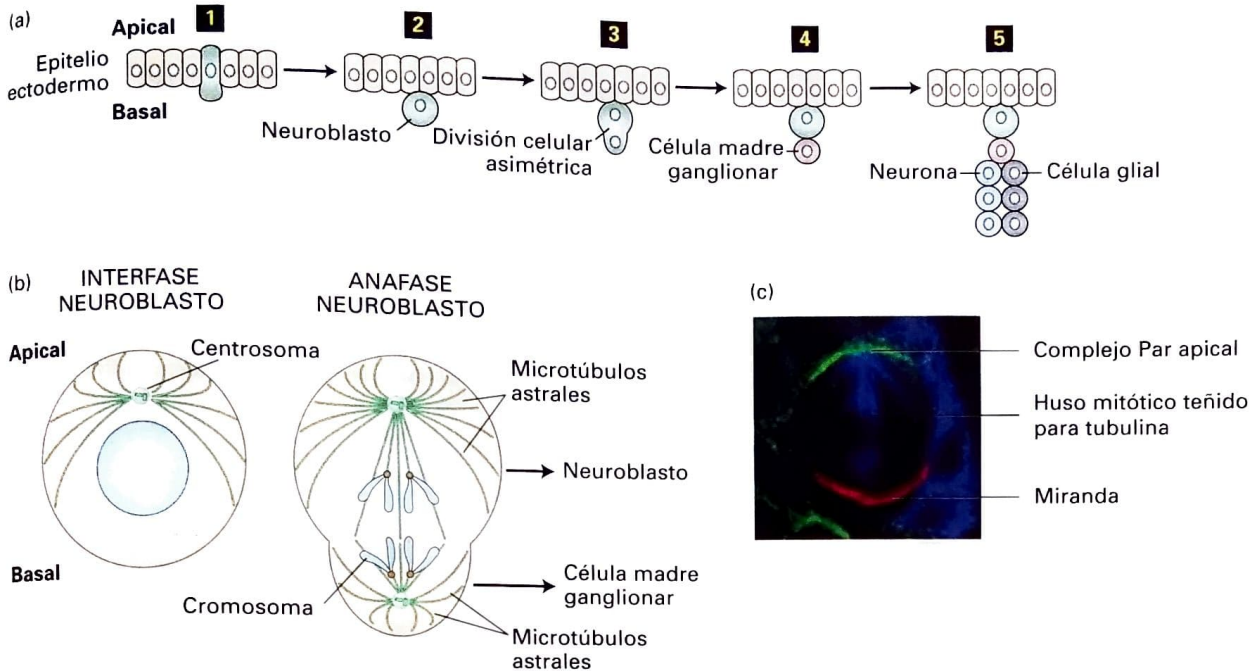


FIGURA 21.29 Los neuroblastos se dividen asimétricamente al generar neuronas y células gliales en el sistema nervioso central. (a) Los neuroblastos, que son células madre, se originan a partir del ectodermo por señales que las inducen a agrandarse (1). Luego se mueven basalmente hacia afuera del epitelio pero permanecen en contacto con el (2). Los neuroblastos luego sufren división asimétrica (3) para dar origen a un neuroblasto y una célula madre ganglionar (GMC) (4). La GMC luego se divide una vez para dar

origen a dos neuronas o células gliales (5). Mientras tanto, las células madre de neuroblastos pueden dividirse muchas veces para dar más GMC y, por ende, poblar los tejidos neurales. (b) La división asimétrica de los neuroblastos requiere la orientación correcta del huso mitótico para dar lugar a un neuroblasto más grande y una célula GMC más pequeña. (c) Un neuroblasto en la anafase muestra la localización segregada de las proteínas Par apical (verde) y la proteína basal Miranda (rojo). (Parte [c] de C. Cabernard y C. Q. Doe, 2009, *Dev. Cell* 17:134-141.)

CONCEPTOS CLAVES de la Sección 21.3

Mecanismos de polaridad celular y división celular asimétrica

- La polaridad celular involucra la distribución asimétrica de proteínas, lípidos y otras macromoléculas en la célula.
- La asimetría requiere que las células perciban una señal, respondan a ella mediante el ensamblaje de un citoesqueleto polarizado y luego utilicen esta polaridad para distribuir factores adecuadamente.
- La división celular asimétrica requiere que las células primero se vuelvan polarizadas, seguido por división para segregar los determinantes asimétricamente.
- El apareamiento en la levadura haploide involucra el ensamblado de una prolongación de apareamiento (shmoo) por polarización del citoesqueleto en la dirección de mayor concentración de la feromona de apareamiento y dirigir la segregación de componentes celulares para la expansión celular allí.

- La asimetría anteroposterior en la primera división del embrión de gusano nematodo involucra la contracción asimétrica de F-actina/miosina-II para localizar el complejo cortical anterior Par3, Par6, aPKC mediante la asociación cortical de los factores posteriores como Par2.
- La polaridad celular epitelial, apical/basal también está conducida por el complejo apical Par3, Par6, aPKC, que funciona en las relaciones antagonicas con el complejo apical Crumbs y el complejo basal Scribble.
- La polaridad celular plana regula la orientación relativa de las células en una lámina.
- La división asimétrica de las células madre suele involucrar la asociación de la célula madre con un nicho, lo que da lugar a otra célula madre y a una célula diferenciada.
- La división asimétrica de la célula madre también involucra la distribución asimétrica del complejo Par3, Par6, aPKC, que es retenido en la célula madre durante la división, mientras que los destinos de los determinantes se localizan lejos del complejo Par hasta terminar en la célula diferenciada.

21.4 Muerte celular y su regulación

La muerte celular programada es un destino celular contradictorio pero esencial. Durante la embriogénesis, la muerte de células específicas evita que nuestras manos tengan membranas y nuestro cerebro se llene de conexiones nerviosas inútiles. En efecto, la mayoría de las células generadas durante el desarrollo del cerebro posteriormente mueren. En el Capítulo 23 veremos cómo las células del sistema inmunitario que reaccionan contra las proteínas normales del cuerpo o que producen anticuerpos disfuncionales son matadas selectivamente. Muchas células musculares, epiteliales y glóbulos blancos desgastados mueren y necesitan ser reemplazados.

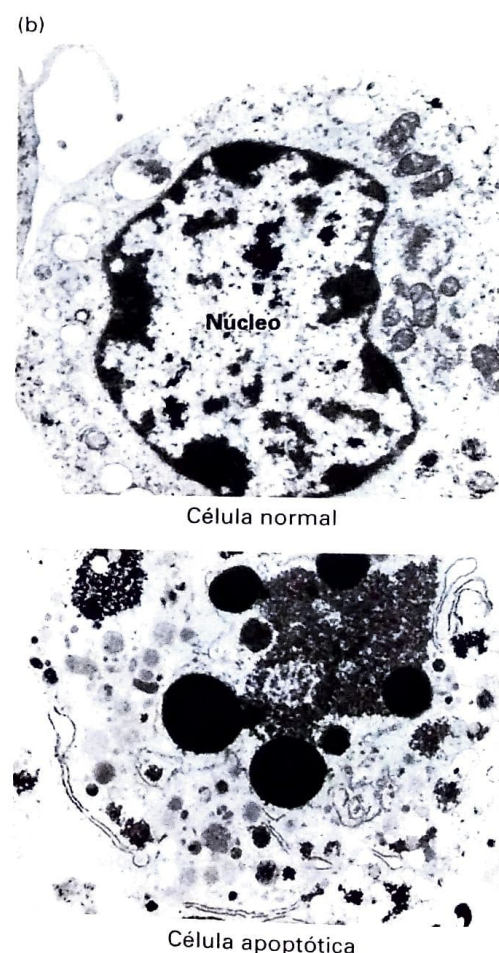
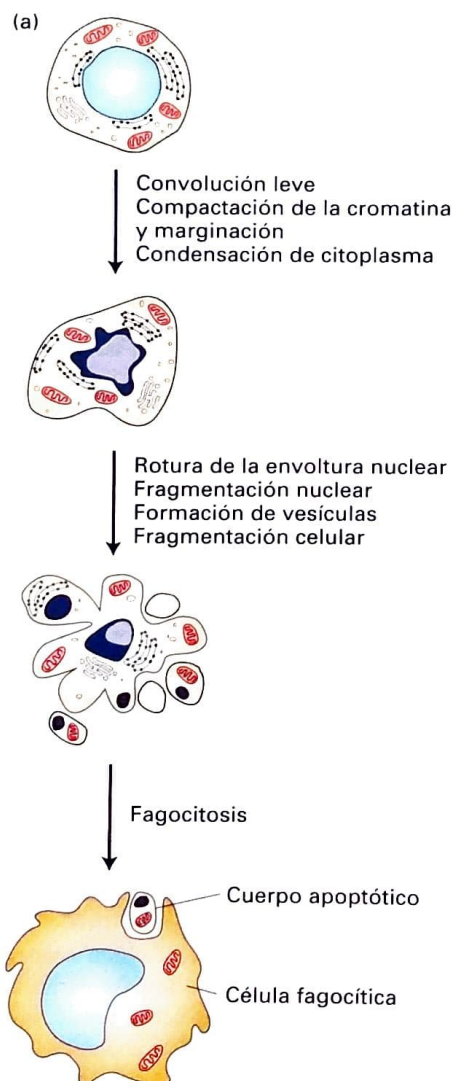
Las interacciones celulares regulan la muerte celular en dos formas fundamentales. Primero, la mayoría de las células (si no todas) en los organismos multicelulares requieren señales de hormonas proteicas específicas para sobrevivir. En ausencia de tales señales de superviven-

cia, denominadas **factores tróficos**, las células activan un programa de "suicidio." Segundo, en algunos contextos, incluyendo el sistema inmunitario, otras señales de hormonas específicas inducen un programa de "asesinato" que mata células. Si las células mueren por falta de señales de supervivencia o son eliminados por señales mortales de otras células, la muerte es mediada por una vía molecular común. En esta sección, primero distinguiremos la muerte celular programada a partir de lesiones tisulares y luego describiremos cómo estudios genéticos en el gusano *C. elegans* llevan a la elucidación de una vía efectora evolutivamente conservada que conduce al suicidio celular o al asesinato. Luego regresaremos a los vertebrados, en los cuales la muerte celular está regulada tanto por factores tróficos, como se ejemplifica mediante la importancia en la muerte celular programada en el desarrollo neuronal, y el estrés celular como por el daño del DNA. Por último, se ilustran las funciones clave de la mitocondria en la iniciación de la vía de muerte celular.

VIDEO: Las células atraviesan apoptosis

FIGURA 21-30 Características estructurales de la muerte celular por apoptosis. (a)

Dibujos esquemáticos que ilustran la progresión de los cambios morfológicos observados en las células apoptóticas. Temprano en la apoptosis, la condensación de los cromosomas densos se produce a largo de la periferia nuclear. El cuerpo celular también se encoje, aunque muchos orgánulos permanecen intactos. Luego, ambos fragmentos del núcleo y el citoplasma forman cuerpos apoptóticos, que son fagocitados por células de alrededor. (b) Microfotografías que comparan una célula normal (arriba) y una célula apoptótica (abajo). En esta última, se ven claramente esferas densas de cromatina compactada a medida que el núcleo comienza a fragmentarse. [Parte (a) adaptado de J. Kuby, 1997, *Immunology*, 3d ed., W. H. Freeman y CO., p. 53; parte (b) de M. J. Arends y A. H. Wyllie, 1991, *Int. J. Rev. Exp. Pathol.* 32:223.]



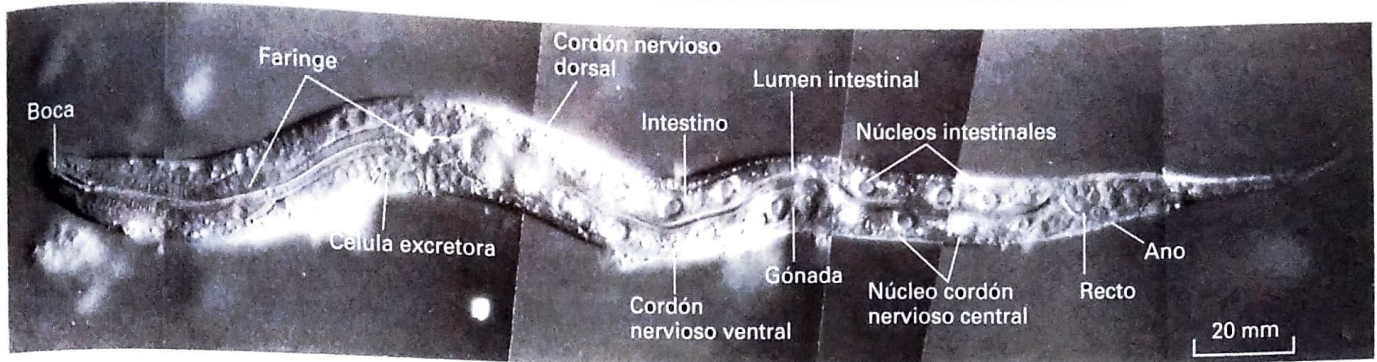


FIGURA 21-31 Larva de *C. elegans* recién nacida. Algunos de los núcleos de las 959 células somáticas en la forma hermafrodita se visualizan en esta microfotografía obtenida por microscopía de contraste diferencial

interferencial (DIC), a veces llamada microscopía de Normarski. Lo que se visualiza más fácilmente son los núcleos intestinales, que aparecen como discos redondos. (De J. E. Sulston y H. R. Horvitz, 1997, *Devel Biol.* **56**:110.)

La muerte celular programada se produce a través de la apoptosis

El fallecimiento de las células por muerte celular programada está marcado por una secuencia bien definida de cambios morfológicos, colectivamente referidos como **apoptosis**, una palabra griega que significa “caer o decaer”, como las hojas de un árbol. Las células que mueren se encojen, se condensan, y luego se fragmentan y liberan los pequeños cuerpos apoptóticos unidos a membrana, que en general después son engullidos por otras células (Fig. 21-30). En las células que mueren, los núcleos se condensan y el DNA es fragmentado. Es importante destacar que los constituyentes intracelulares no son liberados al medio extracelular, donde podrían tener efectos deletéreos sobre las células vecinas. Los cambios estereotípicos que se producen en las células durante la apoptosis, como la condensación del núcleo y el engullimiento por parte de las células que las rodean, sugirieron a los primeros científicos que este tipo de muerte celular estaba bajo el control de un programa estricto. Este programa es crucial tanto durante la vida adulta como en la embrionaria para mantener la cantidad y la composición normal de las células.

Los genes involucrados en el control de la muerte celular codifican proteínas con tres funciones diferentes:

- Proteínas “asesinas”, necesarias para que una célula comience el proceso apoptótico.
- Las proteínas “destructivas”, que digieren el DNA en una célula moribunda.
- Las proteínas que “engullen” son necesarias para la fagocitosis de la célula moribunda por otra célula.

A primera vista, el engullimiento parece ser simplemente un proceso de limpieza posterior a la muerte, pero alguna evidencia sugiere que es parte del proceso de muerte final. Por ejemplo, las mutaciones en los genes asesinos siempre evitan que las células inicien la apoptosis, mientras que las mutaciones que bloquean el engullimiento a veces permiten a las células persistir durante un momento antes de morir. El engullimiento involucra el ensamblaje de un halo de actina en la célula que engulle alrededor de la célula moribunda, desencadenado por las proteínas de apoptosis que activan a Rac, una proteína G monomérica que ayuda a regular la polimerización (véase la Fig. 17-44). Una señal

de la superficie de la célula moribunda también estimula un receptor sobre las células vecinas, que inician cambios en la membrana que llevan al engullimiento.

Contrario a la apoptosis, las células que mueren en respuesta al daño tisular exhiben cambios morfológicos muy diferentes, denominados **necrosis**. Típicamente, las células que sufren este proceso se dilatan y estallan, y liberan sus contenidos intracelulares, que pueden dañar las células de alrededor y frecuentemente causan inflamación.

Las proteínas conservadas evolutivamente participan en la vía apoptótica

La confluencia de los estudios genéticos en *C. elegans* y estudios en las células cancerígenas humanas sugirieron que una vía evolutivamente conservada media la apoptosis. En *C. elegans*, los linajes celulares están bajo control genético fuerte y son idénticas en todos los individuos de una especie. Alrededor de 10 ciclos de la división celular o menos crean un gusano adulto, que es de alrededor de 1 mm de largo y 70 μ m de diámetro. El gusano adulto tiene 959 núcleos de células somáticas (forma hermafrodita) o 1 031 (macho) (Fig. 21-31). Los científicos han trazado el linaje de todas las 947 células somáticas en *C. elegans* a partir del huevo fecundado hasta el gusano maduro siguiendo el desarrollo de gusanos vivos mediante microscopía de contraste diferencial interferencial (DIC) de Normarski (véase la Fig. 21-23c). La cantidad de células somáticas es de alguna manera menor que el número de núcleos debido a que algunas células contienen múltiples núcleos, es decir, son sincitiales. A partir del cigoto, una serie de divisiones celulares asimétricas producen células fundadoras que, a su vez, generan todas las células diferenciadas.

De las 947 células no gonadales generadas durante el desarrollo de la forma hemafródita adulta, 131 sufren muerte celular programada. Mutaciones específicas han identificado cuatro genes cuyas proteínas codificadas cumplen un papel esencial en el control de la muerte celular programada durante el desarrollo de *C. elegans*: *ced-3*, *ced-4*, *ced-9* y *egl-1*. Por ejemplo, en mutantes *ced-3* o *ced-4*, las 131 células “condenadas” sobreviven (Fig. 21-32). Estos mutantes formaron las primeras piezas de evidencia de que la apoptosis estaba bajo control de un programa genético. Las proteínas de mamíferos que se corresponden más estrechamente

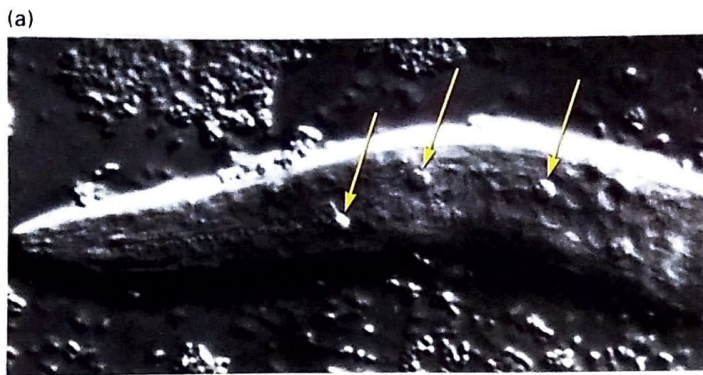


FIGURA EXPERIMENTAL 21-32 Las mutaciones en el gen *ced-3* bloquean la muerte celular programada en *C. elegans*. (a) Las larvas de mutantes hatched recién nacidas portan una mutación en el gen *ced-1*. Debido a que las mutaciones en este gen evitan el engullimiento de las células muertas, se acumulan las células muertas altamente refractarias (flechas), lo

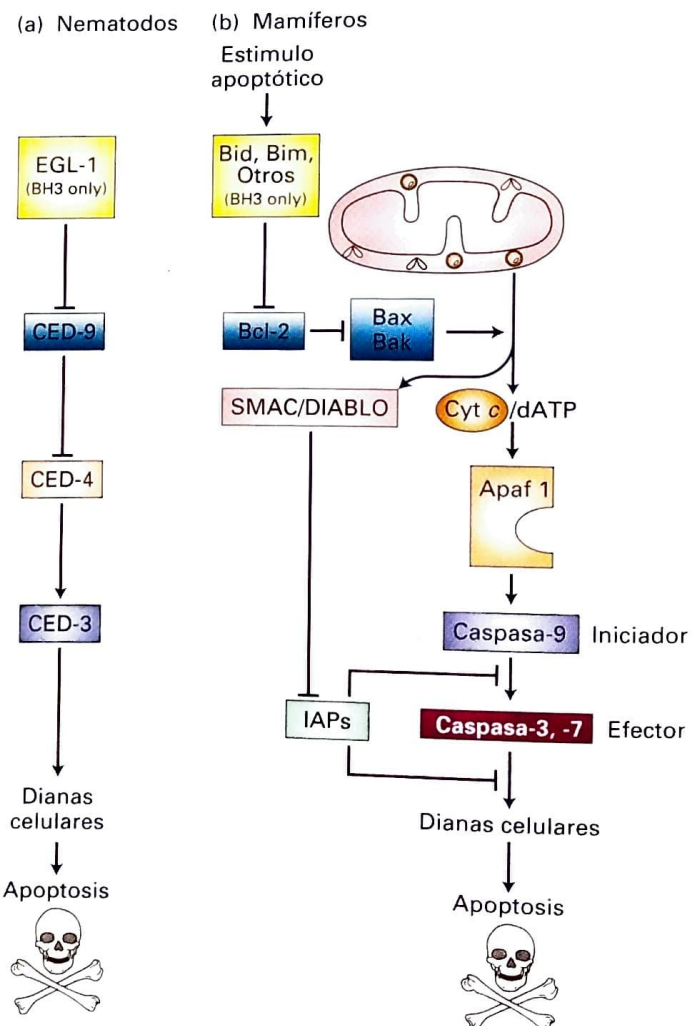
que facilita su visualización. (b) La larva hatched recién nacida con mutaciones en ambos genes *ced-1* y *ced-3*. La ausencia de las células muertas refractarias en estos mutantes dobles indica que no se produce muerte celular. Por lo tanto, la proteína CED-3 es necesaria para la muerte celular programada. (De H. M. Ellis y H. R. Horvitz, 1986 *Cell* 91 818, cortesía de Hilary Ellis.)

con las proteínas de gusano CED-3, CED-4, CED-9 y EGL-1 se indican en la Figura 21-33. En el análisis de las proteínas de gusano, incluiremos los nombres de mamífero en paréntesis para facilitar las relaciones.

El primer gen apoptótico en ser clonado, *bcl-2*, fue aislado a partir de linfomas foliculares humanos. Una forma mutante de este gen se creó en las células de linfoma; un reordenamiento cromosómico que une la región codificadora de proteína del gen *bcl-2* con el amplificador del gen de inmunoglobulina. La combinación da como resultado la sobreproducción de la proteína Bcl-2, que mantiene a estas células cancerosas vivas cuando de otro modo estarían programadas para morir. La proteína Bcl-2 humana y la proteína CED-9 de gusano son homólogas; a pesar de que las dos proteínas solo son idénticas en el 23% de la secuencia, un transgén *bcl-2* puede bloquear la muerte celular extensa que se encuentra en los gusanos mutantes *ced-9*. Por ende, ambas proteínas actúan como reguladores que eliminan la

vía apoptótica (Fig. 21-33). Además, ambas proteínas contienen un único dominio transmembrana y se localizan principalmente en la membrana mitocondrial externa, donde sirven como sensores que

FIGURA 21-33 Conservación evolutiva de las vías apoptóticas. Proteínas similares, mostradas en colores idénticos, cumplen funciones correspondientes tanto en nematodos como en mamíferos. (a) En nematodos, la proteína BH3-only llamada EGL-1 se une a CED-9 sobre la superficie de las mitocondrias; esta interacción libera a CED-4 del complejo CED-4/CED-9. El CED-4 libre se une y activa por autoproteólisis la caspasa CED-3, que destruye proteínas celulares que conducen a la apoptosis. Estas relaciones se muestran como una vía genética, con EGL-1 inhibiendo a CED-9, que a su vez inhibe CED-4. CED-4 activo, por su parte, activa a CED-3. (b) En los mamíferos, los homólogos de las proteínas nematodo, como así también muchas otras proteínas, no se encuentran en los gusanos que regulan la apoptosis. La proteína Bcl-2 es similar a CED-9 en cuanto a estimular la supervivencia celular. Realiza esto en parte al evitar la activación de Apaf-1, que es similar a CED-4, y en parte por otros mecanismos descritos en la Figura 21-38. Diversos tipos de proteínas BH3-only, también detalladas en las Figuras 21-37 y 21-38, inhiben a Bcl-2 y, por ende, permiten la apoptosis para proceder. El estímulo apoptótico daña las mitocondrias y lleva a la liberación de varias proteínas que estimulan la muerte celular. En particular, el citocromo c liberado desde las mitocondrias activa a Apaf-1, que a su vez activa la caspasa-9. Esta caspasa iniciadora luego activa las caspasas efectoras 3 y 7, que eventualmente llevan a la muerte celular. Véase el texto para análisis de otras proteínas de mamífero (SMAC/DIABLO e IAP) que no tienen homólogos de nematodos. (Adaptado de S. J. Riedl y Y. Shi, 2004, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* 5:897.)



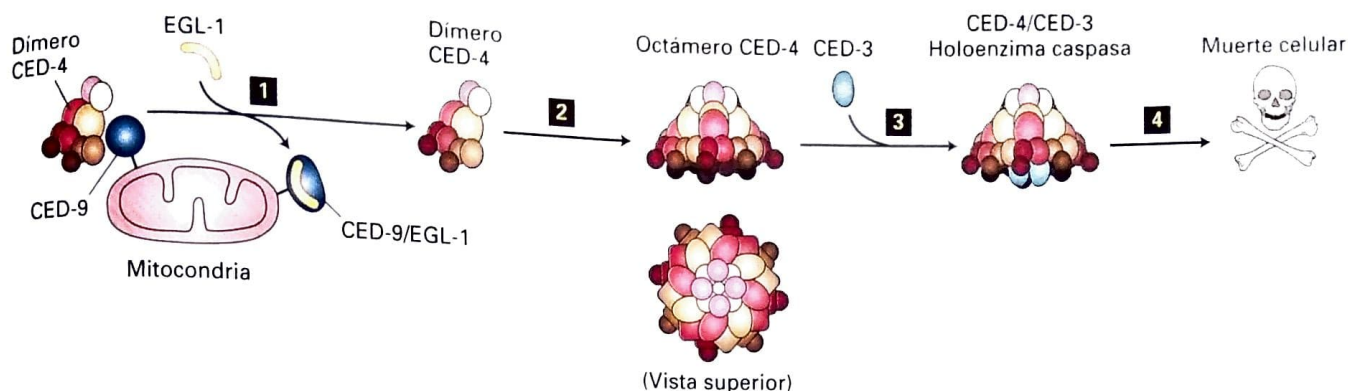


FIGURA 21-34 La activación de la proteasa CED-3 en *C. elegans*. La proteína EGL-1, que es producida en respuesta a las señales de desarrollo que desencadenan la muerte celular, desplaza un dímero asimétrico CED-4 a partir de su asociación con CED-9 sobre la superficie de las mitocondrias (1). El dímero CED-4 libre se combina con tres otros para formar un octámero (2), el cual une

dos moléculas del zimógeno CED-3 (un precursor enzimáticamente inactivo de una proteasa) y desencadena la conversión de los zimógenos CED-3 en las proteasas CED-3 activas (3). Esta caspasa efectora luego comienza a destruir los componentes celulares y, por ende, inicia la apoptosis, lo que lleva a la muerte celular (4). (Adaptado de N. Yan y cols., 2005, *Nature* 437:831, y S. Qi y cols., 2010, *Cell* 141:446)

controlan la vía apoptótica en respuesta a estímulos externos. Como se analizará luego, otros reguladores estimulan la apoptosis.

En la vía apoptótica de gusano, CED-3 (caspasa-9 en mamíferos) es necesaria para destruir los componentes celulares durante la apoptosis. CED-4 (Apaf-1) es un factor activador de proteasa que causa la autoescisión de (y por) la proteína precursora CED-3, lo cual crea una proteasa CED-3 activa (caspasa-9) que inicia la muerte celular (Figs. 21-33 y 21-34). Dicha muerte no se produce en los mutantes simples *ced-3* y *ced-4* o en los mutantes dobles *ced-9/ced-3*, mientras que todas las células mueren durante la vida embrionaria en los mutantes *ced-9*, de manera tal que la forma adulta nunca se forma. Estos estudios genéticos indican que CED-3 y CED-4 son proteínas “asesinas” necesarias para la muerte celular, que CED-9 (Bcl-2) suprime la apoptosis y que la vía apoptótica puede ser activa en todas las células. Por otra parte, la ausencia de muerte celular en los mutantes dobles *ced-9/ced-3* sugiere que CED-9 actúa “corriente arriba” de CED-3 para suprimir la vía apoptótica.

Se desconoce el mecanismo por el cual CED-9 (Bcl-2) controla a CED-3 (caspasa 3). La proteína CED-9, que normalmente se encuentra sujeta al exterior de la mitocondria, forma un complejo con un dímero asimétrico CED-4 (Apaf-1), y previene así la activación de CED-3 por CED-4 (Fig. 21-34). Como resultado, la célula sobrevive. Este mecanismo coincide con la genética, lo cual demuestra que la ausencia de CED-9 no tiene efecto si CED-3 también se pierde (los dobles mutantes *ced-3/ced-9* no tienen muerte celular). La estructura tridimensional del complejo trimérico CED-4/CED-9 revela un gran contacto de superficies entre cada una de las dos moléculas de CED-4 y la única molécula CED-9; el gran contacto de las superficies torna a la asociación altamente específica, pero en forma tal que la disociación del complejo puede ser regulada.

La transcripción de *egl-1*, el cuarto gen regulador de apoptosis genéticamente definido, es estimulada en las células de *C. elegans* que están programadas para morir, pero no está claro cómo sucede esta regulación. La proteína EGL-1 recién producida se une a CED-9, altera su conformación y cataliza la liberación de CED-4 desde él (Fig. 21-34). Tanto EGL-1 como CED-9 contienen un dominio BH3 de 12 aminoácidos. Como EGL-1 carece de la mayoría de los otros dominos de CED-9, EGL-1 se denomina una *proteína BH3-only*. Las proteínas

de mamífero BH3-only más cercanas son las proapoptóticas Bim y Bid.

La comprensión de cómo EGL-1 interrumpe el complejo CED-4/CED-9 proviene de la estructura molecular de EGL-1 (Bid/Bim), que forma complejo con CED-9 (Bcl-2). En este complejo, el dominio BH3 forma la parte clave de la superficie de contacto entre dos proteínas. CED-9 tiene una conformación diferente cuando está unida por EGL-1 que cuando lo está por CED-4. Este hallazgo sugiere que la unión de EGL-1 distorsiona CED-9 y hace que sus interacciones con CED-4 menos estables. Una vez que EGL-1 causa una disociación del complejo CED-4/CED-9, el dímero CED-4 liberado se une con otros tres dímeros CED-4 para formar un octámero, que luego activa a CED-3 mediante un mecanismo analizado más adelante. Luego, la muerte celular ocurre pronto (Fig. 21-34).

La evidencia de que los pasos aquí descritos son suficientes para inducir la apoptosis proviene de los experimentos en los cuales los acontecimientos fueron reconstituidos in vitro con proteínas purificadas. Se purificaron CED-3, CED-4, una CED-9 truncada que carece de su anclaje transmembrana de membrana mitocondrial, y EGL-1, como así también un complejo CED-4/CED-9. CED-4 purificada (Apaf-1) fue capaz de acelerar la autocatálisis de CED-3 purificada (caspasa-9), pero la adición de CED-9 truncado (Bcl-2) a la mezcla de reacción inhibió la autoescisión. Cuando el complejo CED-4/CED-9 se mezcló con el CED-3, no se produjo la autoescisión, pero la adición de EGL-1 a la reacción restauró la autoescisión de CED-3.

Las caspasas amplifican la señal apoptótica inicial y destruyen las proteínas celulares clave

Las proteínas efectoras en la vía apoptótica, las **caspasas**, se denominan así porque contienen un residuo de cisteína clave en el sitio catalítico y selectivamente escinden proteínas en sitios inmediatos en dirección C-terminal respecto de los residuos aspartato. Las caspasas funcionan como homodímeros, con un dominio de cada una que estabiliza el sitio activo de la otra. La principal caspasa efectora en *C. elegans* es CED-3, mientras que los seres humanos tienen 15 caspasas diferentes. En un inicio, todas las caspasas se sintetizan como procaspasas que deben ser cortadas para activarse. En los vertebrados,

las caspasas iniciadoras (p. ej., caspasa-9) se activan por dimerización inducida por la unión a otros tipos de proteínas (p. ej., Apaf-1), que ayuda a los iniciadores a agregarse. Las caspasas iniciadoras activadas cortan las caspasas efectoras (p. ej., caspasa-3) para activarlas; de esta forma, la actividad proteolítica de las pocas caspasas iniciadoras activadas se incrementa en gran media y rápidamente mediante la activación de las caspasas efectoras, lo que lleva a un aumento masivo en el nivel de actividad caspasa en la célula (véase la Fig. 21-33) y a la muerte celular. Las procaspasas preexisten en cantidades suficientes para lograr la digestión de muchas de las proteínas celulares cuando son activadas por el pequeño número de moléculas que constituyen la señal de iniciación. Estas difieren en sus secuencias diana preferidas. Sus dianas intracelulares específicas incluyen proteínas de la lámina nuclear y del citoesqueleto cuya escisión conduce a la muerte de una célula.

Las neurotrofinas estimulan la supervivencia de las neuronas

En los mamíferos, pero no en los gusanos, la apoptosis está regulada por señales intracelulares generadas a partir de muchas hormonas proteicas de la superficie celular y secretadas, como así también por mucho estrés ambiental, como la irradiación ultravioleta y daño del DNA. Mientras que la maquinaria "central" de apoptosis en *C. elegans* está conservada en los mamíferos, muchas otras proteínas intracelulares también regulan la apoptosis (véase la Fig. 21-33, derecha).

Pero antes de sumirnos en estos detalles moleculares, ilustraremos la importancia de los factores tróficos en la apoptosis mediante un breve análisis del sistema nervioso en desarrollo. Cuando las neuronas crecen estableciendo conexiones con otras neuronas o con los músculos, a veces a distancias considerables, crecen más neuronas de las que finalmente sobrevivirán. Los cuerpos celulares de muchas neuronas sensitivas y motoras se localizan en la médula espinal y en los ganglios adyacentes, mientras que sus procesos axónicos largos se extienden lo suficientemente afuera de estas regiones. Aquellas que hacen conexiones prevalecen y sobreviven; las que fallan en conectarse mueren.

A comienzo de 1900 se demostró que la cantidad de neuronas que invocaban la periferia dependía del tamaño del tejido al cual se conectarían, el denominado campo diana. Por ejemplo, la extirpación de los esbozos de las extremidades del embrión de pollo en desarrollo produjo una disminución de la cantidad de neuronas sensitivas y de neuronas motoras que invocaban los músculos en los esbozos (Fig. 21-35). En forma contraria, el injerto de tejido ectópico de extremidades a los esbozos lleva a un incremento en la cantidad de neuronas en las regiones correspondientes de la médula espinal y de los ganglios sensitivos. En efecto, los aumentos graduales en el tamaño del campo diana se acompañan por incrementos conmensurados en la cantidad de neuronas que lo inviran. Se encontró que esta relación es el resultado de la supervivencia selectiva de neuronas más que de cambios en su diferenciación o su proliferación. La observación de que muchas neuronas motoras o sensitivas mueren después de alcanzar sus campos diana periféricos sugirió que estas neuronas compiten por los factores de supervivencia producidos por los campos diana.

Posteriormente a estas primeras observaciones, los científicos descubrieron que el trasplante de un sarcoma murino (tumor de músculo) a un pollo producía un aumento marcado en la cantidad de ciertos tipos de neuronas. Este hallazgo implicaba que el tumor era una fuente rica del supuesto factor trófico. Para aislar y purificar este factor, conocido simplemente como factor de crecimiento ner-

vioso (NGF), los científicos utilizaron un ensayo in vitro en el cual se midieron las prolongaciones de las neuritas de los ganglios sensitivos (nervios). Las neuritas son extensiones del citoplasma celular que pueden crecer para convertirse en los extensos cables del sistema nervioso, los **axones** y las **dendritas** (véase la Fig. 22-1). El último descubrimiento de que la glándula submaxilar en el ratón también produce grandes cantidades de NGF permitió a los bioquímicos purificarlo y secuenciarlo. Es un homodímero de dos polipéptidos de 118 residuos que pertenece a una familia de factores tróficos funcional y estructuralmente relacionados que en conjunto se denominan

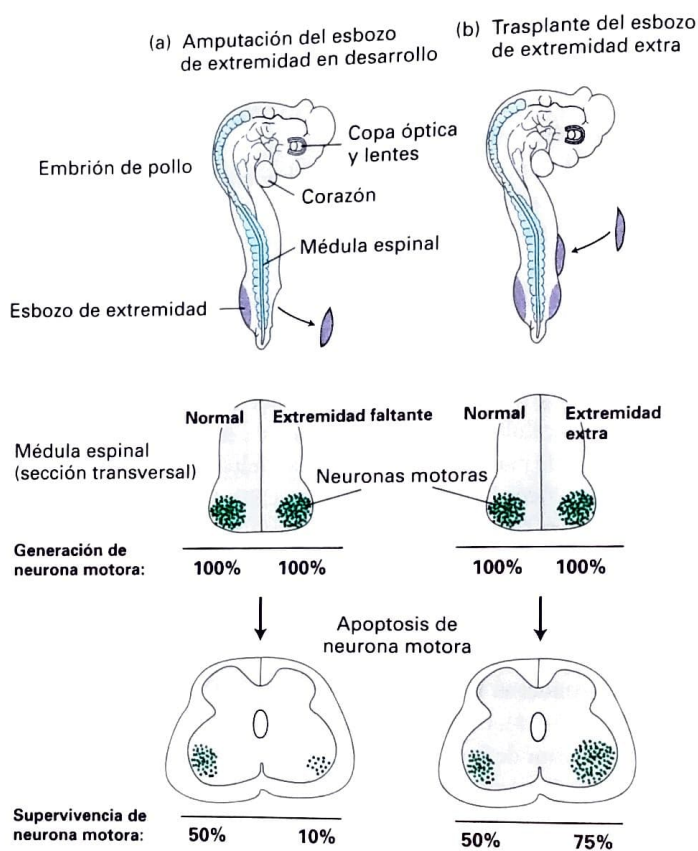


FIGURA EXPERIMENTAL 21-35 En los invertebrados, la supervivencia de las neuronas motoras depende del tamaño del campo diana del músculo que inviran.

(a) La extirpación de un esbozo de las extremidades de un lado de un embrión de pollo de alrededor de 2,5 días da como resultado un marcado descenso en la cantidad de neuronas motoras sobre el lado afectado. En un embrión amputado (*parte superior*), se generan cantidades normales de neuronas motoras a ambos lados (*parte central*). Más tarde en el desarrollo, muchas menos neuronas permanecen sobre el lado de la médula espinal con la extremidad faltante respecto del lado normal (*parte inferior*). Nótese que por lo general solo alrededor del 50% de las neuronas motoras que originalmente se generaron sobreviven. (b) Trasplante de un esbozo opuesto, más neuronas motoras sobre el lado con el tejido diana adicional que sobre el lado normal. (Adaptado de D. Purves, 1988, *Body and Brain: A Trophic Theory of Neural*

Connections, Harvard University Press, y E. R. Kendell, J. H. Schwartz y T. M. Jessell, 2000, *Principles of Neural Science*, 4ª ed., McGraw-Hill, p. 1054, Figura 53-11.)

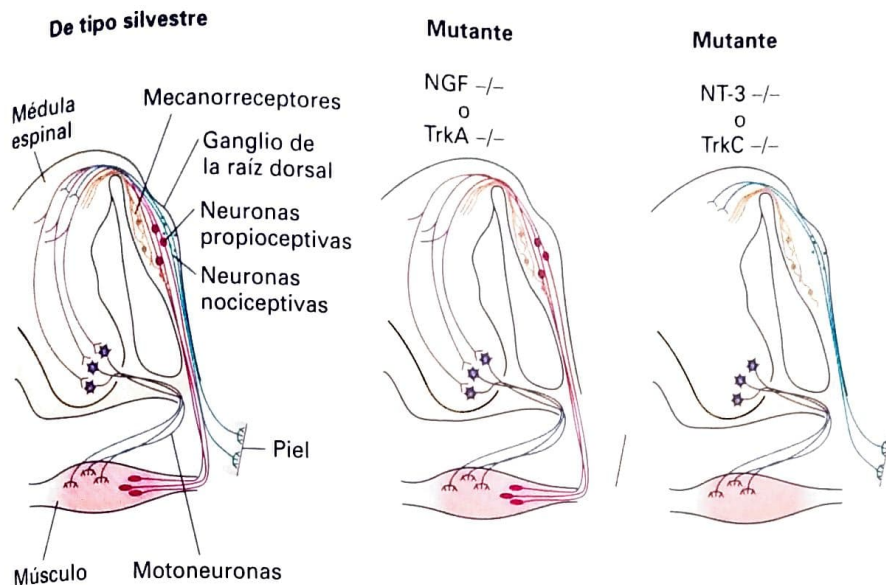


FIGURA EXPERIMENTAL 21-36 Diferentes clases de neuronas sensibles se pierden en los ratones genéticamente inactivados que carecen de distintos factores tróficos sobre sus receptores.

En los animales que carecen de factor de crecimiento nervioso (NGF) o su receptor TrkA, se pierden pequeñas neuronas nociceptivas (sensibles al dolor) (celeste) que inervan la piel. Estas neuronas expresan el receptor TrkA e inervan las dianas que producen NGF. En los animales que carecen de la neurotrofina-3 (NT-3) o su receptor TrkC, se pierden las neuronas propioceptivas grandes (rojo) que inervan los husos del músculo. El músculo produce NT-3, y las neuronas propioceptivas expresan TrkC. Los mecanorreceptores (anaranjado; véase la Fig. 22-24), otra clase de neuronas sensitivas del ganglio de la raíz dorsal, no se ven afectados en estos mutantes. (Adaptado de W. D. Snider, 1994, *Science* **77** 627.)

neurotrofinas. El factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y la neurotrofina-3 (NT-3) son miembros de esta familia de proteínas.

Las neurotrofinas se unen y activan a una familia del receptor tirosinasa llamada *Trks*. (La estructura general del receptor de tirosinasa y las vías de señalización intracelular que activan se tratan en el Cap. 16). Cada neurotrofina se une con alta afinidad a un receptor Trk: NGF se une a TrkA; BDNF, a TrkB; y NT-3, a TrkC. NT-3 puede unirse también con menor afinidad tanto a TrkA como a TrkB. Estas uniones (entre factores y sus receptores) proporcionan una señal de supervivencia para diferentes clases de neuronas. A medida que las neuronas crecen desde la médula espinal hasta la periferia, las neurotrofinas producidas por los tejidos diana se unen a los receptores sobre los conos de crecimiento (véase la Fig. 18-52) de los axones extendidos y así estimulan la supervivencia de las neuronas que exitosamente alcanzan sus dianas. Además, las neurotrofinas se unen a distintos tipos de receptores llamados p75^{NTR} (NTR 5 del receptor de neurotrofina), pero con baja afinidad. Sin embargo, p75^{NTR} forma complejos heteromultiméricos con diferentes Trk receptoras; esta asociación incrementa la afinidad de las Trk por sus ligandos. Dependiendo del tipo de célula, la unión de NGF y BDNF a p75^{NTR} en ausencia de TrkA puede estimular la muerte celular en lugar de evitarla. (El fenómeno de interacción de múltiples neurotrofinas con múltiples receptores similares es comparable a los ligandos similares a EGF y sus receptores HER, ilustrados en la Fig. 16-7.)

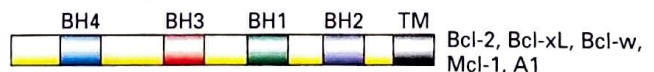
Para abordar críticamente la función de las neurotrofinas en el desarrollo, los científicos produjeron ratones con mutaciones inactivantes (*knockout*) en cada una de las neurotrofinas y sus receptores. Estos estudios revelaron que diferentes neurotrofinas y sus correspondientes receptores son necesarios para la supervivencia de distintas clases de neuronas sensitivas (Fig. 21-36). Por ejemplo, las neuronas sensibles al dolor (nociceptivas), las cuales expresan TrkA, se pierden selectivamente del ganglio de la raíz dorsal en los mutantes inactivados que carecen de NGF o TrkA, mientras que las neuronas que expresan TrkB y TrkC no se afectan en tales inactivaciones. Por el contrario, las neuronas propioceptivas que expresan TrkC, las cuales detectan la posición de las extremidades, se pierden en los mutantes *TrkC* y *NT-3* en el ganglio de la raíz dorsal.

La mitocondria cumple una función central en la regulación de la apoptosis en las células de vertebrados

Como se describió anteriormente, CED-9 de *C. elegans* y sus homólogos de mamífero Bcl-2 cumplen funciones centrales en la represión de la apoptosis. En los nematodos, CED-9 realiza esto mediante la unión a CED4 y la represión de su activación. En los vertebrados, Bcl-2, que reside en la membrana mitocondrial externa, funciona principalmente para mantener la baja permeabilidad de esa membrana y evitar así que el citocromo *c* y otras proteínas localizadas en el espacio intermembrana (véase la Fig. 12-16) se difundan hacia el citosol y activen las caspasas apoptóticas.

Para poder explicar cómo Bcl-2 lleva a cabo esta función y cómo la actividad Bcl-2 está regulada por factores tróficos y por muchos estímulos ambientales, es necesario introducir otros miembros importantes de la familia Bcl-2 de proteínas. Todos los miembros de la familia Bcl-2 comparten una homología estrecha de hasta cuatro regiones características llamadas los *dominios de homología Bcl-2*

Miembros de prosupervivencia



Miembros proapoptóticos

Forman canales en la membrana mitocondrial externa



Proteínas BH3-only; regulan la actividad de las proteínas Bcl-2 y Bax/Bak



FIGURA 21-37 Familia de proteínas Bcl-2. La familia Bcl-2 está compuesta por proteínas que contienen dominios de homología Bcl funcional (BH 1-4) y se dividen en tres clases. Solo algunas de las proteínas BH3-only contienen dominios transmembrana (TM). (De M. Giarn y cols., 2009, *Oncogene* **27** 5128.)

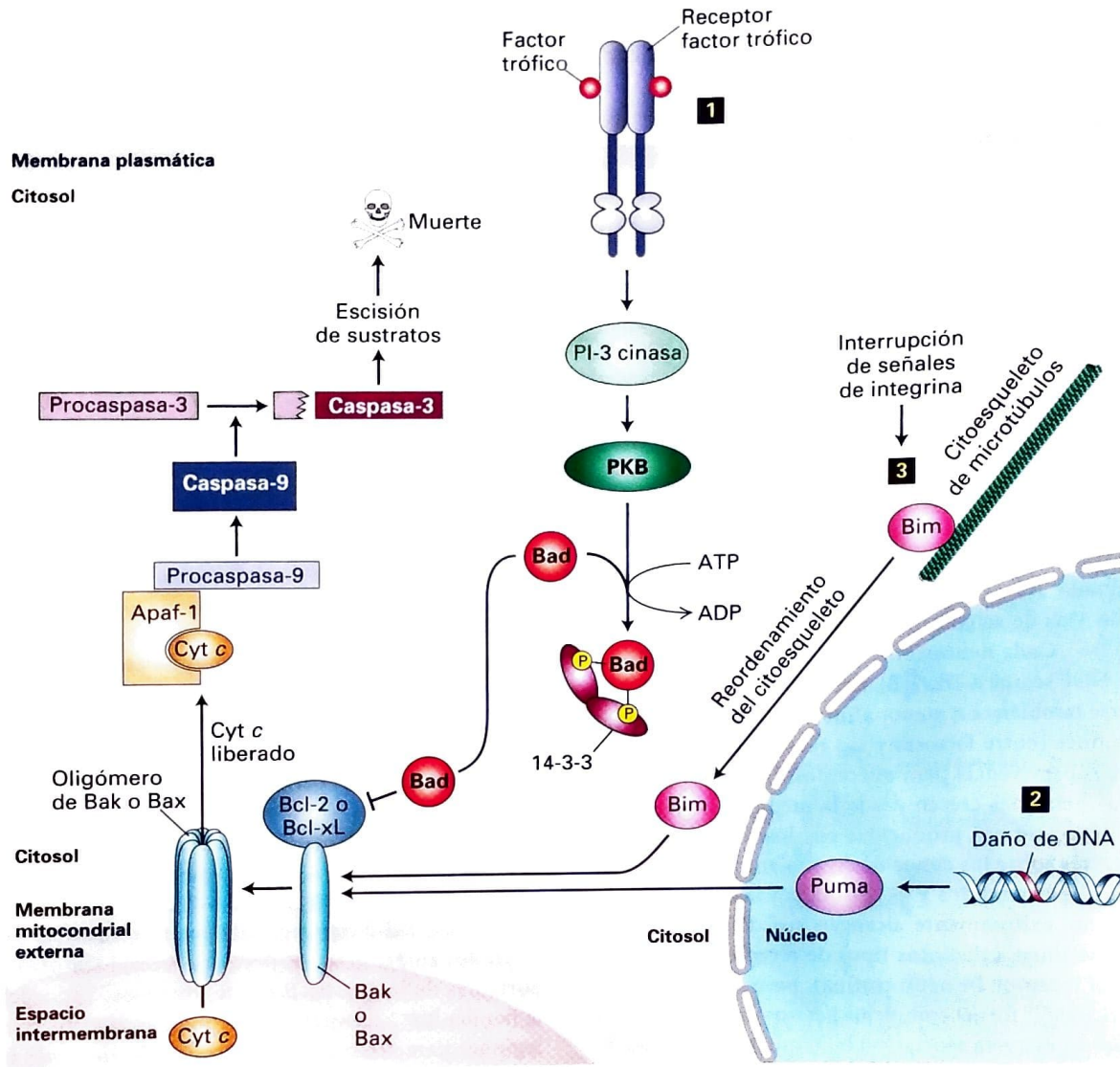


FIGURA 21-38 Integración de las múltiples vías de señalización en las células de vertebrados que regulan la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa y la apoptosis. En las células sanas, la proteína antiapoptótica Bcl-2 o su homólogo Bcl-xL se unen a las proteínas BH3-only Bax y Bak en la membrana mitocondrial externa y bloquean la capacidad de Bax y Bak para oligomerizar y formar canales oligoméricos. La unión de ciertas proteínas BH3-only, incluyendo Bim y Puma, directamente a Bax y Bak causan que ellas formen canales oligoméricos en la membrana mitocondrial externa. Esto permite al citocromo c entrar en el citosol, donde se une a la proteína adaptadora Apaf-1 y estimula la activación de caspasa que inicia la cascada apoptótica y lleva a la muerte celular. Otras proteínas BH3-only, incluyendo Bad, se unen a Bcl-2, bloquean su capacidad para unirse a Bak y Bax y provocan que ellas formen canales en la membrana mitocondrial externa. Diversos

estímulos desencadenan o reprimen esta vía apoptótica. **(1)** La presencia de factores tróficos específicos (p. ej., NGF) lleva a la activación de la proteína receptora afín tirosincinasa (p. ej., TrkA) y a la activación de la vía PI-3 cinasa/PKB (proteincinasa B; también llamada Akt) (véase la Fig. 16-26). PKB fosforila a Bad, y Bad fosforilada luego forma un complejo con la proteína 14-3-3. Con Bad secuestrada, es incapaz de unirse a Bcl-2. En la ausencia de factores tróficos, Bad desfosforilado se une a Bcl-2, libera Bax y Bak y permite que ellas formen el canal oligomérico. **(2)** El DNA dañado o la irradiación ultravioleta lleva a la inducción de la proteína BH3-only Puma. Puma se une a Bax y a Bak y les permite formar canales oligoméricos. **(3)** La eliminación de una célula a partir de su sustrato interrumpe la señalización de integrina, lo que lleva a la liberación de la proteína BH3-only Bim del citoesqueleto. Bim también se une a Bax y Bak para estimular la formación de canal. (De D. Ren y cols., 2010 *Science* **330**:1390.)

(dominios BH1-4; Fig. 21-37). Cada proteína tiene funciones que promueven la supervivencia o la apoptosis. Muchos miembros de esta familia son proteínas transmembranas de un único paso y todas participan en interacciones oligoméricas.

Las proteínas Bax y Bak proapoptóticas forman poros en la membrana mitocondrial externa

En las células de vertebrados, Bax y Bak son necesarias para el daño mitocondrial y la inducción de apoptosis. Estas dos proteínas proapoptóticas similares contienen diversos dominios BH1-4 (véase la Fig. 21-37) y tienen una estructura tridimensional muy similar a la de los miembros de la familia prosupervivencia. Como evidencia para esta función en la estimulación de la apoptosis, la mayoría de los ratones que carecen de Bax y Bak mueren *en el útero*. Aquellos que sobreviven muestran significativos defectos del desarrollo, incluyendo la persistencia de redes interdigitales y la acumulación de células extra en el sistema nervioso central y en el hematopoyético. Las células aisladas a partir de estos ratones son resistentes a virtualmente todos los estímulos apoptóticos. Por el contrario, la sobreproducción de Bax en las células cultivadas induce la muerte.

Bax y Bak se encuentran en la membrana mitocondrial externa, por lo general fuertemente unidas a Bcl-2 (Fig. 21-38). Cuando se liberan de Bcl-2 (ya sea por estar presentes en exceso, por desplazamiento por la unión de ciertas proteínas BH3-only a Bcl-2 o por unión directa a otras proteínas BH3-only) Bax y Bak forman oligómeros que generan poros en la membrana mitocondrial externa. Esto permite la liberación al citosol de proteínas mitocondriales como el citocromo *c* que, en células saludables normales, se localizan en el espacio entre la membrana mitocondrial interna y externa. Como se describe en la Figura 21-33, el citocromo *c* liberado activa la caspasa 9 (en parte a través de la unión y la activación de Apaf-1 y en parte por mecanismos aún desconocidos).

Como evidencia de esta vía reguladora, la sobreproducción de Bcl-2 en células cultivadas bloquea la liberación del citocromo *c* y bloquea la apoptosis; por el contrario, la sobreproducción de Bax estimula la liberación del citocromo *c* al citosol y promueve la apoptosis. Más aún, la inyección de citocromo *c* en el citosol de las células induce la apoptosis. Los oligómeros Bax y Bak, pero no los homodímeros Bcl-2 o los heterodímeros Bcl/Bax, permiten el flujo de iones a través de la membrana mitocondrial externa. Todavía es incierto si este flujo de entrada de iones desencadena la liberación del citocromo *c*, y no está establecido si el citocromo *c* en realidad se mueve hacia el exterior a través de canales Bax/Bak.

La liberación del citocromo *c* y las proteínas SMAC/DIABLO de la mitocondria conduce la formación del apoptosoma y la activación de caspasas

La principal forma en la cual el citocromo *c* en el citosol activa la apoptosis es por la unión de Apaf-1, el homólogo de mamífero de CED-4 (véase la Fig. 21-33, *derecha*). En ausencia de citocromo *c*, la Apaf-1 monomérica se une a dATP. Después de la unión del citocromo *c*, Apaf-1 corta su dATP unido para formar dADP y atraviesa un proceso de ensamblaje espectacular para formar el y atraviesa un proceso de ensamblaje espectacular para formar el heptámero con forma de disco, una rueda de la muerte de 1,4 megadalton llamada **apoptosoma** (Fig. 21-39). El apoptosoma sirve

como máquina de activación para la caspasa iniciadora, la caspasa-9, que es monomérica en el estado inactivo. Las caspasas iniciadoras necesitan ser sensibles a las señales de activación aun cuando no deberían ser activables de manera irreversible debido a que la activación accidental llevaría a un efecto de bola de nieve indeseable y a la muerte celular rápida. Significativamente, la caspasa-9 no requiere la escisión para activarse, sino que es activada mediante la dimerización seguida por la unión del apoptosoma. Luego, la caspasa-9 corta múltiples moléculas de caspasas efectoras, como la caspasa-3, lo que lleva a la destrucción de proteínas celulares (véanse las Figs. 21-33 y 21-38).

La estructura tridimensional del apoptosoma CED-4 de nematodo correspondiente (véase la Fig. 21-39c) demostró cómo dos procaspasas CED-3 (caspasa-9) se unen adyacentes una a la otra sobre el interior del octámero con forma de embudo; luego, estas se activan mutuamente por dimerización y conversión proteolítica, pero se desconoce el mecanismo detallado de cómo sucede esto. La estructura del apoptosoma CED4 también proporciona un modelo para la aún desconocida estructura tridimensional del correspondiente apoptosoma de mamífero (véase la Fig. 21-39b, *derecha*).

En los mamíferos y las moscas, pero no en gusanos, la apoptosis está regulada por diversas otras proteínas (véase la Fig. 21-33, *derecha*). Una familia de proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAP) proporciona otra forma de restringir tanto las caspasas iniciadoras como las efectoras. Las IAP tienen uno o más dominios de unión a cinc que pueden unirse directamente a las caspasas e inhibir sus actividades de proteasa. (El baculovirus, un tipo de virus de insecto, produce una proteína que se une e inhibe de modo similar a las caspasas, y previene así que una célula infectada muera, lo cual detendría la infección viral antes de la síntesis de nuevos virus). Sin embargo, la inhibición de las caspasas por las IAP crea un problema cuando una célula necesita sufrir apoptosis. La mitocondria entra en escena una vez más, puesto que ellas son la principal fuente de una familia de proteínas, denominadas SMAC/DIABLO, que inhiben las IAP. El ensamblaje de los canales Bax/Bak (véase la Fig. 21-38) lleva a la liberación de la SMAC/DIABLO de la mitocondria. Luego, SMAC/DIABLO une las IAP en el citosol, y bloquea así las IAP de la unión a las caspasas. Al aliviar la inhibición mediada por IAP, SMAC/DIABLO estimula la actividad caspasa y la muerte celular.

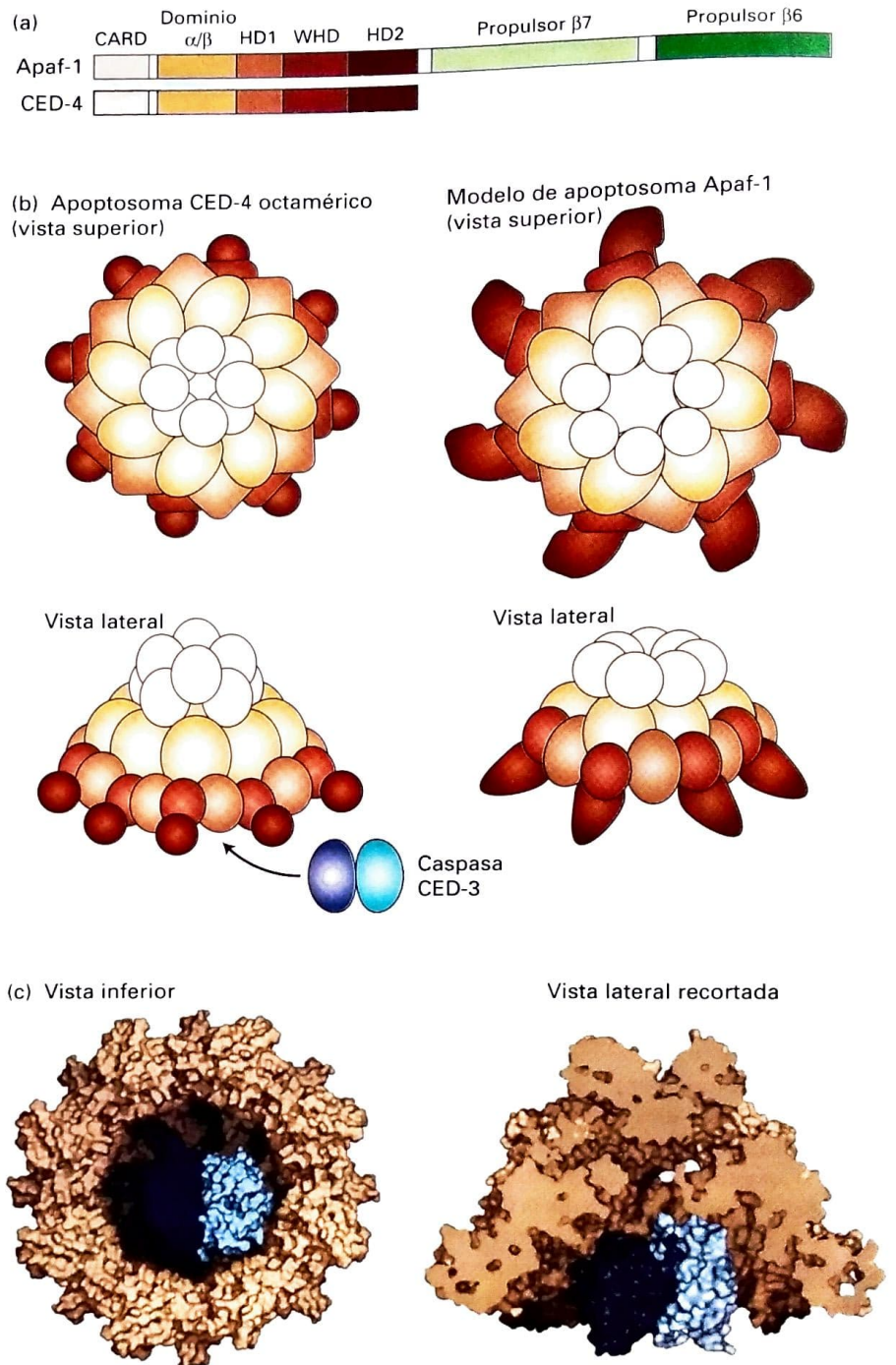
Los factores tróficos inducen la inactivación de Bad, una proteína proapoptótica BH3-only

Anteriormente, vimos que las neurotrofinas como factor de crecimiento nervioso protegen a las neuronas de la muerte celular; esto es mediado por la proteína BH3-only llamada Bad. En ausencia de factores tróficos, Bad es desfosforilado y se une a Bcl-2 o a la proteína antiapoptótica estrechamente relacionada Bcl-xL en la membrana mitocondrial (véase la Fig. 21-38). Esto inhibe la capacidad de Bcl-2 y Bcl-xL de unirse a Bax y Bak, lo cual permite que los canales Bak y Bax formen y estimulen la muerte celular. Sin embargo, Bad fosforilada no puede unirse a Bcl-2/Bcl-xL y se encuentra en el citosol acomplejando la proteína de unión a fosfoserina 14-3-3 (véase la Fig. 16-20).

Una cantidad de factores tróficos, incluyendo NGF, inducen la vía de señalización PI-3 cinasa y llevan a la activación de la proteína-kinasa B (véase la Fig. 12-26). La proteína-kinasa B fosforila a Bad en

FIGURA 21-39 Estructura del apoptosoma de nematodo y un modelo de la estructura del apoptosoma Apaf1 de mamífero.

(a) Dominios de la proteína CED-4 y el correspondiente Apaf1 de mamífero; las hebras CARD para el dominio de reclutamiento N-terminal de la caspasa. En el apoptosoma oligomérico, estos dominios CARD se unen a los dominios CARD en la caspasa. (b) Diagrama del apoptosoma CED-4 (*izquierda*) y un modelo para el apoptosoma de mamífero correspondiente (*derecha*). (c) Estructura tridimensional del apoptosoma CED-4 octamérico de nematodo que muestra la unión de dos procaspasas CED-3. La interacción del apoptosoma con CED-2 estimula la dimerización CED-3, que es necesaria para su activación. (De S. Qi y cols., 2010, *Cell* **141** 446.)



sitios que se sabe inhiben su actividad proapoptótica. Más aún, una forma constitutivamente activa de la proteínasa B puede rescatar neuronas privadas de neurotrofina que, de otro modo, podrían sufrir apoptosis y morir. Estos descubrimientos avalan el mecanismo para la acción de supervivencia de los factores tróficos descritos en la Figura 21-38. En otros tipos de células, diferentes factores tróficos pueden promover la supervivencia celular a través de modificaciones postraduccionales de otros componentes de la maquinaria de muerte celular.

La apoptosis de vertebrados está regulada por las proteínas proapoptóticas BH3-only que son activadas por estrés ambiental

Mientras que los gusanos contienen una única proteína BH3-only, Egl-1, los mamíferos expresan al menos ocho, incluyendo Bad, en una célula y de manera específica de estrés. Esta actividad proapoptótica está regulada por diversos mecanismos transcripcionales y postranscripcionales. Dos, Puma y Noxa (véase la Fig. 21-37), son transcripcionalmen-

te inducidas por la proteína p53 (véase la Fig. 19-33); esto es parte del punto de control por el cual el daño al DNA no reparado puede inducir apoptosis. Por el otro lado, normalmente Bim se encuentra secuestrada por el citoesqueleto de microtúbulos mediante la unión de una cadena ligera de dineína (véase la Fig. 18-23). El desprendimiento de las células de sus sustratos interrumpe la señalización de integrinas, los reordenamientos del citoesqueleto y lleva a la liberación de Bim. Tanto puma como Bim probablemente se unen en forma directa a Bak y Bam, de alguna manera liberándolas de Bcl-2 y permitiéndoles la formación del poro oligomérico Bak/Bax y la apoptosis (véase la Fig. 21-38). Así, la apoptosis de las células de mamífero está regulada por un equilibrio cuidadoso de las actividades de las proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 y Bcl-xL y múltiples proteínas proapoptóticas BH3-only.

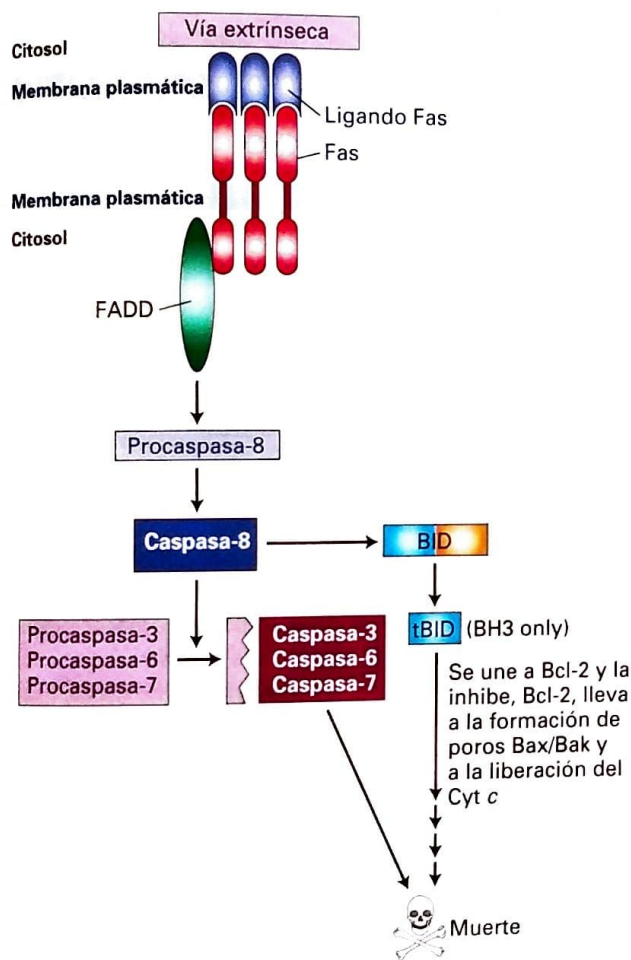


FIGURA 21-40 Asesinato celular: la vía apoptótica extrínseca. En este ejemplo de una vía extrínseca (o muerte regulada por receptor) que se encuentra en el sistema inmunitario, la unión del ligando Fas, FasL (también llamado ligando CD95-6) y sobre la superficie de una célula al receptor de muerte Fas sobre una célula adyacente conduce al reclutamiento de la proteína adaptadora FADD (dominio de muerte asociado a Fas) y la dimerización y activación de la caspasa-8. La caspasa-8 activa después corta los sustratos y activa la caspasa-3, la caspasa-6 y la caspasa-7, que luego corta los sustratos celulares vitales e induce la muerte celular. La escisión de la proteína BH3-only BID (agonista del dominio de muerte que interacciona con BH3) por parte de la caspasa-8 genera un fragmento t-BID que se une a Bcl-2 sobre la membrana mitocondrial externa, que lleva a la liberación del citocromo c dentro del citosol y también a la activación de la vía de apoptosis intrínseca (véase la Fig. 21-38). (Adaptado de P. Bouillet y L. O'Reilly, 2009, *Nat. Rev. Immunol.* 9:514)

El factor de necrosis tumoral y señales mortales relativas estimulan el asesinato celular mediante la activación de caspasas

Aunque la muerte celular puede surgir como un defecto en ausencia de factores de supervivencia, la apoptosis también puede ser estimulada positivamente por la acción de *señales mortales*. Por ejemplo, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), que es liberado por macrófagos, desencadena la muerte celular y la destrucción tisular observada en ciertas enfermedades inflamatorias crónicas (véase el Cap. 23). Otra señal importante inductora de muerte, el ligando Fas, es una proteína de la superficie celular producida por células *natural killer* activadas y por linfocitos T citotóxicos. Esta señal puede desencadenar la muerte de células infectadas por virus, algunas células tumorales y células foráneas injertadas.

Tanto TNF α como el ligando Fas (también llamado ligando CD95), descrito en la Figura 21-40, son proteínas presentes en la superficie de una célula que se une a receptores de muerte celular sobre una célula adyacente. Estos receptores tienen un único dominio transmembrana y son activados cuando la unión de un ligando oligomérico trae a la proximidad tres moléculas receptoras. El complejo de receptor Fas trimérico activado luego se une a una proteína citosólica llamada FADD (en inglés, *Fas-associated death domain*: dominio de muerte asociado a Fas) a la membrana celular, que luego sirve como un adaptador para reclutar y activar a la caspasa-6, una caspasa iniciadora. Al igual que la otra caspasa iniciadora, la caspasa-9, la caspasa-8 es activada por la dimerización seguida por la unión de dos moléculas a las proteínas FADD reclutadas a un trímero receptor activo. Una vez activada, la caspasa-8 activa diversas caspasas efectoras y comienza la cascada de amplificación.

La caspasa-8 también escinde la proteína BH3-only BID (agonista del dominio de muerte que interactúa con BH3). Luego, el fragmento t-BID resultante se une a Bcl-2 sobre la membrana mitocondrial externa, lo que lleva a la formación de un canal Bak/Bax y a la liberación del citocromo c al citosol; así también se produce la activación de la vía de apoptosis intrínseca (véase la Fig. 21-38).

Para evaluar la capacidad del receptor Fas para inducir la muerte celular, los investigadores incubaron células con anticuerpos contra el receptor. Se encontró que estos anticuerpos, que se unen y entrecruzan los receptores afines, estimulan la muerte celular, lo cual indica que la activación de estos receptores a través de la oligomerización es suficiente para desencadenar la apoptosis.

CONCEPTOS CLAVES de la Sección 21.4

Muerte celular y su regulación

- Todas las células requieren que los factores tróficos prevengan la apoptosis y así puedan sobrevivir. En ausencia de estos factores, las células mueren.
- Los estudios genéticos en *C. elegans* definieron una vía apoptótica evolutivamente conservada con tres componentes principales: proteínas reguladoras unidas a membrana, proteínas reguladoras citosólicas y proteasas efectoras llamadas caspasas en vertebrados (véase la Fig. 21-33).
- Una vez activada, la proteasa apoptótica corta sustrato intracelular específico que conduce al fallecimiento de una célula. Las proteínas

(p. ej., CED-4, Apaf-1) que unen proteínas reguladoras y caspasas son necesarias para la activación de estas últimas (véanse las Figs. 21-33, 21-34 y 21-39).

- La supervivencia de las neuronas motoras y sensitivas durante el desarrollo es mediada por las neurotrofinas liberadas a partir de las tejidos diana que se unen a los receptores de proteincinasa Trk sobre los conos de crecimiento nervioso (véase la Fig. 21-36), proceso que activa una respuesta antiapoptótica a través de la vía cinasa PI-3 (véase la Fig. 21-38).
- La familia Bcl-2 contiene tanto proteínas apoptóticas como antiapoptóticas; la mayoría son proteínas transmembranas de un paso único y están involucradas en interacciones proteína-proteína.
- En los mamíferos, la apoptosis se puede desencadenar por oligomerización de las proteínas Bax y Bak en la membrana mitocondrial externa, lo que lleva a un flujo de salida del citocromo *c* y de las proteínas SMAC/DIABLO al citosol; luego, estas estimulan la activación de las caspasas y la muerte celular.
- Las moléculas Bcl-2 pueden restringir la oligomerización de Bax y Bak, e inhibir así la muerte celular.
- Las proteínas proapoptóticas BH3-only (p. ej., Puma, Bad) son activadas por estrés ambiental y estimulan la oligomerización de Bax y Bak, lo cual permite que el citocromo *c* escape al citosol, la unión a Apaf-1 y, así, la activación de caspasa.
- Las interacciones directas entre las proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas conducen a la muerte celular en ausencia de factores tróficos. La unión de factores tróficos extracelulares puede desencadenar cambios en estas interacciones y dar como resultado la supervivencia celular (véase la Fig. 21-38).
- La unión de señales de muerte extracelulares, como el factor de necrosis tumoral y el ligando Fas, a sus receptores oligomeriza y activa una proteína asociada (FADD) que, a su vez, dispara la cascada de las caspasas y lleva a la muerte celular.

Perspectivas para el futuro

El nacimiento de una célula, la asimetría celular y la muerte celular, que se encuentran el corazón del desarrollo, el crecimiento y la curación de un organismo, también son fundamentales en los procesos de enfermedad, especialmente el cáncer. Por lo general, el nacimiento celular está restringido en ubicaciones y momentos específicos, como la capa basal de la piel o el meristemo de la raíz. El hígado se regenera cuando existe una lesión, pero el cáncer hepático se evita al restringir el crecimiento innecesario en otros momentos.

Algunas células persisten durante la vida del organismo, pero otras (como las células sanguíneas y las intestinales) se recambian rápidamente. Muchas células viven durante un momento y luego están programadas para morir y ser reemplazadas por otras que surgen a partir de una población de células madre. En la actualidad, se está brindando mucha atención a la regulación de las células madre en un esfuerzo por comprender cómo se crean y se mantienen las poblaciones celulares que se autorrenuevan. Esto tiene implicaciones claras para la reparación del tejido: por ejemplo, para restaurar las retinas dañadas, los cartílagos desgarrados, el tejido cerebral dañado o los órganos que fallan. Una posibilidad interesante es que algunas poblaciones de células ma-

dre con el potencial de generar o regenerar tejidos normalmente son eliminadas por muerte celular durante el desarrollo tardío. De ser así, hallar maneras de bloquear selectivamente estas células podría tornar más probable la regeneración. ¿Podría la eliminación de tales células durante el desarrollo de extremidades y un mamífero que no lo es? ¿capaz de la regeneración de extremidades y un mamífero que no lo es?

Las células ES e iPS continuarán proporcionando una gran cantidad de información acerca de las moléculas reguladoras (factores de transcripción, cromatina y enzimas que modifican el DNA, y RNA no codificante) y que permiten a estas células diferenciarse hacia linajes de desarrollo específicos. Pero el interés principal en estas células (al menos en la mente del público) es una fuente de tejido para reemplazar células en muchas enfermedades. Diversas patologías neurodegenerativas como el Alzheimer y el Parkinson podrían ser curadas si las células ES o iPS pudieran ser persuadidas a diferenciarse en cultivo en neuronas adecuadas y si pudiera hallarse un método para distribuir las células nerviosas hasta las regiones apropiadas del cerebro. De manera similar, las células ES y las iPS pueden formar glóbulos rojos de apariencia normal y otros tipos de células sanguíneas en cultivo, pero ¿son estas células verdaderamente normales y completamente funcionales? ¿Se puede desarrollar un protocolo de bioingeniería para sintetizar estas células con suficiente pureza y en cantidades adecuadas para el trasplante en seres humanos? Sin lugar a dudas, estos problemas, que son la interfase de la ingeniería de tejido y la biología celular y del desarrollo, se resolverán eventualmente; la cuestión es ¿cuán pronto?

La muerte celular programada es la base para la eliminación metódica de células potencialmente dañinas, como las células inmunitarias autorreactivas, que atacan a las células del propio cuerpo, o las neuronas que fallan en conectarse de manera adecuada. Los programas de muerte celular también han evolucionado como una defensa contra la infección, y las células infectadas con virus son asesinadas en forma selectiva en respuesta a señales mortales. Los virus, a su vez, dedican gran parte de su esfuerzo a evadir las defensas del huésped. Fallas en la muerte celular programada pueden llevar a un crecimiento canceroso descontrolado. Las proteínas que previenen la muerte de las células cancerosas se tornan de esta manera posibles dianas para los fármacos. Como se aprenderá en el Capítulo 24, muchos tumores contienen una mezcla de células, algunas capaces de sembrar nuevos tumores o continuar creciendo descontroladamente y algunas capaces solo de crecer en el lugar o durante un tiempo limitado. En este sentido, el tumor tiene sus propias células madre. En la actualidad, dichas células están siendo identificadas y estudiadas y están convirtiéndose en vulnerables a la intervención médica. Una opción es manipular la vía de la muerte celular al enviar señales que harán que las células cancerosas se destruyan a sí mismas.

Palabras clave

apoptosis 1007	célula somática 987
apoptosoma 1013	división celular asimétrica 977
caspasas 1009	división celular simétrica 977
célula madre 977	factor trófico 1 006
célula madre embrionaria (ES) 978	familia Bcl-2 1011
célula madre pluripotente inducida (iPS) 987	linaje celular 978
célula precursora (progenitora) 986	línea germinal 987
	meristemo 995
	muerte celular programada 979

nicho de célula madre 987
pluripotente 978
polaridad 997

polaridad celular plana (PCP) 1003
proteína BH3-only 1009
totipotente 977

Revisión de los conceptos

1. ¿Qué dos propiedades definen a una célula madre? Distinga entre una célula madre totipotente, una célula madre pluripotente y una célula precursora (progenitora).
2. ¿Dónde se localizan las células madre en las plantas? ¿Dónde se localizan las células madre en los animales adultos? ¿De qué forma difiere el concepto de célula madre entre los sistemas animal y vegetal?
3. En 1997, la oveja Dolly fue clonada mediante una técnica llamada transferencia nuclear de célula somática (o clonación por transferencia nuclear). Un núcleo de una célula de mamífero adulto se transfirió al interior de un óvulo a partir del cual se había extraído el núcleo previamente. Se permitió al óvulo dividirse varias veces en cultivo, luego el embrión se transfirió a una madre sustituta, quien parió a Dolly. La oveja clonada murió en 2003 después de aparearse y dar a luz a una descendencia viable. ¿Qué nos dice la creación de Dolly acerca del potencial del material derivado de una célula adulta totalmente diferenciada? ¿Nos dice algo la creación de Dolly acerca del potencial de una célula adulta, totalmente diferenciada e intacta?
4. Identifique si lo siguiente contiene células totipotentes, pluripotentes o multipotentes: (a) masa celular interna, (b) mórula, (c) embrión de ocho células, (d) trofoectodermo.
5. Verdadero o falso: las células somáticas diferenciadas tienen la capacidad de reprogramarse para convertirse en otros tipos de célula. Proporcione una línea de evidencia analizada en el capítulo que corrobore su respuesta.
6. Explique cómo las células madre intestinales se identificaron primero y luego se estableció experimentalmente que eran células madre multipotentes.
7. Explique cómo se demostró experimentalmente que las células madre hematopoyéticas eran tanto pluripotentes como capaces de autorrenovación.
8. El gusano *C. elegans* ha probado ser un organismo modelo valioso para estudios de nacimiento celular, asimetría celular y muerte celular. ¿Qué propiedades de *C. elegans* lo tornan tan adecuado para estos estudios? ¿Por qué los investigadores interesados en el desarrollo de mamífero utilizan tanta información de los experimentos de *C. elegans*?
9. La división celular asimétrica suele apoyarse en los elementos del citoesqueleto para generar o mantener la distribución asimétrica de los factores celulares. En *S. cerevisiae*, ¿qué factor se localiza en el brote por los motores de miosina? En los neuroblastos de *Drosophila*, ¿qué factores se localizan apicalmente mediante los microtúbulos?
10. Analice el papel de los genes *par* en la generación de la polaridad A-P en el embrión de *C. elegans*.
11. ¿De qué forma los estudios del desarrollo del cerebro en los ratones inactivados (*knockout*) avalan el enunciado de que la apoptosis es una vía por defecto en las células neuronales?

12. Compare y contraste la muerte celular por apoptosis y necrosis.
13. Identifique y enumere las funciones de las tres clases generales de proteínas que controlan la muerte celular.
14. Basado en su entendimiento de los acontecimientos que rodean la muerte celular, prediga el o los efectos de lo siguiente sobre la capacidad de una célula para sufrir apoptosis:
 - a. CED-9 funcional; CED-3 no funcional
 - b. Bax activo y citocromo c; caspasa-9 no funcional
 - c. PI-3 cinasa inactiva; Bad activa
15. TNF y el ligando Fas se unen a receptores de la superficie celular para desencadenar la muerte celular. Aunque la señal de muerte es generada externamente a la célula, ¿por qué consideramos la muerte inducida por estas moléculas apoptótica en lugar de necrótica?
16. Prediga los efectos de las siguientes mutaciones sobre la capacidad de una célula de sufrir apoptosis:
 - a. Mutación en Bad tal que no pueda ser fosforilada por la proteína-quinasa B (PKB)
 - b. Sobreexpresión de Bcl-2
 - c. Mutación en Bax tal que no pueda formar hemodímeros

Una característica común de las células cancerosas es una pérdida de función en la vía apoptótica. ¿Cuál de estas mutaciones enumeradas arriba esperaría usted encontrar en algunas células cancerosas?

17. ¿Cómo interactúan los IAP (inhibidor de proteínas apoptóticas) con las caspasas para evitar la apoptosis? ¿De qué forma interactúan las proteínas mitocondriales con los IAP para evitar la inhibición de la apoptosis?

Referencias

Desarrollo temprano en metazoos y células madre embrionarias

- Boyer, L., D. Mathur, and R. Jaenisch. 2006. Molecular control of pluripotency. *Curr. Opin. Genetics Dev.* 16:455-462.
- Graf, T., and T. Enver. 2009. Forcing cells to change lineages. *Nature* 462:587-594.
- Hanna, J., K. Saha, and R. Jaenisch. 2010. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell* 143:508-525.
- Mallanna, S., and A. Rizzino. 2010. Emerging roles of microRNAs in the control of embryonic stem cells and the generation of induced pluripotent stem cells. *Dev. Biol.* 344:16-25.
- Melton, C., R. Judson, and R. Bielech. 2010. Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Nature* 463:621.
- Orkin, S., and K. Hochedlinger. 2011. Chromatin connections to pluripotency and cellular reprogramming. *Cell* 145:835-850.
- Surface, L., S. Thornton, and L. Boyer. 2010. Polycomb group proteins set the stage for early lineage commitment. *Cell Stem Cell* 7:288-298.
- Viswanathan, S., et al. 2008. Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science* 320:97-100.
- Young, R. 2011. Control of the embryonic stem cell state. *Cell* 144:940-954.

Células madre y nichos en organismos multicelulares

- Birchmeier, W. 2011. Stem cells: orphan receptors find a home. *Nature* 476:287.
- Copelan, E. A. 2006. Hematopoietic stem-cell transplantation. *N. Engl. J. Med.* 354:1813-1826.

Golden, J. A., S. C. Fields-Berry, and C. L. Cepko. 1995. Construction and characterization of a highly complex retroviral library for lineage analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:5704-5708.

He, S., D. Nakada, and S. Morrison. 2009. Mechanisms of stem cell self-renewal. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **25**:377-406.

Li, L., and T. Xie. 2005. Stem cell niche: structure and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**:605-631.

Mendez-Ferrer, S., et al. 2011. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* **466**:829-834.

Morrison, S. J., and J. Kimble. 2006. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* **441**:1068-1074.

Novershtern, N., et al. 2011. Densely interconnected transcriptional circuits control cell states in human hematopoiesis. *Cell* **144**:296-309.

Sablowski, R. 2011. Plant stem cell niches: from signalling to execution. *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**:4-9.

Scheres, B. 2007. Stem-cell niches: nursery rhymes across kingdoms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**:345-354.

Suh, H., W. Deng, and P. Gage. 2009. Signaling in adult neurogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **25**:253-275.

van der Flier, L. G., and H. Clevers. 2009. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu. Rev. Physiol.* **71**:241-260.

Zhang, C., and H. Lodish. 2008. Cytokine regulation of hematopoietic stem cell function. *Curr. Opin. Hematol.* **15**:307-311.

Mecanismos de polaridad celular y división celular asimétrica

Axelrod, J. D., and C. J. Tomlin. 2011. Modeling the control of planar cell polarity. *Wiley Interdisc. Revs. Sys. Biol. Med.* **3**:588-605.

Cabernard C, and C. Q. Doe. 2009. Apical/basal spindle orientation is required for neuroblast homeostasis and neuronal differentiation in *Drosophila*. *Dev. Cell* **17**:134-141.

Knoblich, J. A. 2008. Mechanisms of asymmetric stem cell division. *Cell* **132**:583-597.

Li, R., and B. Bowerman, eds. 2010. *Symmetry Breaking in Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Li, R., and G. G. Gundersen. 2008. Beyond polymer polarity: how the cytoskeleton builds a polarized cell. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**:860-873.

Mellman, I., and W. J. Nelson. 2008. Coordinated protein sorting, targeting and distribution in polarized cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**:833-845.

Morrison, S. J., and J. Kimble. 2006. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* **441**:1068-1074.

Nelson, W. J. 2003. Adaption of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature* **422**:766-774.

Shivas, J. M., H. A. Morrison, D. Bilder, and A. R. Skop. 2010. Polarity and endocytosis: reciprocal regulation. *Trends in Cell Biol.* **20**:445-452.

Siller, K. H., and C. Q. Doe. 2009. Spindle orientation during asymmetric cell division. *Nat. Cell Biol.* **11**:365-374.

St. Johnston, D., and J. Ahringer. 2010. Cell polarity in eggs and epithelia: parallels and diversity. *Cell* **141**:757-774.

Zallen, J. A. 2007. Planar polarity and tissue morphogenesis. *Cell* **129**:1051-1063.

Muerte celular y su regulación

Adams, J. M., and S. Cory. 2007. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Curr. Opin. Immunol.* **19**:488-496.

Baehrecke, E. H. 2002. How death shapes life during development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**:779-787.

Bouillet, P., and L. A. O'Reilly. 2009. CD95, BIM and T cell homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* **9**:514-519.

Giam, M., D. C. Huang, and P. Bouillet. 2008. BH3-only proteins and their roles in programmed cell death. *Oncogene* **27**(suppl. 1):S128-136.

Hay, B. A., and M. Guo. 2006. Caspase-dependent cell death in *Drosophila*. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **22**:623-650.

Lakhani, S. A., et al. 2006. Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science* **10**:847-851.

Martin, S. 2010. Opening the cellular poison cabinet. *Science* **330**:1330-1331.

Peter, M. 2011. Apoptosis meets necrosis. *Nature* **471**:311-312.

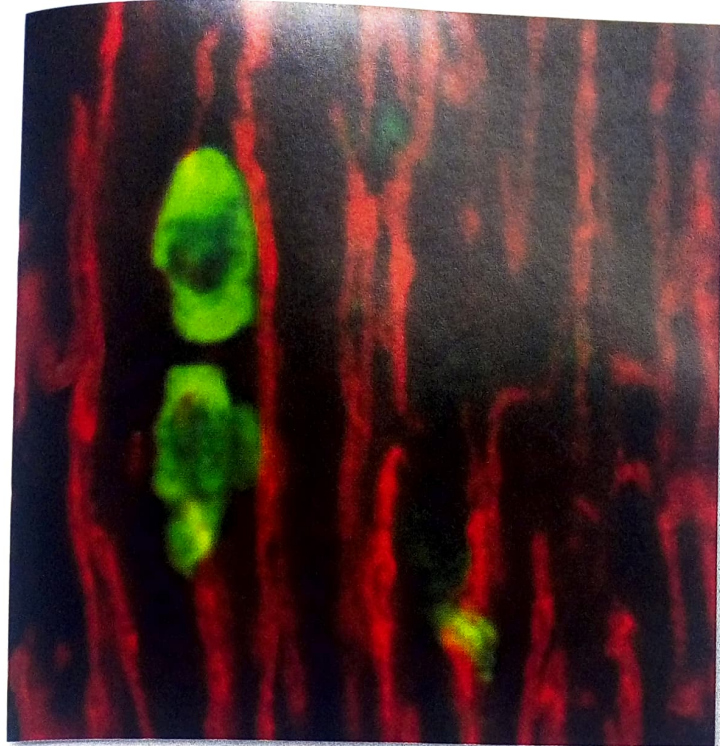
Riedl, S. J., and G. Salvesen. 2007. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**:405-413.

Ryoo, H. D., and E. H. Baehrecke. 2010. Distinct death mechanisms in *Drosophila* development. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**:889-895.

Schafer, Z. T., and S. Kornbluth. 2006. The apoptosome: physiological, developmental, and pathological modes of regulation. *Devel. Cell* **10**:549-561.

Teng, X., and J. Hardwick. 2010. The apoptosome at high resolution. *Cell* **141**:402-404.

Yan, N., et al. 2005. Structure of the CED-4-CED-9 complex provides insights into programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **437**:831-837.



Dos tipos principales de células en el sistema nervioso central: neuronas (rojo) y células gliales (verde). En esta imagen del desarrollo del nervio óptico de ratón, los axones están teñidos con un anticuerpo contra un componente principal de la mielina, la proteína básica de mielina, que rodea los largos axones. Los oligodendrocitos son un tipo de célula glial que produce la capa de mielina, y están teñidos con un anticuerpo específico para el inhibidor de β -catenina en la poliposis adenomatosa colónica. (From B. Emery, 2010, *Science* **330**:779).

Células nerviosas

El sistema nervioso regula todas las funciones del cuerpo y es asombroso en su complejidad. El cerebro humano adulto (el centro de control que almacena, calcula, integra y transmite información) pesa 1,3 kg y contiene alrededor de 10^{11} células nerviosas, llamadas neuronas. Estas neuronas están interconectadas por unas 10^{14} sinapsis, los puntos de unión en donde dos o más neuronas se comunican. Millones de neuronas especializadas detectan características de los medios externos e internos de los organismos y transmiten esta información al cerebro para su procesamiento y almacenamiento. Millones de otras neuronas regulan la contracción de los músculos y la secreción de hormonas. El sistema nervioso también contiene células de la glía, las cuales ocupan el espacio entre las neuronas y modulan sus funciones.

A pesar de los múltiples tipos y formas de neuronas que se encuentran en los metazoos, todas las células del sistema nervioso com-

parten muchas propiedades comunes. La estructura y función de las células nerviosas se entiende con gran detalle, quizás con más precisión que cualquier otro tipo de célula. La función de una neurona es comunicar información, lo que hace por dos métodos. Las *señales eléctricas* procesan y llevan información dentro de las neuronas, las cuales usualmente son células muy alargadas (Fig. 22-1). Los pulsos eléctricos que viajan a lo largo de las neuronas se llaman potenciales de acción, y la información se codifica como la frecuencia a la que estos potenciales se disparan. Debido a la velocidad de transmisión eléctrica, las neuronas son campeonas en la transducción de señales, mucho más rápidas que las células que secretan hormonas. En contraste con las señales eléctricas que llevan información *dentro* de una neurona, las *señales químicas* transmiten información *entre* células, utilizando procesos similares a aquellos empleados por otros tipos de células señalizadoras (Caps. 15 y 16).

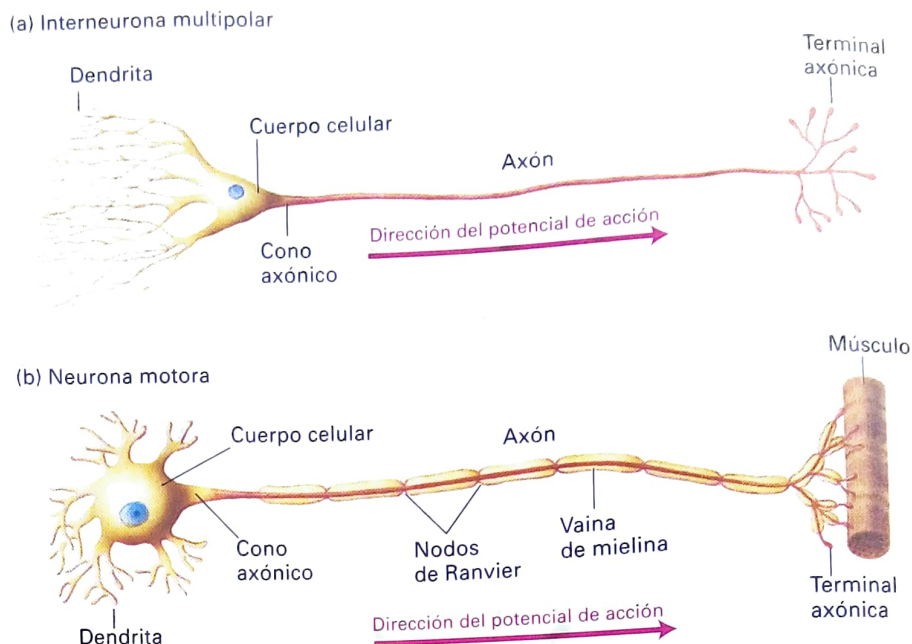
CONTENIDO

22.1 Neuronas y glía: componentes básicos del sistema nervioso	1020
22.2 Canales iónicos regulados por voltaje y la propagación de potenciales de acción	1025

22.3 Comunicación en las sinapsis	1036
22.4 Percibiendo el entorno: tacto, dolor, gusto y olfato	1047

FIGURA 22-1 Morfología típica de dos tipos de neuronas de mamíferos. Los potenciales de acción surgen en el cono axónico y son conducidos hacia la terminal axónica.

(a) Una interneurona multipolar tiene dendritas profusamente ramificadas, las cuales reciben señales en las sinapsis con varios cientos de otras neuronas. Pequeños cambios en el voltaje impartidos por señales de entrada en las dendritas pueden sumarse para originar un potencial de acción masivo, el cual comienza en el cono. Un único axón largo que se ramifica lateralmente en su terminal transmite señales a otras neuronas. (b) Típicamente, una neurona motora que inerva una célula muscular tiene un único axón largo que se extiende desde el cuerpo celular hasta la célula efectora. En neuronas motoras de mamíferos, una vaina de mielina aislante usualmente recubre todas las partes del axón excepto en los nodos de Ranvier y la terminal axónica. La vaina de mielina está compuesta de células llamadas glía.



En conjunto, la señalización eléctrica y química del sistema nervioso le permite detectar estímulos externos, integrar y procesar la información recibida, enviarla a centros cerebrales superiores y generar una respuesta apropiada. Por ejemplo, las *neuronas sensoriales* tienen receptores especializados que convierten distintos tipos de estímulo del entorno (esto es, luz, tacto, sonido, olores) en señales eléctricas. A continuación, estas se convierten en señales químicas que se transmiten a otras células llamadas *interneuronas*, las cuales transforman la información nuevamente a señales eléctricas. Por último, la información es transmitida a *neuronas motoras* que estimulan los músculos o a otras neuronas que estimulan otros tipos de células, como glándulas.

En este capítulo nos centraremos en la neurobiología a nivel celular y molecular. Comenzaremos observando la arquitectura general de las neuronas y cómo transportan señales. A continuación, nos centraremos en el flujo de iones, proteínas de canal y propiedades de membrana: cómo los pulsos eléctricos se mueven rápidamente a lo largo de las neuronas. En tercer lugar, examinaremos la comunicación entre neuronas: las señales eléctricas que viajan a lo largo de una célula deben ser traducidas a un pulso químico entre células y luego nuevamente a una señal eléctrica en las células receptoras. En la última sección examinaremos las neuronas en varios tejidos sensoriales, incluyendo aquellos que median nuestros sentidos del tacto, el gusto y el olfato. La velocidad, la precisión y el poder integrador de la señalización neuronal permiten la percepción sensorial precisa y oportuna de un entorno que cambia rápidamente.

Una gran cantidad de información sobre células nerviosas ha sido obtenida a partir del estudio de humanos, ratones, nematodos y familias con mutaciones que afectan funciones específicas del sistema nervioso. Además, la clonación molecular y el análisis estructural de proteínas neuronales clave, tales como canales iónicos regulados por voltaje y receptores, han ayudado a elucidar la maquinaria celular subyacente a funciones cerebrales complejas como el instinto, el aprendizaje, la memoria y las emociones.

22.1 Neuronas y glía: componentes básicos del sistema nervioso

En esta sección damos una mirada inicial a la estructura de las neuronas y cómo estas propagan señales eléctricas y químicas. Las neuronas se distinguen por su forma alargada y asimétrica, por la localización precisa de sus proteínas y orgánulos y sobre todo por un grupo de proteínas que controla el flujo de iones a través de la membrana plasmática. Debido a que una neurona puede responder a las señales de entrada de múltiples neuronas, generar señales eléctricas y transmitirlas a múltiples neuronas, un sistema nervioso tiene poderes considerables de análisis de señales. Por ejemplo, una neurona podría pasar una señal solo si recibe cinco señales activadoras simultáneas de neuronas de entrada. La neurona receptora mide la cantidad total de señal entrante y si las cinco señales están aproximadamente sincronizadas. La señal de entrada de una neurona a otra puede ser excitadora (se combina con otras señales para disparar la transducción eléctrica en la célula receptora) o inhibidora (descarta dicha transmisión). Así, las propiedades y conexiones de neuronas individuales sientan las bases para la integración y el refinamiento de la información, y la señal de salida de un sistema nervioso es el resultado de las propiedades de su circuito, esto es, la red neuronal o interconexiones entre neuronas y la fuerza de estas interconexiones. Comenzaremos viendo cómo se reciben y se envían las señales, y en partes subsiguientes del capítulo veremos los detalles moleculares de la maquinaria involucrada.

La información fluye a través de las neuronas desde las dendritas hacia los axones

Las neuronas surgen a partir de precursores de neuroblastos más o menos esféricos. Las neuronas recién nacidas pueden migrar largas distancias antes de llegar a ser células dramáticamente alargadas. Las neuronas plenamente diferenciadas pueden tomar muchas formas, pero por lo general comparten ciertas características clave (véase Fig. 22-1). El nú-

cleo se encuentra en una parte redondeada de la célula llamada cuerpo celular. Los procesos de ramificación celular llamados dendritas (del griego *dendron*, árbol) se encuentran en un extremo y son las estructuras principales en las cuales se reciben las señales desde otras neuronas vía sinapsis. Las señales entrantes también se reciben en sinapsis en los cuerpos celulares neuronales. Con frecuencia, las neuronas tienen dendritas extremadamente largas con ramas complejas, en particular en el sistema nervioso central (es decir, el cerebro y la médula espinal). Esto les permite formar sinapsis con, y recibir señales desde, un gran número de otras neuronas, hasta decenas de miles. De este modo, las ramas dendríticas convergentes permiten que las señales de muchas células sean recibidas e integradas por una única neurona.

Cuando una neurona se diferencia por primera vez, el extremo de la célula opuesto a las dendritas sufre un crecimiento dramático hacia afuera para formar un brazo largo extendido llamado **axón**, el cual es esencialmente un cable de transmisión. El crecimiento de los axones debe ser controlado para que se formen conexiones apropiadas, un proceso complejo llamado direccionamiento axónico que involucra cambios dinámicos en el citoesqueleto y que se analiza en la **Sección 18.8**. Los diámetros de los axones varían desde solo un micrómetro en algunas neuronas del cerebro humano hasta un milímetro en la fibra gigante del calamar. Los axones pueden tener metros de longitud (p. ej., en los cuellos de las jirafas), y a menudo están en parte cubiertos con un aislante eléctrico llamado **vaina de mielina** (véase Fig. 22-1b), la cual está formada por células llamadas glía. El aislamiento acelera la transmisión eléctrica y previene los cortocircuitos. Los extremos cortos y ramificados del axón en el extremo de la neurona opuesto a las dendritas son denominados **terminal axónica**. Aquí es donde las señales se transmiten a la siguiente neurona o a otro tipo de célula, tal como una célula muscular o secretora de hormonas. La asimetría de la neurona, con dendritas en un extremo y una terminal axónica en el otro, es indicativa del flujo unidireccional de la información desde las dendritas hacia los axones.

La información se mueve a lo largo de los axones en forma de pulsos de flujo de iones llamados potenciales de acción

Las células nerviosas son miembros de una clase de **células excitables** que también incluye células musculares, células en el páncreas y algunas otras. Como todas las células de metazoos, las excitables tienen un voltaje interno negativo o gradiente de potencial eléctrico a través de sus membranas plasmáticas, el **potencial de membrana** (véase Cap. 11). En células excitables, este potencial puede convertirse repentinamente en cero o incluso revertirse, con el interior de la célula positivo respecto del exterior de la membrana plasmática. El voltaje de membrana en una neurona típica, llamado **potencial de reposo** debido a que es el estado en el que no hay señal en tránsito, se establece por bombas iónicas de Na^+/K^+ en la membrana plasmática. Estas son las mismas bombas de iones utilizadas por otras células para generar un potencial de reposo. Las bombas de iones Na^+/K^+ usan energía en forma de ATP para mover iones Na^+ positivamente cargados hacia afuera de la célula e iones K^+ hacia el interior. El subsiguiente movimiento de K^+ hacia afuera de la célula a través de canales de K^+ en reposo resulta en una carga neta negativa dentro de la célula en comparación con el exterior. El potencial de reposo típico de una neurona es de alrededor de -60 mV.

Las neuronas tienen un lenguaje propio. Utilizan sus propiedades eléctricas únicas para enviar señales que toman la forma de breves cam-

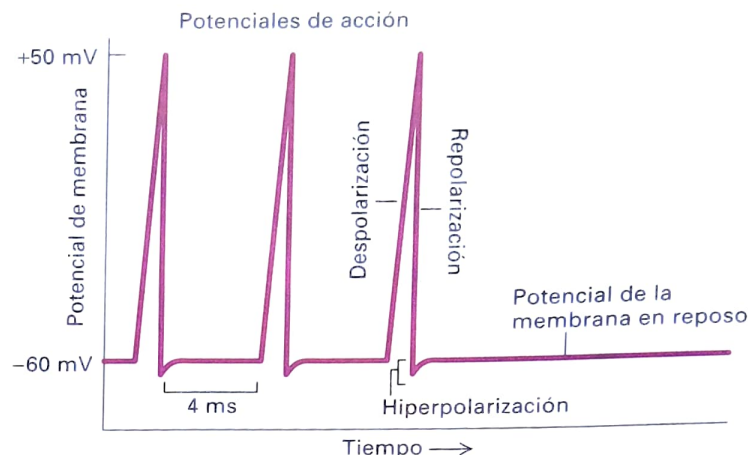


FIGURA EXPERIMENTAL 22-2 El registro de un potencial de membrana axónico a lo largo del tiempo revela la amplitud y frecuencia de los potenciales de acción.

Un potencial de acción es una despolarización repentina y transitoria de la membrana, seguida de repolarización al potencial de reposo de aproximadamente -60 mV. El potencial de membrana del axón puede ser medido con un pequeño electrodo colocado dentro de este (véase Fig. 11-19). Este registro muestra a la neurona generando un potencial de acción aproximadamente cada 4 milisegundos.

bios en el voltaje local desde un interior negativo a un interior positivo, evento denominado **despolarización**. Una poderosa oleada de un cambio de voltaje despolarizante, moviéndose de un extremo de la neurona hacia el otro, se llama **potencial de acción**. “Despolarización” es un nombre un tanto ambiguo, ya que la neurona repentinamente pasa de ser negativa en el interior a neutral o positiva en el interior, lo cual puede describirse con mayor precisión como despolarización seguida de la polarización opuesta (Fig. 22-2). En el pico de un potencial de acción, el potencial de membrana puede ser de hasta $+50$ mV (interior positivo), una carga neta de alrededor de 110 mV. Como veremos con mayor detalle en la **Sección 22.2**, un potencial de acción se mueve a lo largo del axón hacia la terminal axónica a velocidades de más de 100 metros por segundo. En los seres humanos, por ejemplo, los axones pueden tener más de un metro de largo; sin embargo, se necesitan solo unos pocos milisegundos para que un potencial de acción se mueva a lo después de su longitud. Las neuronas pueden disparar repetidamente después de un breve período de recuperación, por ejemplo, cada 4 milisegundos (ms), como en la **Figura 22-2**. Después de que el potencial de acción pasa un sector de la neurona, las proteínas de canal y las bombas restauran el potencial de reposo negativo interno (**repolarización**). El proceso de restauración persigue al potencial de acción por el axón hasta la terminal y deja a la neurona lista para enviar nuevamente una señal.

Los potenciales de acción son “todo o nada”. Una vez que el umbral para comenzar uno es alcanzado, ocurre un disparo completo. Por lo tanto, la información de la señal se lleva principalmente no por la intensidad de los potenciales de acción, sino por la sincronización y la frecuencia de estos.

Algunas células excitables no son neuronas. La contracción muscular se dispara por neuronas motoras que hacen sinapsis directamente con células musculares excitables (véase Fig. 22-1b). La secreción de insulina de las células beta del páncreas se dispara por neuronas. En ambos casos, el evento de activación involucra la apertura de canales de membrana plasmática que causan cambios en el flujo transmembrana de iones y en las propiedades eléctricas de las células reguladas.

La información fluye entre neuronas vía sinapsis

¿Qué es lo que da inicio a un potencial de acción? Las terminales axónicas de una neurona están ubicadas muy cercanamente y opuestas a las dendritas de otra, en uniones llamadas sinapsis químicas o simplemente **sinapsis** (Fig. 22-3).

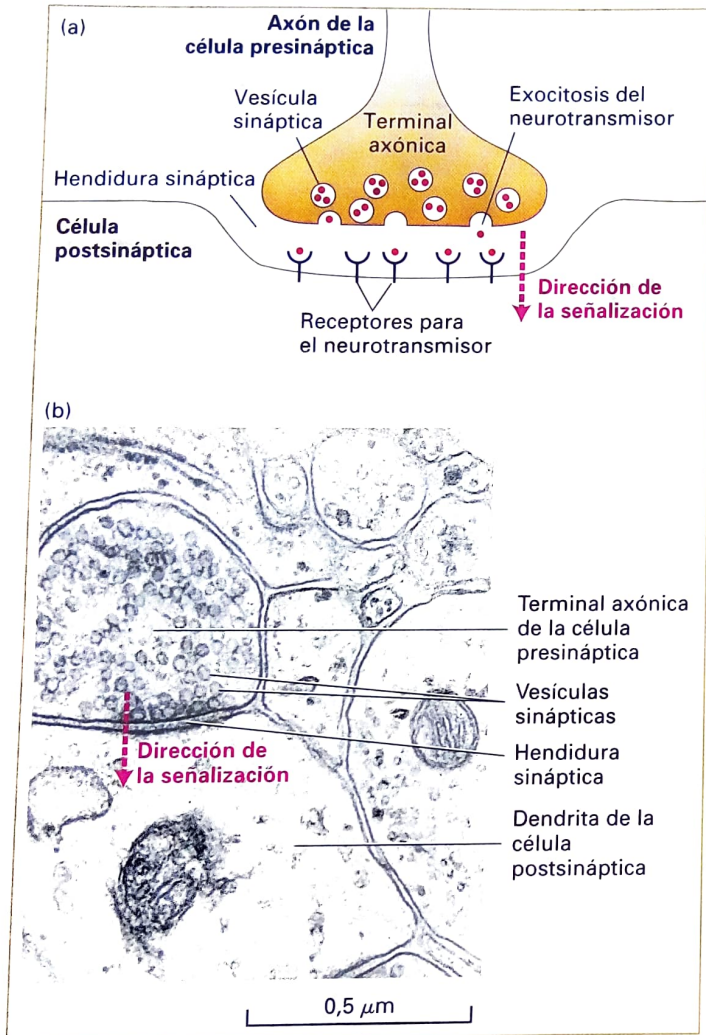


FIGURA 22-3 Una sinapsis química. (a) Una región angosta (la hendidura sináptica) separa las membranas plasmáticas de las células presináptica y postsináptica. La llegada de potenciales de acción en una célula presináptica causa la exocitosis en una sinapsis de un pequeño número de vesículas sinápticas y libera su contenido de neurotransmisores (círculos rojos). Tras su difusión a través de la hendidura sináptica, los neurotransmisores se unen a receptores específicos en la membrana plasmática de la célula postsináptica. Estas señales despolarizan la membrana postsináptica (volviendo el potencial en el interior menos negativo) y tienden a inducir un potencial de acción en la célula, o hiperpolarizan la membrana postsináptica (volviendo el potencial en el interior más negativo) e inhiben la inducción de un potencial de acción. (b) Micrografía electrónica que muestra una dendrita haciendo sinapsis con una terminal axónica llena de vesículas sinápticas. En la región sináptica, la membrana plasmática de la célula presináptica está especializada para la exocitosis de vesículas; las vesículas sinápticas que contienen neurotransmisor están agrupadas en estas regiones. La membrana opuesta de la célula postsináptica (en este caso, una neurona) contiene receptores para el neurotransmisor. (Parte (b) de C. Raine y cols., eds., 1981, *Basic Neurochemistry*, 3d ed., Little, Brown, p. 32).

Las terminales axónicas de la *célula presináptica* contienen muchas vesículas pequeñas, denominadas **vesículas sinápticas**, cada una de las cuales tiene un único tipo de molécula pequeña conocida como **neurotransmisor**. La llegada de un potencial de acción a una terminal desencadena la exocitosis de un pequeño número de vesículas sinápticas que libera su contenido de moléculas de neurotransmisor.

Los neurotransmisores difunden a través de la sinapsis en alrededor de 0,5 ms y se unen a receptores en la dendrita de la neurona adyacente. La unión de un neurotransmisor dispara la apertura o el cierre de canales iónicos específicos en la membrana plasmática de *dendritas de células postsinápticas*, lo cual conduce a cambios en el potencial de membrana en esta área localizada de la célula postsináptica. Por lo general, estos cambios despolarizan la membrana postsináptica (haciendo el potencial interno menos negativo). La despolarización local, si es lo suficientemente grande, desencadena un potencial de acción en el axón. La transmisión es unidireccional, desde la terminal del axón de la célula presináptica hacia las dendritas de la célula postsináptica.

En algunas sinapsis, el efecto de los neurotransmisores es el de hiperpolarizar y, consecuentemente, disminuir la probabilidad de un potencial de acción en la célula postsináptica. Un único axón en el sistema nervioso central puede hacer sinapsis con muchas neuronas e inducir respuestas en todas ellas simultáneamente. Por el contrario, algunas veces múltiples neuronas deben actuar casi de forma sincronizada sobre la célula postsináptica para tener un impacto lo suficientemente grande como para desencadenar un potencial de acción. La integración neuronal de las señales de despolarización e hiperpolarización determina la probabilidad de un potencial de acción.

De este modo, las neuronas utilizan una combinación de transmisión eléctrica extremadamente rápida *a lo largo* del axón con una comunicación química rápida *entre* células. Ahora vamos a ver cómo una cadena de neuronas, un circuito, puede lograr una función útil.

El sistema nervioso utiliza circuitos de señalización compuestos por múltiples neuronas

En animales multicelulares complejos, tales como insectos y mamíferos, las neuronas forman circuitos de señalización que son contruidos utilizando tres clases básicas de células nerviosas: neuronas aferentes, interneuronas y neuronas eferentes. Las **neuronas aferentes**, también conocidas como sensoriales o receptoras, transportan impulsos nerviosos desde receptores u órganos sensoriales *hacia* el sistema nervioso central (el cerebro y la médula espinal). Estas neuronas informan un evento que ya ha ocurrido, como la llegada de un flash de luz o el movimiento de un músculo. Un toque o un estímulo doloroso crea una sensación en el cerebro solamente después de que la información sobre el estímulo viaja hasta allí a través de rutas nerviosas aferentes. Las **neuronas eferentes**, también conocidas como efectoras, transportan impulsos nerviosos *lejos* del sistema nervioso central para generar una respuesta. Por ejemplo, una *neurona motora* transporta una señal a un músculo para estimular su contracción (véase Fig. 22-1b); otras neuronas efectoras estimulan la secreción de hormonas por células endocrinas. Las **interneuronas**, el grupo más grande, transmiten las señales de neuronas aferentes a neuronas eferentes y a otras interneuronas como parte de una vía neuronal. Una interneurona puede conectar con múltiples neuronas permitiendo así la integración o divergencia de señales, extendiendo algunas veces el alcance de una señal.

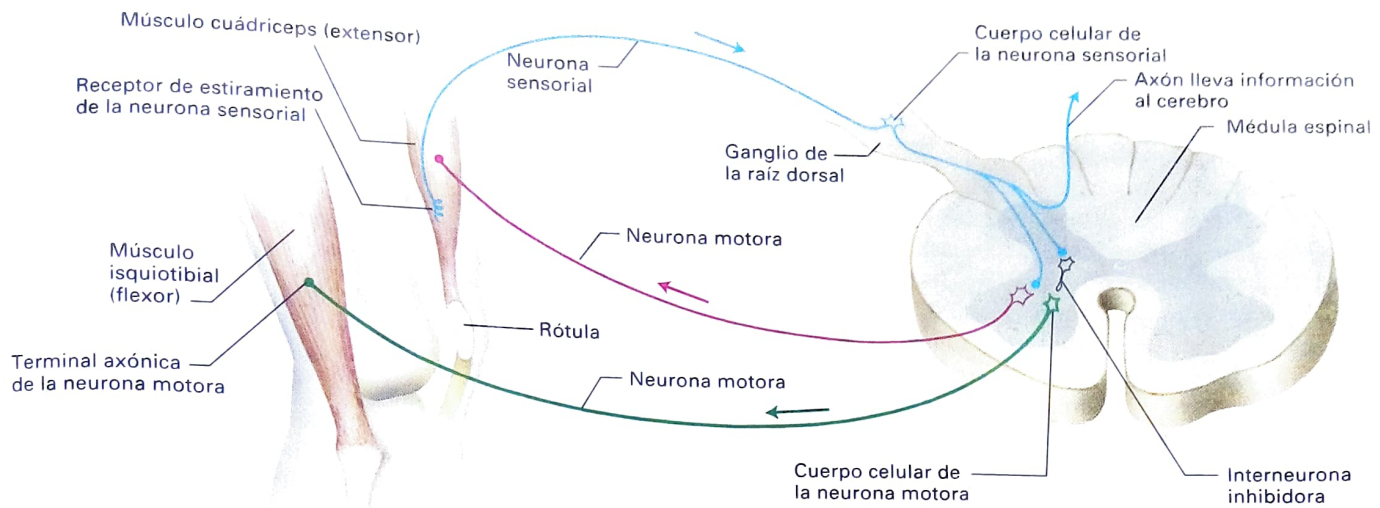


FIGURA 22-4 El reflejo rotuliano. Un pequeño golpe de martillo estira el músculo cuádriceps, y de este modo dispara actividad eléctrica en la neurona sensorial del receptor de estiramiento. El potencial de acción, viajando en la dirección de la flecha superior azul, envía señales hacia el cerebro para que seamos conscientes de lo que está sucediendo, y también hacia dos tipos de células en el ganglio de la raíz dorsal que está localizado en la médula espinal. Una célula, una neurona motora que se conecta de regreso con el cuádriceps (rojo), estimula la contracción muscular de manera que patee a la persona

que martilló tu rodilla. La segunda conexión activa, o "excita", una interneurona inhibidora (negro). La interneurona tiene un efecto de amortiguación que bloquea la actividad por medio de una neurona motora flexora (verde) que podría, en otras circunstancias, activar los músculos isquiotibiales opuestos al cuádriceps. De esta forma, la relajación de los isquiotibiales está acoplada a la contracción de los cuádriceps. Este es un reflejo debido a que el movimiento no requiere de una decisión consciente.

En un tipo simple de circuito llamado *arco reflejo*, las interneuronas conectan múltiples neuronas sensoriales y motoras, lo que permite que una neurona sensorial afecte a múltiples neuronas motoras y que una neurona motora sea afectada por múltiples neuronas sensoriales; de este modo, las interneuronas integran y potencian los reflejos. Por ejemplo, el reflejo rotuliano en seres humanos, ilustrado en la **Figura 22-4**, implica un complejo arco reflejo en el cual un músculo es estimulado para contraerse mientras que otro inhibe su contracción. El reflejo también envía información al cerebro para anunciar lo que ha ocurrido. Tales circuitos permiten que un organismo responda a una señal sensorial de entrada a través de la acción coordinada de conjuntos de músculos que, juntos, logran un solo propósito.

Sin embargo, estos circuitos de señalización simple no explican directamente las funciones cerebrales superiores como el razonamiento, la capacidad de cálculo y el desarrollo de la memoria. En el cerebro, las neuronas típicas reciben señales de hasta un millar de otras neuronas y, a su vez, pueden dirigir señales químicas a muchas otras. La señal de salida del sistema nervioso central depende de las propiedades de su circuito: la cantidad de redes, o interconexiones, entre neuronas y la fuerza de estas interconexiones. Los aspectos complejos del sistema nervioso, como la visión y la conciencia, no pueden ser entendidos a nivel de una sola célula, sino solo a nivel de redes de células nerviosas que pueden ser estudiadas mediante técnicas de análisis de sistemas. El sistema nervioso está cambiando constantemente; las alteraciones en el número y naturaleza de las interconexiones entre neuronas individuales ocurren, por ejemplo, en la formación de nuevas memorias.

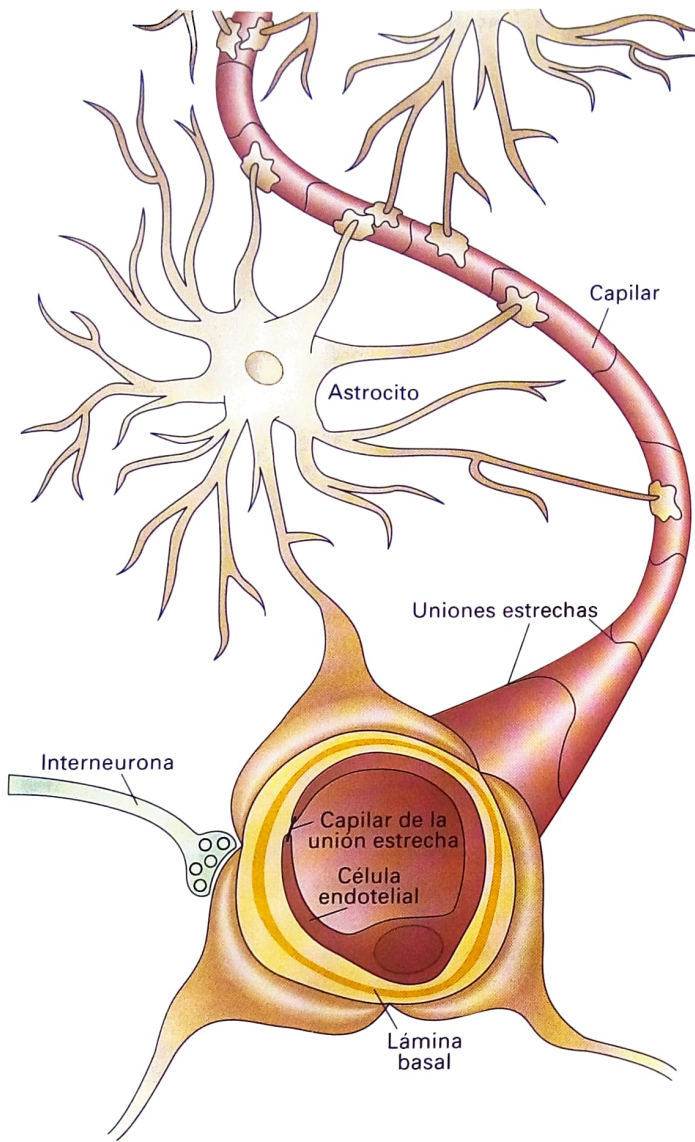
Las células de la glía forman vainas de mielina y sostienen a las neuronas

Pese a toda la espectacularidad de las neuronas, son una población minoritaria de células en el cerebro humano. Las **células gliales** (también

conocidas como *neuroglía* o simplemente *glía*), las cuales desempeñan muchos papeles en el cerebro pero no conducen por sí mismas impulsos eléctricos, superan en número a las neuronas en alrededor de 10 a 1. De los tres tipos principales de glía, dos producen vainas de mielina, el aislante que rodea los axones neuronales (véase **Fig. 22-1b**): los *oligodendrocitos* producen vainas para el sistema nervioso central (SNC), y las *células de Schwann* las producen para el sistema nervioso periférico (SNP). Ambos tipos de glía se analizan con mayor detalle en la **Sección 22.2**. Los *astrocitos*, un tercer tipo de glía, proporcionan a las neuronas factores de crecimiento y otras señales, reciben señales de neuronas e inducen la formación de sinapsis entre neuronas.

Los **astrocitos**, llamados así por su forma similar a una estrella (**Fig. 22-5**), constituyen más de un tercio de la masa del cerebro y la mitad de las células cerebrales. Los astrocitos rodean muchas sinapsis y dendritas; los canales de Ca^{2+} , K^{+} , Na^{+} y Cl^{-} encontrados en las membranas plasmáticas de astrocitos influyen la concentración de iones libres en el espacio extracelular; por lo tanto, afectan los potenciales de membrana de las neuronas y de los astrocitos mismos. Estos últimos producen abundantes proteínas de matriz extracelular, algunas de las cuales son utilizadas como referencias de orientación por neuronas en migración, y una serie de factores de crecimiento que portan una variedad de tipos de información a las neuronas. Los astrocitos se unen unos a otros por **uniones de hendidura tipo gap**, de forma que los cambios en la composición de los iones en un astrocito dado sean comunicados a los adyacentes, a distancias de cientos de micrones.

Algunos astrocitos también son reguladores críticos en la formación de la barrera hematoencefálica, cuyo propósito es el de controlar qué tipos de moléculas pueden salir de la corriente sanguínea hasta el cerebro y viceversa (véase **Fig. 22-5**). Los vasos sanguíneos en el cerebro proveen oxígeno, retiran el CO_2 y suministran glucosa y aminoácidos, con capilares que se encuentran a unos pocos micrómetros de cada



célula. Estos capilares forman la barrera hematoencefálica, la cual permite el paso de oxígeno y CO_2 a través de la pared de células endoteliales pero previene, por ejemplo, que neurotransmisores de transmisión sanguínea o algunos fármacos entren en el cerebro. La barrera consiste en un conjunto de uniones estrechas (Cap. 20) que interconectan las células endoteliales que forman las paredes de los capilares. Los astrocitos de los alrededores promueven la especialización de estas células endoteliales y las tornan menos permeables que aquellas que se encuentran en el resto del cuerpo.

CONCEPTOS CLAVE DE LA SECCIÓN 22.1

Neuronas y glía: componentes básicos del sistema nervioso

- Las neuronas son células extremadamente asimétricas compuestas por múltiples dendritas en un extremo, un cuerpo celular que contiene el núcleo, un axón largo y una terminal axónica.

FIGURA 22-5 Los astrocitos interactúan con células endoteliales en la barrera hematoencefálica. En el cerebro, los capilares están formados por células endoteliales interconectadas por uniones estrechas que son impermeables a la mayoría de las moléculas. El transporte entre células está bloqueado, de manera que solo pequeñas moléculas que puedan difundirse a través de las membranas plasmáticas o sustancias específicamente transportadas a través de las células pueden cruzar la barrera. Ciertos astrocitos rodean los vasos sanguíneos, en contacto con las células endoteliales, y envían señales proteicas de secreción para inducir a las células endoteliales a producir una barrera selectiva. Las células endoteliales (color borgoña, burdeos) están rodeadas por una capa de membrana basal (color bronceado). (De N.J. Abbott, L. Ronnback y E. Hamms, 2006, *Nature Rev. Neurosci.* 7:41–53).

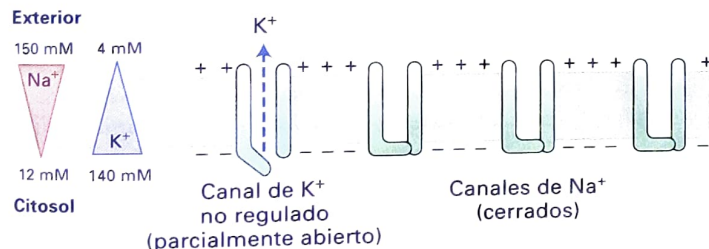
- Las neuronas llevan información desde un extremo al otro utilizando pulsos de flujo iónico a través de la membrana plasmática. Los procesos celulares ramificados, dendritas, en un extremo de la célula reciben señales químicas de otras neuronas y disparan el flujo de iones. La señal eléctrica se mueve rápidamente hacia la terminal axónica en el otro extremo de la célula (véase Fig. 22-1).
- Una neurona en reposo que no transporta ninguna señal tiene bombas accionadas por ATP que mueven iones a través de la membrana plasmática. El movimiento hacia el exterior de iones K^+ crea una carga negativa neta dentro de la célula. Este voltaje es llamado potencial de reposo y usualmente es de alrededor de -60 mV (véase Fig. 22-2).
- Si un estímulo causa que ciertos canales iónicos se abran de manera que ciertos iones puedan fluir más libremente, un fuerte pulso de cambio de voltaje podría recorrer la neurona desde las dendritas hasta la terminal axónica. La célula pasa de estar a -60 mV en el interior a $+50$ mV en el interior, relativo al fluido extracelular. Este pulso se llama potencial de acción (véase Fig. 22-2).
- El potencial de acción viaja a lo largo de la longitud del axón desde el cuerpo celular hasta la terminal axónica a velocidades de hasta 100 metros por segundo.
- Las neuronas se conectan a través de espacios pequeños llamados sinapsis. Dado que un potencial de acción no puede saltar el espacio, en la terminal axónica de la célula presináptica la señal es convertida de eléctrica a química para estimular a la célula postsináptica.
- Tras la estimulación por un potencial de acción, la terminal axónica libera, por exocitosis, pequeños paquetes de químicos llamados neurotransmisores. Los neurotransmisores difunden a través de la sinapsis y se unen a receptores en las dendritas en el otro lado de la sinapsis. Estos receptores pueden inducir o inhibir un nuevo potencial de acción en la célula postsináptica (véase Fig. 22-3).
- Las neuronas forman circuitos que usualmente consisten de neuronas sensoriales, interneuronas y neuronas motoras, como en la respuesta de reflejo rotuliano (véase Fig. 22-4).
- Las células gliales son diez veces más abundantes que las neuronas y sirven para muchos propósitos. Los oligodendrocitos y las células de Schwann crean el aislante de mielina que recubre muchas neuronas.
- Los astrocitos, otro tipo de célula glial, envuelven sus procesos alrededor de sinapsis y vasos sanguíneos y promueven la formación de la barrera hematoencefálica (véase Fig. 22-5). Los astrocitos también secretan proteínas que estimulan la formación de las sinapsis.

22.2 Canales iónicos regulados por voltaje y la propagación de potenciales de acción

En el **Capítulo 11** aprendimos que un potencial de acción de aproximadamente 70 mV (cara citosólica negativa) existe a través de la membrana plasmática de todas las células, incluyendo células nerviosas en reposo. Este potencial de membrana de reposo se genera por el movimiento hacia afuera de iones K^+ a través de canales de K^+ no regulados en la membrana plasmática y es impulsado por el gradiente de concentración de K^+ (citosol > medio extracelular). La alta concentración citosólica de K^+ y la baja concentración citosólica de Na^+ , relativas a sus concentraciones en el medio extracelular, se generan por la bomba Na^+/K^+ de membrana plasmática, la cual utiliza la energía liberada por hidrólisis de enlaces fosfoanhídridos en ATP para bombear Na^+ hacia afuera y K^+ hacia el interior. La entrada de iones de Na^+ hacia el citosol desde el medio es termodinámicamente favorable, impulsada tanto por el gradiente de concentración de Na^+ (medio extracelular > citosol) como por el potencial de membrana interno negativo (véase Fig. 11-25). Sin embargo, la mayoría de los canales de Na^+ en la membrana plasmática están cerrados en células en reposo, por lo que puede ocurrir un pequeño movimiento de iones de Na^+ hacia adentro (Fig. 22-6a).

Durante un potencial de acción, algunos de estos canales de Na^+ se abren; esto permite el movimiento de iones de Na^+ hacia el interior,

(a) Estado de reposo (cara citosólica negativa)



(b) Estado despolarizado (cara citosólica positiva)

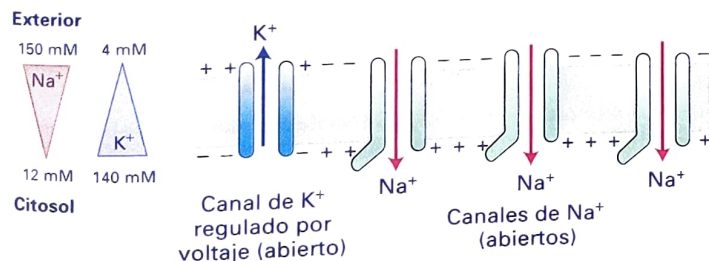


FIGURA 22-6 La despolarización de la membrana plasmática debido a la apertura de canales de Na^+ regulados. (a) En las neuronas en reposo, un tipo de canal de K^+ no regulado está abierto una parte del tiempo, pero numerosos canales de Na^+ regulados están cerrados. El movimiento de iones K^+ hacia el exterior establece el potencial de membrana negativo interno. (b) La apertura de canales de Na^+ característico de la mayoría de las células. (b) La apertura de canales de Na^+ regulados permite un flujo hacia el interior de suficientes iones Na^+ que causan una reversión del potencial de membrana. En el estado despolarizado, los canales de K^+ regulados por voltaje se abren y posteriormente repolarizan la membrana. Nótese que los flujos de iones son muy pequeños como para tener mucho efecto en la concentración general de Na^+ o K^+ en el citosol o en el fluido exterior.

lo que despolariza la membrana. Los potenciales de acción se propagan por el axón debido a que un cambio en el voltaje en una parte del axón activa la apertura de canales en la siguiente sección de esta. Por lo tanto, tales *canales regulados por voltaje* son el núcleo de la transmisión neuronal. En esta sección, primero introducimos algunas de las propiedades clave de los potenciales de acción, los cuales se mueven rápidamente a lo largo del axón desde el cuerpo celular hacia la terminal. Entonces describimos cómo operan los canales regulados por voltaje responsables de la propagación de los potenciales de acción en las neuronas. En la última parte de la sección, veremos cómo la vaina de mielina, producida por células gliales, aumenta la velocidad y la eficiencia de la transmisión eléctrica en células nerviosas.

La magnitud de los potenciales de acción es cercana a E_{Na} y es causada por el flujo de Na^+ hacia el interior a través de canales de Na^+ abiertos

La **Figura 22-6b** ilustra cómo el potencial de membrana cambiará si se abren suficientes canales de Na^+ en la membrana plasmática. El flujo resultante hacia adentro de iones Na^+ positivamente cargados hacia el citosol compensará con creces el flujo hacia afuera de iones K^+ a través de canales de K^+ abiertos en reposo. El resultado será un movimiento *neto* de cationes hacia el interior, con generación de un exceso de cargas positivas en la cara citosólica de la membrana plasmática y un correspondiente exceso de cargas negativas en la cara extracelular (debido a los iones Cl^- “dejados atrás” en el medio extracelular después del flujo hacia adentro de iones Na^+). En otras palabras, la membrana plasmática se despolariza en grado tal que la cara interna se vuelve positiva respecto de la externa.

Recordemos del **Capítulo 11** que el potencial de equilibrio de un ion es el potencial de membrana en el cual no hay flujo neto de ese ion de un lado de la membrana al otro debido al balance de dos fuerzas opuestas, el gradiente de concentración de iones y el potencial de membrana. En el pico de despolarización en un potencial de acción, la magnitud del potencial de membrana es muy cercana al potencial de equilibrio del Na^+ , E_{Na} , determinado por la ecuación de Nernst (**Ecuación 11-2**), como sería de esperar si la apertura de canales de Na^+ regulados por voltaje fuera responsable de la generación de potenciales de acción. Por ejemplo, el valor del pico del potencial de acción medido para el axón gigante de un calamar es +35 mV, cercano al valor calculado de E_{Na} (+55 mV) basado en las concentraciones de Na^+ de 440 mM en el exterior y 50 mM en el interior. La relación entre la magnitud de un potencial de acción y la concentración de iones Na^+ en el interior y en el exterior de la célula se ha confirmado experimentalmente. Por ejemplo, si la concentración de iones Na^+ en la solución que baña el axón del calamar se reduce a un tercio de lo normal, la magnitud de la despolarización se ve reducida en 40 mV, prácticamente como se predijo.

La apertura y el cierre secuencial de canales de Na^+ y K^+ regulados por voltaje generan potenciales de acción

El ciclo de cambios en el potencial de membrana y el regreso al valor de reposo que constituye un potencial de acción dura 1-2 milisegundos y puede ocurrir cientos de veces por segundo en una neurona típica (véase Fig. 22-2). Estos cambios cíclicos en el potencial de membrana resul-

tan primero de la apertura y el cierre de un número de *canales de Na⁺ regulados por voltaje* (esto es, canales que se abren por un cambio en el potencial de membrana) en un segmento de la membrana plasmática axónica, y luego, de la apertura y el cierre de *canales de K⁺ regulados por voltaje*. El papel de estos canales en la generación de potenciales de acción fue dilucidado en estudios clásicos realizados en el axón gigante del calamar, en el cual múltiples microelectrodos pueden insertarse sin causar daño a la integridad de la membrana plasmática. Sin embargo, el mismo mecanismo básico es utilizado por todas las neuronas.

Canales de Na⁺ regulados por voltaje Como se acaba de estudiar, los canales de Na⁺ regulados por voltaje están cerrados en neuronas en reposo. Una pequeña despolarización de la membrana (como ocurre cuando un neurotransmisor estimula una célula postsináptica) aumenta la posibilidad de que cualquiera de los canales se abra; cuanto mayor es la despolarización, mayor es la probabilidad de que un canal se abra. La despolarización causa un cambio conformacional en estas proteínas de canal que abre una entrada en la superficie citosólica del poro, lo que permite que los iones de Na⁺ pasen a través del poro a la célula. De este modo, cuanto más grande sea la despolarización inicial de la membrana, más canales de Na⁺ regulados por voltaje se abrirán y más iones Na⁺ entrarán.

A medida que los iones Na⁺ fluyen hacia el interior a través de canales abiertos, el exceso de cargas positivas en la cara citosólica y

las cargas negativas en la cara exoplásmica difunden a una distancia pequeña del sitio inicial de despolarización. Esta *propagación pasiva* de cargas positivas en la cara citosólica y cargas negativas en la cara externa despolariza (hace el interior menos negativo) segmentos adyacentes de la membrana plasmática y causa la apertura de canales de Na⁺ regulados por voltaje adicionales en estos segmentos y un aumento del flujo hacia adentro de Na⁺. Mientras más iones Na⁺ ingresan en la célula, más despolarizado se vuelve el interior de la membrana celular, lo que ocasiona la apertura de mayor cantidad de canales de Na⁺ regulados por voltaje e incluso una entrada explosiva la membrana; este mecanismo pone en marcha una entrada de iones Na⁺. Por una fracción de milisegundo se vuelve sumamente mayor que aquella para el K⁺, y el potencial de membrana alcanza E_{Na^+} , el potencial de equilibrio para una membrana permeable solo a iones Na⁺. Sin embargo, a medida que el potencial de membrana alcanza E_{Na^+} , el movimiento ulterior de iones Na⁺ cesa, ya que el gradiente de concentración de iones Na⁺ (exterior > interior) ahora se compensa con el potencial de membrana positivo interno. En este pico, el potencial de acción es cercano al valor de E_{Na^+} .

La **Figura 22-7** representa esquemáticamente las características estructurales críticas de los canales de Na⁺ regulados por voltaje y los cambios conformacionales que causan su apertura y su cierre. En el estado de reposo, un segmento de la proteína en la cara citosólica (la

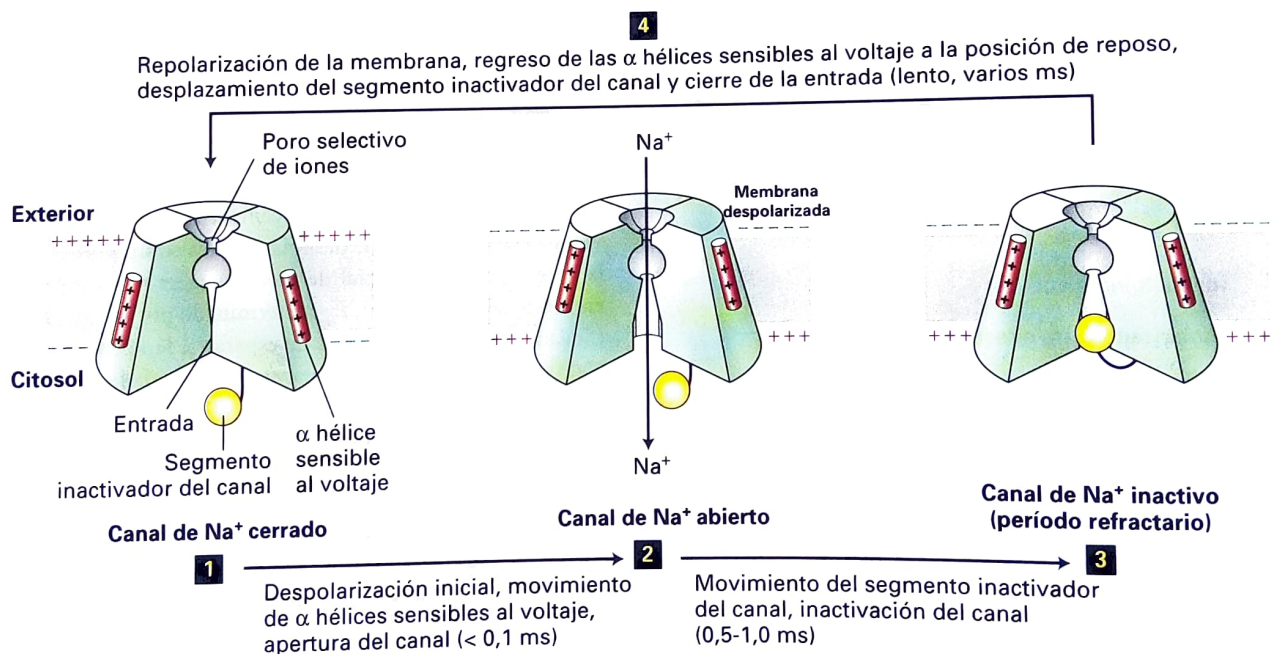


FIGURA 22-7 Modelo operacional del canal de Na⁺ regulado por voltaje. Como en el canal de K⁺ representado en la **Figura 11-20**, cuatro dominios transmembrana en la proteína contribuyen al poro central a través del cual los iones se mueven. Los componentes críticos que controlan el movimiento de iones Na⁺ se muestran aquí en las vistas de cortes que representan tres de cuatro dominios transmembrana. En el estado cerrado, de reposo, las α hélices sensibles al voltaje, las cuales tienen cadenas laterales positivamente cargadas por cada tercer residuo, son atraídas hacia las cargas negativas en el lado citosólico de la membrana en reposo. Esto mantiene el segmento de la entrada cerca de la cara citosólica en una posición "cerrada" que bloquea el canal e impide la entrada de iones Na⁺ (paso **1**). En respuesta

a una pequeña despolarización, las hélices sensibles al voltaje se mueven a través de la bicapa fosfolipídica hacia la superficie externa de la membrana, lo que causa un cambio conformacional inmediato en la entrada en la cara citosólica de la proteína que abre el canal (paso **2**). Dentro de una fracción de milisegundo, el segmento inactivador del canal se mueve hacia adentro del canal abierto, y esto impide el paso de iones adicionales (paso **3**). Una vez que la membrana es repolarizada, las hélices sensibles al voltaje regresan a la posición de reposo, el segmento inactivador del canal es desplazado de la apertura del canal y la entrada se cierra. La proteína vuelve al estado cerrado de reposo y puede ser abierta nuevamente por despolarización (paso **4**). (Véase W. A. Catterall, 2001, *Nature* **409**:988; y S. B. Long y cols., 2007, *Nature* **450**:376).

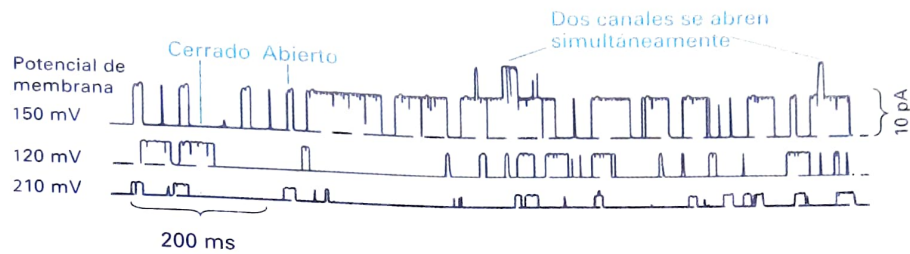


FIGURA EXPERIMENTAL 22-8 La probabilidad de la apertura del canal y el flujo de corriente a través de canales de K^+ regulados por voltaje aumenta con la extensión de la despolarización de la membrana.

Estos trazos de fijación de membranas se obtuvieron a partir de regiones de membrana plasmática neuronal fijados a tres potenciales diferentes, +50, +20 y -10 mV. Las desviaciones hacia arriba en la corriente indican la apertura de canales de K^+ y el movimiento de iones K^+ hacia afuera (desde la cara

citoplasmática hacia la exoplasmática) a través de la membrana. Incrementar la despolarización de la membrana (el voltaje de fijación) desde -10 a $+50$ mV aumenta la probabilidad de que un canal se abra, el tiempo que permanece abierto y la cantidad de corriente eléctrica (número de iones) que pasa a través de él. pA = picoamperes. (De B. Pallota y cols., 1981, *Nature* 293:471, as modified by B. Hille, 1992, *Ion Channels of Excitable Membranes*, 2d ed., Sinauer, p. 122)

entrada) obstruye el poro central y evita el paso de iones. El canal contiene cuatro α hélices sensibles al voltaje; en el estado de reposo, estas hélices son atraídas a la superficie interna negativa de la membrana plasmática. Una pequeña despolarización de la membrana desencadena el movimiento de estas hélices sensibles al voltaje hacia las cargas negativas que están formándose en la superficie exoplasmática, lo que causa un cambio conformacional en la entrada que abre el canal y permite que los iones Na^+ fluyan. Después de aproximadamente 1 ms, el flujo interno adicional de Na^+ se previene a través del movimiento hacia adentro del canal abierto del *segmento inactivador del canal* en la cara citoplasmática, y así se bloquea cualquier movimiento ulterior de iones Na^+ . Mientras la membrana permanezca despolarizada, el segmento inactivador del canal permanecerá en la apertura del canal; durante este *período refractario*, el canal está inactivo y no puede ser reabierto. Unos pocos milisegundos después de que el potencial de reposo interno negativo es restablecido, el segmento inactivador del canal se aleja del poro y las α hélices sensibles al voltaje vuelven a su posición de reposo cerca de la superficie citoplasmática de la membrana. De este modo, el canal regresa a su estado de reposo cerrado, capaz de ser abierto una vez más por despolarización. Nótese la importante distinción entre canales “cerrados” y aquellos que están “inactivos”, representado en la Figura 22-7.

Canales de K^+ regulados por voltaje La repolarización de la membrana que ocurre durante el período refractario se debe mayormente a la apertura de canales de K^+ regulados por voltaje. El aumento subsiguiente en el flujo hacia afuera de K^+ desde el citosol elimina las cargas positivas en exceso de la cara citoplasmática de la membrana plasmática (la torna más negativa) y de este modo restaura el potencial de reposo negativo interno. Durante un breve instante, en realidad la membrana se vuelve hiperpolarizada; en el pico de esta **hiperpolarización**, el potencial alcanza E_{K^+} , el cual es más negativo que el potencial de reposo (véase Fig. 22-2).

La apertura de los canales de K^+ regulados por voltaje se induce por la gran despolarización del potencial de acción. A diferencia de los canales de Na^+ regulados por voltaje, la mayoría de los tipos de canales de K^+ regulados por voltaje permanecen abiertos siempre que la membrana esté despolarizada, y cerrados solo cuando el potencial de membrana haya regresado a un valor negativo interno. Debido a

que los canales de K^+ regulados por voltaje se abren levemente después de la despolarización inicial, a la altura del potencial de acción, a veces son llamados *canales de K^+ tardíos*. Finalmente, todos los canales de Na^+ y K^+ regulados por voltaje vuelven a sus estados cerrados de reposo. Los únicos canales abiertos en esta condición basal son los de K^+ no regulados que generan el potencial de membrana de reposo, el cual pronto regresa a su valor usual de aproximadamente -70 mV (véase Fig. 22-6a).

Mientras el flujo de iones Na^+ y K^+ altera el potencial de membrana dramáticamente mientras es despolarizada, hiperpolarizada y repolarizada durante un ciclo de potencial de acción, es importante notar que el intercambio de estos iones a través de la membrana es pequeño comparado con el número total de iones de Na^+ y K^+ en el citosol y en el espacio extracelular. Así, la conducción de potenciales de acción en las neuronas no requiere *directamente* las bombas Na^+/K^+ que mantienen sus gradientes de concentración de iones, como veremos en breve.

Los canales de Na^+ regulados por voltaje son difíciles de estudiar usando técnicas de fijación de membranas, pero los trazos de fijación de membranas representados en la Figura 22-8 revelan las propiedades esenciales de los canales de K^+ regulados por voltaje (véase Fig. 11-22 para una descripción de cómo se fijan membranas). En este experimento, pequeños segmentos de membrana plasmática neuronal se fijaron a diferentes voltajes y se midió el flujo de cargas eléctricas a través en el segmento debido al flujo de iones K^+ por los canales de K^+ abiertos. Al modesto voltaje de despolarización de -10 mV, los canales de la región de membrana se abren en forma infrecuente y permanecen abiertos solo por unos pocos milisegundos, a juzgar por el número y el ancho de los saltos ascendentes en los trazos, respectivamente. Además, el flujo de iones a través de ellos es bastante pequeño, tal como se mide por la corriente eléctrica que pasa por cada canal abierto (la altura de los saltos). Despolarizar la membrana a $+20$ mV causa que estos canales se abran con aproximadamente el doble de frecuencia; también, más iones K^+ se mueven a través de cada canal abierto (la altura de los saltos es mayor) debido a que la fuerza que impulsa a los iones K^+ citoplasmáticos hacia el exterior es mayor a un potencial de membrana de $+20$ mV que a uno de -10 mV. Despolarizar la membrana a $+50$ mV, el valor en el pico de un potencial de acción, causa la apertura de más canales de K^+ y también incrementa el flujo

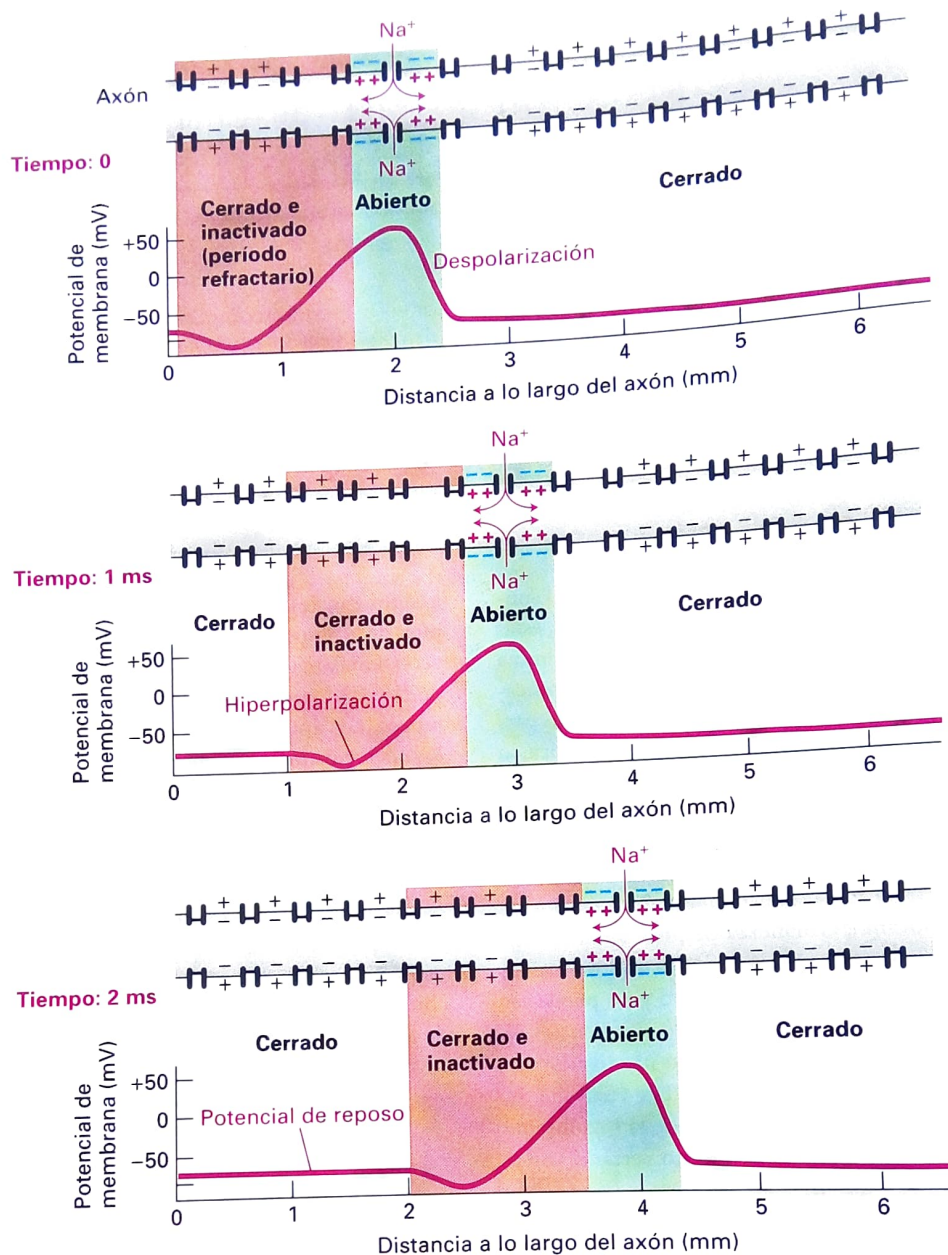


FIGURA 22-9 Conducción unidireccional de un potencial de acción debida a la inactivación transitoria de canales de Na⁺ regulados por voltaje. En el tiempo 0, un potencial de acción (línea rosa) está en la posición 2 mm en el axón. Los canales de Na⁺ en esta posición están abiertos (sombreado verde) y los iones Na⁺ fluyen hacia el interior. El exceso de iones Na⁺ difunde en ambas direcciones a lo largo del interior de la membrana, esparciendo pasivamente la despolarización en ambas direcciones (flechas rosas curvadas). Pero debido a que los canales de Na⁺ en la posición 1 mm aún están

inactivados (sombreado rojo), no pueden todavía ser reabiertos por la pequeña despolarización causada por la dispersión pasiva. En contraste, los canales de Na⁺ en la posición 3 mm "corriente abajo" comienzan a abrirse. Cada región de la membrana es refractaria (inactiva) por unos pocos milisegundos después de que un potencial de acción ha pasado. De este modo, la despolarización en el sitio 2 mm en el tiempo 0 dispara potenciales de acción solo corriente abajo. A 1 ms, un potencial de acción está pasando la posición 3 mm; a 2 ms está pasando la posición 4 mm.

de K⁺ a través de ellos. De este modo, al abrirse durante el pico de un potencial de acción, estos canales de K⁺ permiten el movimiento hacia afuera de iones K⁺ y la repolarización del potencial de membrana mientras los canales de Na⁺ regulados por voltaje están siendo cerrados e inactivados.

Más de 100 proteínas de canales de K⁺ regulados por voltaje han sido identificadas en seres humanos y otros vertebrados. Como dis-

cutiremos luego, todas estas proteínas tienen una estructura general similar, pero exhiben diferentes dependencias de voltaje, conductividades, cinéticas de canal y otras propiedades funcionales. Muchos se abren solo a voltajes despolarizantes fuertes, una propiedad requerida para la generación de la máxima despolarización característica del potencial de acción antes de que la repolarización de la membrana comience.

Los potenciales de acción se propagan unidireccionalmente sin disminución

Un potencial de acción comienza con cambios que ocurren en una pequeña zona de la membrana plasmática axónica cerca del cuerpo celular. En el pico del potencial de acción, la dispersión pasiva de la despolarización de la membrana es suficiente para despolarizar un segmento vecino de membrana. Esto causa que algunos canales de Na^+ regulados por voltaje en esta región se abran, lo que de esta manera aumenta la extensión de la despolarización en la zona y causa una apertura explosiva de más canales de Na^+ y la generación de un potencial de acción. Esta despolarización pronto desencadena la apertura de canales de K^+ regulados por voltaje y la restauración del potencial de reposo. En consecuencia, el potencial de acción se dispersa como una onda viajera lejos de su sitio inicial sin disminución.

Como se indicó anteriormente, durante el período refractario los canales de Na^+ regulados por voltaje se inactivan por varios milisegundos. Tales canales refractarios no pueden llevar a cabo movimientos de iones y ni abrirse durante este período, incluso si la membrana está despolarizada debido a la dispersión pasiva. Como se ilustra en la **Figura 22-9**, la habilidad de los canales de Na^+ de reabrirse durante el período refractario asegura que los potenciales de acción se propaguen solo en una dirección, desde el segmento axónico inicial donde se originan hasta la terminal axónica. Debido a que los canales de Na^+ corriente arriba de la localización del potencial de acción aún están inactivos, no pueden ser reabiertos por la pequeña despolarización causada por dispersión pasiva. En contraste, los canales de Na^+ “corriente abajo” del potencial de acción comienzan a abrirse.

El período refractario de los canales de Na^+ también limita el número de potenciales de acción que una neurona puede conducir por segundo. Esto es importante, ya que es la frecuencia de los potenciales de acción la que lleva la información. La reapertura de los canales de Na^+ corriente arriba de un potencial de acción (más próximos al cuerpo celular) también se retrasa por la hiperpolarización de la membrana que resulta de la apertura de canales de K^+ regulados por voltaje.

Las células nerviosas pueden conducir muchos potenciales de acción en ausencia de ATP

La despolarización de la membrana durante un potencial de acción resulta del movimiento de solo un pequeño número de iones Na^+ hacia el interior de una neurona y no afecta significativamente la concentración de Na^+ intracelular. Una célula nerviosa típica tiene alrededor de 10 canales de Na^+ regulados por voltaje por micrómetro cuadrado (μm^2) de la membrana plasmática. Puesto que cada canal pasa alrededor de 5 000-10 000 iones durante el milisegundo que está abierto (véase **Fig. 11-23**), un máximo de 10^5 iones por μm^2 de membrana plasmática se moverán hacia adentro durante cada potencial de acción.

Para evaluar el efecto de este flujo de iones en la concentración citosólica de Na^+ de 10 mM (0,01 mol/L) típica de un axón en estado de reposo, nos concentramos en un segmento de axón de 1 micrómetro (μm) de longitud y 10 μm de diámetro. El volumen de este segmento es 78 μm^3 , o $7,8 \times 10^{-13}$ litros, y contiene $4,7 \times 10^9$ iones de Na^+ : (10^{-2} mol/L) ($7,8 \times 10^{-13}$ L) (6×10^{23} Na^+ /mol). El área de la superficie de este segmento del axón es de 31 μm^2 , y durante el paso de un potencial de acción, 10^5 iones de Na^+ entrarán por cada μm^2 de membrana. Así, este flujo hacia adentro de Na^+ aumenta el número de iones Na^+ en este segmento por solo una parte en alrededor de 1 500: ($4,7 \times 10^9$) /

($3,1 \times 10^6$). Del mismo modo, la repolarización de la membrana debida al flujo hacia afuera de iones K^+ a través de canales de K^+ regulados por voltaje no cambia significativamente la concentración de K^+ intracelular.

Debido a que relativamente pocos iones Na^+ y K^+ se mueven a través de la membrana plasmática durante cada potencial de acción, la bomba Na^+/K^+ dirigida por ATP que mantiene los gradientes usuales de iones no juega un papel directo en la conducción del impulso. Dado que los movimientos iónicos durante cada potencial de acción involucran solo una fracción de minuto de los iones K^+ y Na^+ de la célula, una célula nerviosa puede disparar cientos o incluso miles de veces en ausencia de ATP.

Todos los canales iónicos regulados por voltaje tienen estructuras similares Habiendo explicado cómo el potencial de acción es dependiente de la apertura y cierre de canales regulados por voltaje, pasamos a una disección molecular de estas notables proteínas. Después de describir la estructura básica de estos canales, nos concentramos en tres preguntas:

- ¿Cómo detectan estas proteínas cambios en el potencial de membrana?
- ¿Cómo se transduce este cambio a la apertura del canal?
- ¿Qué es lo que causa que estos canales se conviertan en inactivos poco después de abrirse?

El gran descubrimiento inicial en la comprensión de los canales iónicos regulados por voltaje surgió del análisis de las moscas de la fruta (*Drosophila melanogaster*) que portaban la mutación *shaker*. Estas moscas se sacuden vigorosamente bajo anestesia con éter, lo que refleja una pérdida del control motor y un defecto en ciertas neuronas motoras que tienen un potencial de acción anormalmente prolongado. Los investigadores sospecharon que la mutación *shaker* causaba un defecto en la función de los canales. La clonación del gen involucrado confirmó que la proteína defectuosa era un canal de K^+ regulado por voltaje. La mutación *shaker* impide que el canal mutante se abra en forma normal e inmediata en la despolarización. Para establecer que el gen *shaker* silvestre codificaba un canal de K^+ , se utilizó cDNA del gen *shaker* silvestre como molde para producir mRNA *shaker* en un sistema libre de células. La expresión de este mRNA en oocitos de rana y estudios por fijación de membranas en la proteína de canal recientemente sintetizada mostraron que sus propiedades funcionales eran idénticas a aquellas de los canales de K^+ regulados por voltaje en la membrana neuronal, lo que demostró concluyentemente que el gen *shaker* codifica esta proteína de canal de K^+ .

El canal de K^+ Shaker y la mayoría de otros canales de K^+ regulados por voltaje que han sido identificados son proteínas tetraméricas compuestas por cuatro subunidades idénticas dispuestas en una conformación en la membrana alrededor de un poro central. Cada subunidad se construye de seis α hélices transmembrana, designadas S1-S6, y un segmento P (**Fig. 22-10a**). Las hélices S5 y S6 y el segmento P son estructural y funcionalmente homólogas a aquellas en el canal de K^+ no regulado en estado de reposo analizado anteriormente (véase **Fig. 11-20**); las hélices S5 y S6 forman el revestimiento del filtro de selectividad del K^+ a través del cual viaja el ion. Las hélices S1-S4 forman un complejo rígido que funciona como un sensor de voltaje (con las cadenas laterales positivamente cargadas en S4 que actúan como sensor primario). El extremo N-terminal de S1 que se extiende “como una pelota” al citosol es el segmento inactivador del canal.

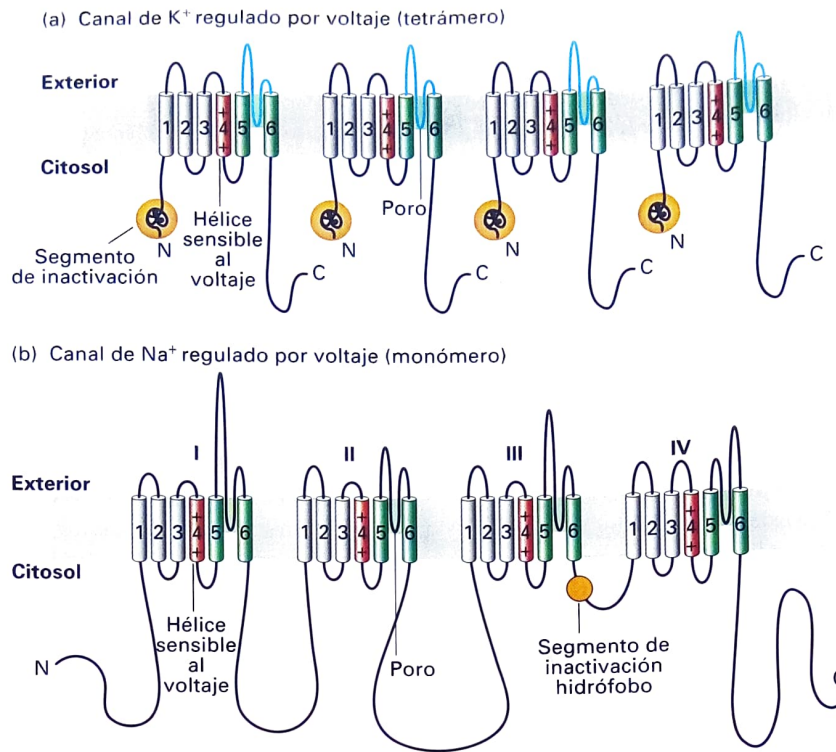


FIGURA 22-10 Representaciones esquemáticas de las estructuras secundarias de canales de K^+ y Na^+ regulados por voltaje. (a) Los canales de K^+ regulados por voltaje se componen de cuatro subunidades idénticas, cada una con 600-700 aminoácidos, y seis α hélices que atraviesan la membrana, S1-S6. El extremo N-terminal de cada subunidad, localizado en el citosol y llamado N, forma un dominio globular (esfera naranja) esencial para la inactivación del canal abierto. Las hélices S5 y S6 (verde) y el segmento P (azul) son homólogas a aquellas en los canales de K^+ no regulados en estado de reposo, pero cada subunidad contiene cuatro α hélices transmembrana adicionales. Una de ellas, S4 (rojo), es la α hélice sensible al voltaje primaria y

es asistida en este papel al formar un complejo estable con las hélices S1-3. (b) Los canales de Na^+ regulados por voltaje son monómeros que contienen 1 800-2 000 aminoácidos organizados en cuatro dominios transmembrana (I-IV) que son similares a las subunidades en los canales de K^+ regulados por voltaje. El único segmento inactivador del canal (esfera naranja) se localiza en el citosol, entre los dominios III y IV. Los canales de Ca^{2+} regulados por voltaje tienen una estructura global similar. La mayoría de los canales iónicos regulados por voltaje también contienen subunidades reguladoras (β), no representadas aquí. (Parte [a] adaptado de C. Miller, 1992, *Curr. Biol.* 2:573, y H. Larsson y cols., 1996, *Neuron* 16:387; parte [b] adaptado de W. A. Catterall, 2001, *Nature* 409:988).

Los canales de Na^+ regulados por voltaje y los canales de Ca^{2+} son proteínas monoméricas organizadas en cuatro dominios homólogos, I-IV (Fig. 22-10b). Cada uno de estos dominios es similar a una subunidad de un canal de K^+ regulado por voltaje. Sin embargo, en contraste con los canales de K^+ regulados por voltaje, los cuales tienen cuatro segmentos inactivadores de canal, los canales regulados por voltaje monoméricos tienen un único segmento inactivador de canal. Excepto por esta diferencia estructural menor y sus permeabilidades iónicas variables, se piensa que todos los canales variables iónicos regulados por voltaje funcionan en forma similar y que han evolucionado de una proteína de canal monomérica ancestral que contenía seis α hélices transmembrana. Puesto que ninguna estructura molecular está disponible para un canal de Ca^{2+} regulado por voltaje y solo una lo está para un canal de Na^+ regulado por voltaje cerrado, nuestro estudio se centra en los canales de K^+ regulados por voltaje.

Las α hélices S4 sensibles al voltaje se mueven en respuesta a la despolarización de la membrana

Nuestra comprensión de la bioquímica de las proteínas de canal está avanzando rápidamente debido a las estructuras cristalinas obtenidas en época reciente para canales de potasio de bacterias y Shaker y otros

canales. Las proteínas transmembrana son notablemente difíciles de producir y cristalizar, y presentan desafíos únicos para el científico. Un método utilizado para obtener cristales de estas complicadas proteínas de membrana fue rodearlas con fragmentos unidos de anticuerpos monoclonales [F(ab)'s; Cap. 23]; en otros casos, fueron cristalizadas formando complejos con proteínas de unión normales. En ambos casos, de alguna forma la presencia de estas proteínas solubles en agua en el complejo mejoró la formación de cristales.

Las estructuras de los canales revelan conformaciones notables de los dominios sensores de voltaje y sugieren cómo partes de la proteína se mueven para abrir el canal. Como ya se ha señalado, el tetramero del canal de K^+ tiene un poro cuyas paredes están formadas por las hélices S5 y S6 (Fig. 22-11a, b). Por fuera de esa estructura central, cuatro brazos, o "paletas", cada uno con hélices S1-S4, se proyectan hacia la membrana que los rodea y también interactúan con las partes externas de las hélices S5 y S6; estas son los sensores de voltaje y están en contacto mínimo con el poro. Mediciones eléctricas sensitivas sugirieron que la apertura de un canal de Na^+ regulado por voltaje o un canal de K^+ se acompaña del movimiento de 12 a 14 cargas positivas unidas a proteínas desde la superficie citosólica a la exoplasmática de la membrana. Las partes de la proteína que se mueven son complejos rígidos compuestos por las hélices S1-S4; S4 representa mucho de

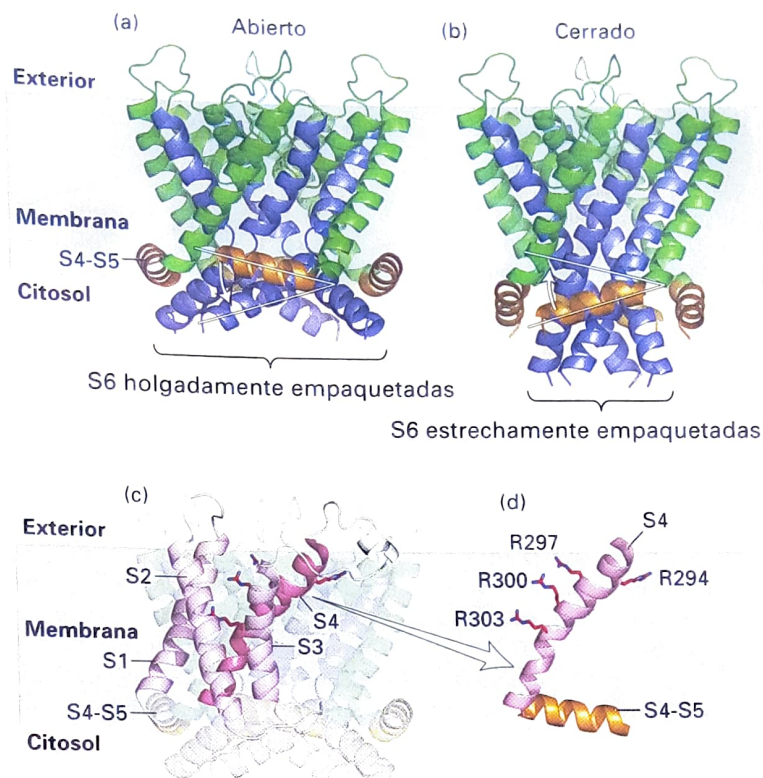


FIGURA 22-11 Estructura molecular de un canal de K⁺ sensible al voltaje. Los dos diagramas de cintas muestran modelos del canal de potasio en los estados (a) abierto y (b) cerrado. Dado que la molécula es un tetrámero de la misma subunidad, cuatro copias de cada hélice son visibles. Las cuatro α hélices verdes (S5) y azules (S6) atraviesan la membrana, con el interior de la célula como parte inferior y el exterior como parte superior. Nótese cómo las hélices están estrechamente empaquetadas en la parte inferior en (b), cerrando el canal de manera que el ion K⁺ no pueda atravesarlo (comparar las distancias entre las hélices S5 como se muestra por las llaves debajo de [a] y [b]). El vinculador S4-S5 (naranja), localizado en el citoplasma, conecta la hélice S4 (no mostrada) con la hélice S5. Para mayor claridad, las hélices S1 a S4 han sido omitidas del modelo. Normalmente, estarían atraídas al extremo terminal del vinculador S4-S5 y sobresaldrían de la molécula. (c) Estructura tridimensional

de las “paletas” sensibles al voltaje que comprenden las hélices S1-S4, con los cuatro residuos de arginina (R) sensibles al voltaje en S4 (representado en el panel d). Estas paletas se mueven desde casi el interior hacia el exterior de la membrana en respuesta a la despolarización. Puesto que cada una de ellas está unida a un vinculador S4-S5, cada vinculador y su hélice S5 unida se desplaza, lo que a su vez mueve las hélices S6, y esto abre el poro. Nótese que el vinculador entre S4 y S5 apunta hacia arriba, hacia la superficie exoplasmática (el exterior) en el canal abierto (a), empujado hacia arriba por el movimiento hacia afuera de las paletas S1-S4. En contraste, el vinculador S4-S5 apunta hacia abajo en el canal cerrado (b) cuando las paletas S1-S4 están más próximas a la superficie citosólica. (d) Estructura tridimensional de la hélice S4 y el vinculador S4-S5. (De s. B. Long, X. Tao, E. B. Campbell, y R. MacKinnon, 2007, *Nature* **450**:376-382).

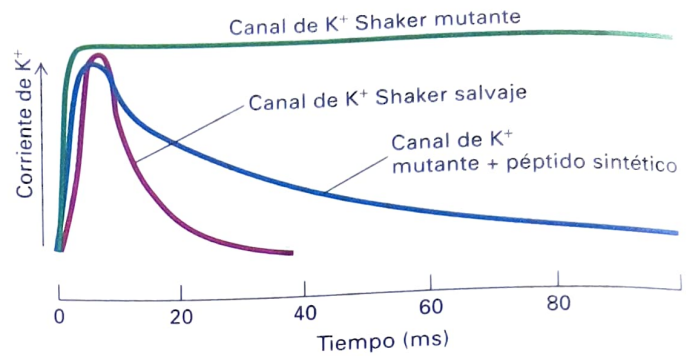
la carga positiva y es el sensor de voltaje primario, con una lisina o arginina positivamente cargada cada tercer o cuarto residuo (Fig. 21-11d). Las argininas en S4 han sido medidas moviéndose tanto como 1,5 nm a medida que el canal se abre, lo cual puede compararse con los ~5 nm de espesor de la membrana o el diámetro de 1,2 nm de la propia α hélice.

En el estado de reposo, las cargas positivas en los complejos S1-S4 (los “remos”) son atraídas hacia las cargas negativas en la cara citosólica de la membrana. En la membrana despolarizada, estas mismas cargas positivas se vuelven atraídas a las cargas negativas en la superficie exoplasmática (externa) de la membrana, lo que causa que los remos S1-S4 se muevan parcialmente a través de la membrana (desde la superficie citosólica a la exoplasmática). Este movimiento se muestra esquemáticamente en la Figura 22-7 y desencadena un cambio conformacional en la proteína que abre el canal.

El aspecto más inusual de las estructuras de los canales sensitivos al voltaje es la presencia de grupos cargados, por ejemplo argininas, en contacto con lípidos. La localización del sensor de voltaje ayuda a explicar experimentos anteriores en los cuales un canal no sensitivo al voltaje se convirtió en un canal que detecta voltaje al adicionarle dominios que detectan voltaje. Tal resultado podría parecer improbable si los sensores de voltaje tuvieran que estar profundamente embebidos en la estructura central.

Los estudios con canales de K⁺ Shaker mutantes apoyan la importancia de la hélice S4 en la detección de voltaje. Cuando uno o más residuos de arginina o lisina en la hélice S4 del canal de K⁺ Shaker fueron reemplazados con residuos neutros o ácidos, menos cargas positivas de lo normal se movieron a través de la membrana en respuesta a una despolarización de la membrana; esto indica que, de hecho, los residuos de arginina y lisina en la hélice S4 sí se mueven a través

FIGURA EXPERIMENTAL 22-12 Experimentos con un canal de K^+ mutante que carece de los dominios globulares N-terminales apoyan el modelo de inactivación cabeza globular-cadena. El canal de K^+ Shaker salvaje y una forma mutante que carece de los aminoácidos que componen el dominio globular N-terminal fueron expresados en oocitos de *Xenopus*. La actividad de los canales fue controlada por la técnica de fijación de membranas. Cuando las regiones fueron despolarizadas desde 0 a +30 mV, el canal salvaje se abrió por ~5 ms y luego se cerró (curva roja). El canal mutante se abrió normalmente, pero no pudo cerrarse (curva verde). Cuando un péptido globular químicamente sintetizado se adicionó a la cara citosólica de la región, el canal mutante se abrió normalmente y luego se cerró (curva azul). Esto demostró que el péptido añadido inactivó el canal después de que éste se abriera y que el dominio globular no necesita estar unido a la proteína para poder funcionar. (Adaptado de W. N. Zagotta y cols., 1990, *Science* 250:568).



de la membrana. La estructura de la forma abierta de un canal de K^+ regulado por voltaje de mamífero se ha contrastado con la estructura cerrada de un canal de K^+ diferente. Los resultados sugieren un modelo para la apertura y el cierre del canal en respuesta a movimientos de los sensores de voltaje a través de la membrana (véase Fig. 22-11a, b). En el modelo, los sensores de voltaje, compuestos por las hélices S1-S4, se mueven en respuesta al voltaje y ejercen una torsión sobre una hélice ligadora que conecta S4 con S5:

- En la conformación de canal abierto, la posición del conector de S4-S5 fuerza a la hélice S6 para que forme un pliegue cerca de la superficie citosólica (azul en la Fig. 22-11a) y el poro interno, cerca de la superficie citosólica, está abierto. El diámetro del poro, de 1,2 nm, es suficiente para acomodar iones K^+ hidratados.
- Cuando la membrana celular es repolarizada y el sensor de voltaje se mueve hacia la superficie de membrana citosólica, los conectores de S4-S5 (anaranjado en la Fig. 22-11b) se tuercen hacia abajo, hacia el interior de la célula. En consecuencia, las hélices S6 se enderezan y comprimen la parte inferior del canal cerrado. Así, la entrada se compone de los extremos que miran hacia el citosol de las hélices S5 y S6, donde el poro es más estrecho.

El movimiento del segmento inactivador del canal hacia el poro abierto bloquea el flujo de iones

Una característica importante de la mayoría de los canales regulados por voltaje es la inactivación; esto es, poco después de abrirse se cierran espontáneamente y forman un canal inactivo que no se reabrirá hasta que la membrana esté repolarizada. En el estado de reposo, las esferas globulares en el extremo N-terminal de las cuatro subunidades en un canal de K^+ regulado por voltaje están libres en el citosol (Fig. 22-10). Varios milisegundos después de que el canal se abre por despolarización, el dominio globular se mueve a través de una apertura entre dos de las subunidades y se une en un bolsillo hidrófobo en la cavidad central del poro, lo cual bloquea el flujo de iones K^+ (Fig. 22-7). Después de unos pocos milisegundos, el dominio globular se desplaza del poro, y la proteína se revierte al estado cerrado de reposo. Los dominios cabeza globular-cadena en los canales de K^+ son funcionalmente equivalentes al segmento inactivador del canal en canales de Na^+ .

Los resultados experimentales mostrados en la Figura 22-12 demuestran que la inactivación de canales de K^+ depende de los domi-

nios globulares, que ocurre luego de la apertura del canal y no requiere de dominios globulares para estar unida en forma covalente a la proteína del canal. En otros experimentos, canales de K^+ mutantes carentes de porciones de cadenas de ~40 residuos que conectan el dominio globular a la hélice S1 se expresaron en oocitos de rana. Mediciones por fijación de membrana de la actividad del canal mostraron que cuanto más corta es la cadena, más rápida es la inactivación, como si una pelota unida a una cadena más corta pudiera moverse hacia el interior del canal más fácilmente. De manera inversa, la adición de aminoácidos aleatorios para alargar la cadena normal ralentiza la inactivación del canal.

El único segmento inactivador de canal en los canales de Na^+ regulados por voltaje contiene un motivo hidrófobo conservado compuesto de isoleucina, fenilalanina, metionina y treonina (véase Fig. 22-10b). Como el dominio cabeza globular-cadena en canales de K^+ , este segmento se pliega y bloquea el poro por el cual pasa el Na^+ hasta que la membrana se repolariza (véase Fig. 22-7).

La mielinización incrementa la velocidad de conducción del impulso

Como hemos visto, los potenciales de acción pueden moverse a lo largo de un axón amielínico sin disminución a una velocidad de hasta 1 metro por segundo. Pero incluso tales velocidades rápidas son insuficientes para permitir los movimientos complejos típicos de los animales. Por ejemplo, en seres humanos adultos, los cuerpos celulares de neuronas motoras que inervan los músculos de la pierna se localizan en la médula espinal, y los axones tienen alrededor de un metro de longitud. Las contracciones musculares coordinadas requeridas para caminar, correr y otros movimientos similares serían imposibles si se tardara 1 segundo para que un potencial de acción se mueva desde la médula espinal bajando por el axón de una neurona motora a un músculo de la pierna. La solución es envolver las células en aislante que incremente la tasa de movimiento de un potencial de acción. El aislante se llama **vaina de mielina** (véase Fig. 22-1b). La presencia de una vaina de mielina alrededor de un axón aumenta la velocidad de la conducción del impulso de 10-100 metros por segundo. Como resultado, en una neurona motora humana típica, un potencial de acción puede recorrer la longitud de 1 metro de axón de largo y estimular un músculo para que se contraiga dentro de los 0,01 segundos.

En neuronas no mielinizadas, la velocidad de conducción de un potencial de acción es apenas proporcional al diámetro del axón, de-

bido a que un axón más grueso tendrá un número mayor de iones que pueden difundir. El cerebro humano está repleto de neuronas mielinizadas relativamente pequeñas. Si las neuronas en el cerebro humano no estuvieran mielinizadas, sus diámetros axónicos deberían aumentar alrededor de 10 000 veces para lograr las mismas velocidades de conducción que en neuronas mielinizadas. Así, los cerebros de los vertebrados, con sus neuronas densamente empaquetadas, nunca hubieran podido evolucionar sin mielina.

Los potenciales de acción “saltan” de nodo a nodo en axones mielinizados

La vaina de mielina que rodea un axón se forma por muchas células de la glía. Cada región de mielina formada por una célula glial individual se separa de la siguiente región por un área amielínica de la membrana del axón de aproximadamente 1 μm de largo llamada el *nodo de Ranvier* (o simplemente, *nodo*; véase Fig. 22-1b). La membrana axónica está en contacto directo con el líquido extracelular solo en los nodos, y la cubierta de mielina impide cualquier movimiento iónico hacia adentro o hacia afuera del axón, excepto en los nodos. Además, todos los canales de Na^+ regulados por voltaje y los canales de K^+ y todas las bombas Na^+/K^+ , las cuales mantienen los gradientes iónicos en el axón, están localizados en los nodos.

Como consecuencia de esta localización, el movimiento hacia el interior de iones Na^+ que genera el potencial de acción puede ocurrir solo en los nodos libres de mielina (Fig. 22-13). El exceso de iones positivos citosólicos generados en un nodo durante la despolarización de la membrana asociada con el movimiento de Na^+ hacia el citosol como parte de un potencial de acción se dispersa pasivamente a través del citoplasma del axón hacia el siguiente nodo con muy poca pérdida o atenuación, dado que no pueden atravesar la membrana axónica mielinizada. Esto causa que una despolarización en uno de los nodos se disperse rápidamente al siguiente nodo e induzca un potencial de acción allí, lo que permite que el potencial de acción salte de nodo en nodo. La transmisión se llama *conducción saltatoria*. Este fenómeno explica por qué la velocidad de conducción en neuronas mielinizadas es aproximadamente la misma que aquella en neuronas amielínicas de diámetro mucho mayor. Por ejemplo, un axón de vertebrado de 12 μm de diámetro y uno de calamar de 600 μm de diámetro conducen impulsos a 12 m/s.

Dos tipos de glía producen vainas de mielina

La Figura 22-14 muestra tres tipos principales de células gliales presentes en el sistema nervioso, dos de las cuales producen vainas de mielina: los *oligodendrocitos* producen vainas para el sistema nervioso central (SNC) y las *células de Schwann* las producen para el sistema nervioso periférico (SNP). Los astrocitos, también mostrados en la figura, facilitan la formación de la sinapsis y la comunicación entre neuronas, y fueron analizados en la Sección 22-1. Un cuarto tipo de glía, la *microglía* (no mostrada), constituye una parte del sistema inmune del SNC. La microglía no está relacionada por linaje con neuronas o con otros tipos de glía, y no será analizada.

Oligodendrocitos Los oligodendrocitos forman la vaina de mielina espiral alrededor de los axones del sistema nervioso central (Fig. 22-14a). Cada oligodendrocito proporciona vainas de mielina a segmentos de múltiples neuronas. Los componentes proteicos princi-

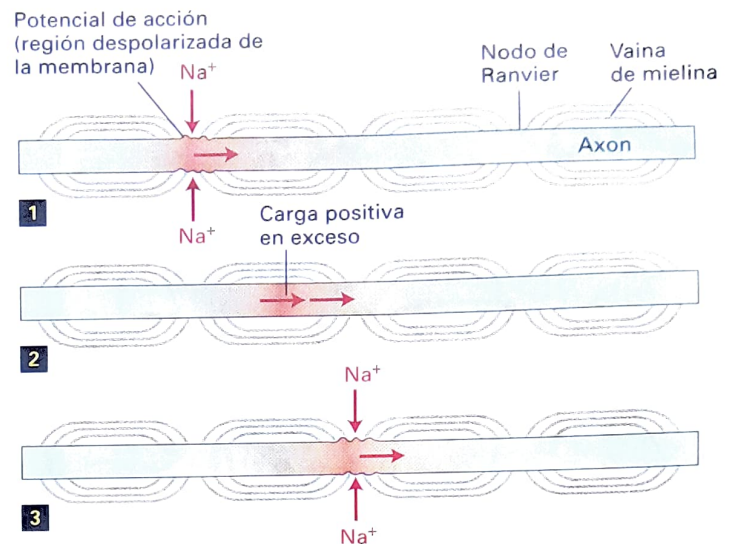


FIGURA 22-13 Conducción de potenciales de acción en axones mielinizados.

Debido a que la capa de mielina hace al axón impermeable al movimiento iónico a través de la membrana y debido a que los canales de Na^+ regulados por voltaje se encuentran solo en la membrana axónica en los nodos de Ranvier, el flujo hacia adentro de iones Na^+ asociado con un potencial de acción puede ocurrir solo en los nodos. Cuando un potencial de acción es generado en un nodo (paso 1), los iones positivos en exceso en el citosol, los cuales no pueden moverse hacia el exterior a través de la vaina, difunden rápidamente a lo largo del axón y causan una despolarización suficiente en el siguiente nodo (paso 2) para inducir un potencial de acción en ese nodo (paso 3). Por medio de este mecanismo, el potencial de acción salta de nodo a nodo a lo largo del axón.

pales son proteína básica de mielina y proteína proteolipídica. La proteína básica de mielina, una proteína de membrana periférica encontrada en los sistemas nerviosos central y periférico (véase Fig. 22-15), tiene siete variantes de corte y empalme de RNA que codifican diferentes formas de la proteína. Se sintetiza por ribosomas localizados en la vaina de mielina en crecimiento, un ejemplo de transporte específico de mRNA a una región celular periférica. La localización de mRNA de proteína básica de mielina depende de los microtúbulos.



El daño a las proteínas producidas por los oligodendrocitos subyace a una enfermedad neurológica humana frecuente, la esclerosis múltiple, usualmente caracterizada por espasmos y debilidad en una o más extremidades, disfunción renal, pérdidas sensoriales localizadas y trastornos de la visión. Este trastorno (la *enfermedad desmielinizante* prototípica) es causado por la pérdida de regiones de mielina en áreas del cerebro y la médula espinal. En pacientes con esclerosis múltiple, la conducción de los potenciales de acción por las neuronas desmielinizadas se ve ralentizada, y los canales de Na^+ se distribuyen hacia el exterior de los nodos, lo que disminuye su concentración nodal. La causa de la enfermedad no es conocida, pero parece que involucra la producción de autoanticuerpos (anticuerpos que se unen a proteínas corporales normales) que reaccionan con la proteína básica de mielina o la secreción de proteasas que destruyen las proteínas de mielina. Un ratón mutante, *shiverer*, tiene una dele-

(a) Glía del sistema nervioso central

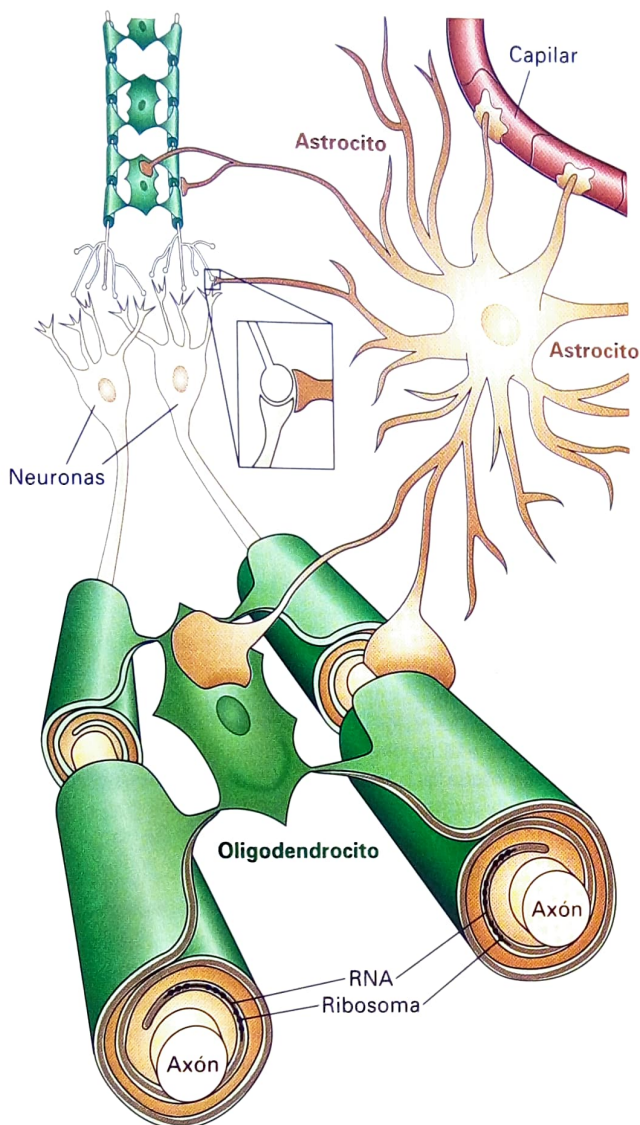
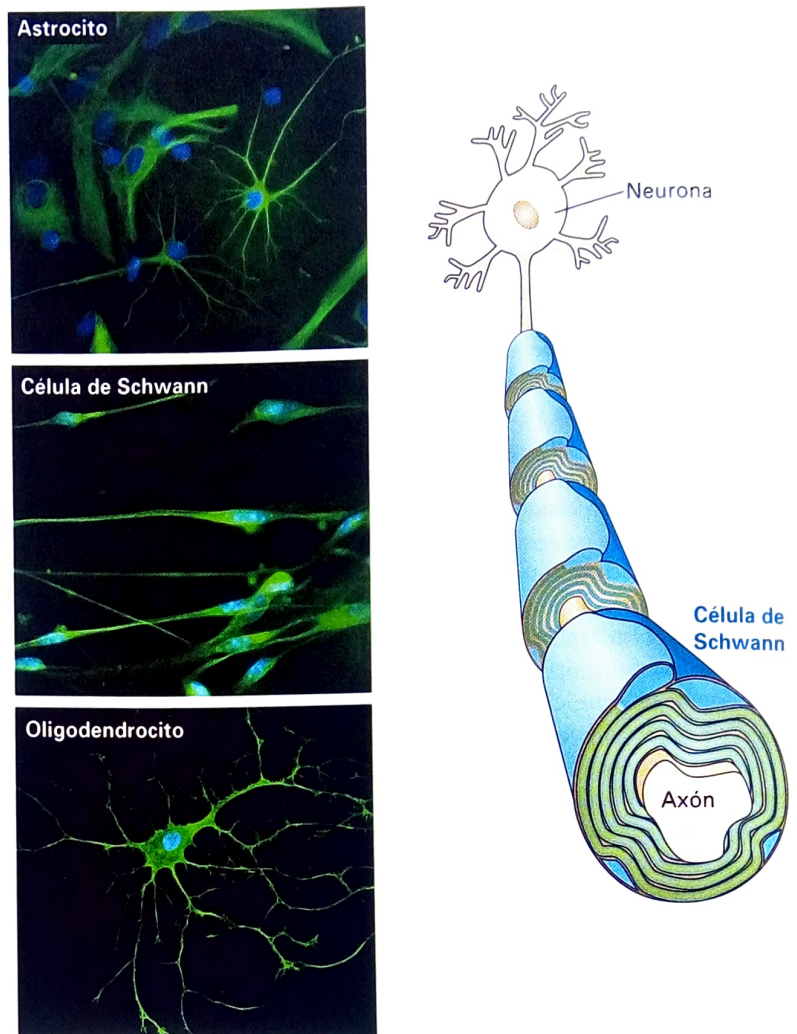


FIGURA 22-14 Tres tipos de células gliales. (a) Un único oligodendrocito en el sistema nervioso central puede mielinizar segmentos de múltiples axones. Los astrocitos interactúan con las neuronas pero no forman mielina.

ción de la mayor parte del gen de proteína básica de mielina, lo cual da lugar a temblores, convulsiones y muerte prematura. De forma similar, mutaciones humanas (enfermedad de Pelizaeus-Merzbacher) y en ratones (*jimpy*) en el gen que codifica la otra gran proteína de mielina del SNC, la proteolípida, causan la pérdida de oligodendrocitos y mielinización inadecuada. ■

Células de Schwann Las células de Schwann forman vainas de mielina alrededor de nervios periféricos. Una vaina de mielina de una célula de Schwann es una envoltura espiral notable (Fig. 22-14b). Un axón largo puede tener tantas como cientos de células de Schwann a lo largo de su longitud, y cada una aportan aislamiento de mielina a un tramo internodal de axón de aproximadamente 1-1,5 μm . Por razones que no se comprenden, no todos los axones están mielinizados. Las mutaciones que eliminan las células de Schwann en ratones causan la muerte de la mayoría de las neuronas.

(b) Glía del sistema nervioso periférico



(b) Cada célula de Schwann aísla una sección de un único axón del sistema nervioso periférico. (De B. Stevens, 2003, *Curr. Biol.* **13**:469, y adaptado de D. L. Sherman y P. Brophy, 2005, *Nature Rev. Neurosci.* **6**:683-690. Photos: Cortesía de Varsha Shukla y Doug Field de NIH).

En contraste con los oligodendrocitos, cada célula de Schwann mieliniza solo un axón. Las vainas se componen de aproximadamente un 70% de lípidos (ricos en colesterol) y un 30% de proteínas. En el sistema nervioso periférico, el componente proteico principal (~80%) de la mielina se llama proteína 0 (P_0), una proteína integral de membrana que tiene dominios de inmunoglobulina (Ig). La proteína básica de mielina también es un componente abundante. Los dominios Ig extracelulares de P_0 unen las superficies de envolturas secuenciales alrededor del axón para compactar el espiral de vaina de mielina (Fig. 22-15). Otras proteínas tienen este tipo de papel en el SNC.



En los seres humanos, la mielina periférica, como la del SNC, es diana de enfermedades autoinmunitarias, lo que implica principalmente la formación de anticuerpos contra P_0 . El síndrome de Guillain-Barré, también conocido como *polineuropatía desmielinizante inflamatoria aguda*, es una de esas enfermedades. El síndrome de Gui-

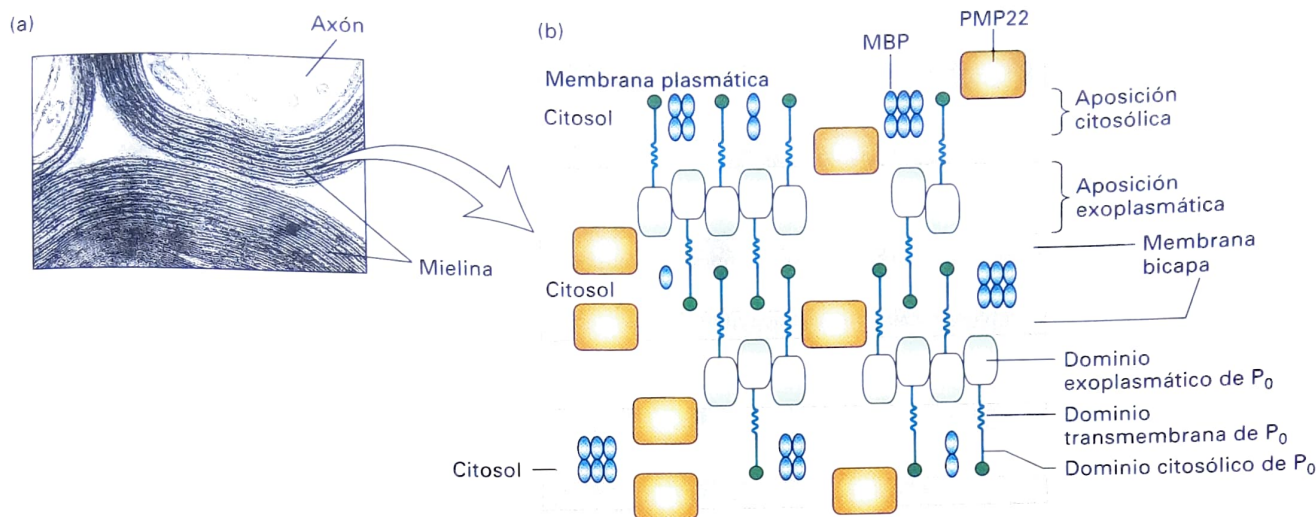


FIGURA 22-15 Formación y estructura de una vaina de mielina en el sistema nervioso periférico. (a) A un aumento alto, la membrana de mielina espiral especializada aparece como una serie de capas, o lamelas, o bicapas lipídicas envueltas alrededor del axón. (b) Vista de cerca de tres capas del espiral de membrana de mielina. Las dos proteínas más abundantes integrales de mielina, P_0 y PMP22, son producidas solo por células de Schwann. El dominio exoplasmático de una proteína P_0 , el cual tiene un pliegue de inmunoglobulina, se asocia con dominios similares que emanan de proteínas P_0 en la superficie de la membrana opuesta, de este modo "uniendo como una cremallera" las superficies de membrana exoplasmática en estrecha aposición.

Estas interacciones son estabilizadas por la unión de un residuo de triptófano en la punta del dominio exoplasmático a lípidos en la membrana opuesta. La aposición estrecha de las caras citosólicas de la membrana podría resultar de la unión de la cola citosólica de cada proteína P_0 a fosfolípidos en la membrana opuesta. PMP22 podría también contribuir a la compactación de la membrana. La proteína básica de mielina (MBP), una proteína citosólica, permanece entre las membranas en estrecha aposición a medida que el citosol es empujado hacia afuera. (Parte [a] © Science VU/C. Raine/Visuals Unlimited; parte [b] adaptado de L. Shapiro y cols., 1996, *Neuron* 17:435, y E. J. Arroyo y S. S. Scherer, 2000, *Histochem. Cell Biol.* 113:1).

Ilain-Barré es la causa más común de parálisis de aparición temprana y ocurre con una frecuencia de 10^{-5} . La causa es desconocida. El desorden neurológico hereditario común llamado *enfermedad de Charcot-Marie-Tooth*, la cual daña las funciones nerviosas periféricas motoras y sensoriales, se debe a la sobreexpresión del gen que codifica la proteína PMP22, otro componente de la mielina nerviosa periférica. ■

Las interacciones entre la glía y las neuronas controlan la ubicación y el espaciado de las vainas de mielina y el ensamblado de la maquinaria de transmisión nerviosa en los nodos de Ranvier. Por ejemplo, los canales de Na^+ regulados por voltaje y las bombas Na^+/K^+ se congregan en los nodos de Ranvier por medio de interacciones con proteínas del citoesqueleto. Mientras que los detalles del proceso de ensamblado del nodo no están comprendidos completamente, un número de actores clave han sido identificados. En el sistema nervioso periférico, donde los procesos han sido más estudiados, moléculas de adhesión a la superficie en la membrana de la célula de Schwann interactúan primero con moléculas neuronales de adhesión a la superficie. Una molécula de adhesión celular a la inmunoglobulina (IgCAM) en la membrana glial, llamada *neurofascina155*, contacta dos proteínas axónicas, contactina y proteína asociada a la contactina, en el borde del nodo. Estos eventos de contacto célula-célula crean límites a cada lado del nodo.

Las proteínas de canal y otras moléculas que se acumularán en el nodo están dispersas inicialmente por todos los axones. Entonces, las proteínas axónicas, incluyendo dos IgCAMs llamadas *NrCAM* y *neurofascina186*, así como ankirina G (Cap. 17), se acumulan dentro del nodo. Las dos IgCAMs se unen a una única proteína de dominio

transmembrana llamada *gliomedina* que se expresa en la célula glial. Los experimentos que eliminaron la producción de gliomedina demostraron que sin ella los nodos no se forman, por lo que es un regulador clave. En el nodo, la ankirina contacta con βIV espectrina, un componente mayoritario del citoesqueleto, y ancla así el complejo proteico del nodo al citoesqueleto. Los canales de Na^+ se asocian con *naurofascina186*, *NrCAM* y ankirina G, y atrapan firmemente el canal en el segmento nodal de la membrana plasmática del axón donde es necesario. Como resultado de estas múltiples interacciones proteína-proteína, la concentración de canales de Na^+ es apenas unas 100 veces más alta en la membrana nodal de axones mielinizados que en la membrana axónica de neuronas amielínicas.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 22.2

Canales iónicos regulados por voltaje y la propagación de potenciales de acción

- Los potenciales de acción son despolarizaciones repentinas de la membrana seguidas de una rápida repolarización.
- Un potencial de acción resulta de la apertura y cierre secuenciales de canales de Na^+ y K^+ regulados por voltaje en la membrana plasmática de neuronas y células musculares (células excitables; véase Fig. 22-7).

- La apertura de canales de Na^+ regulados por voltaje permite el flujo hacia el interior de iones Na^+ durante cerca de 1 ms, lo que causa una gran despolarización repentina de un segmento de la membrana. Los canales luego se cierran y se vuelven incapaces de abrirse (período refractario) por varios milisegundos, y esto impide el flujo posterior de Na^+ (véase Fig. 22-7).
- A medida que el potencial de acción alcanza su pico, la apertura de canales de K^+ regulados por voltaje permite el flujo hacia afuera de iones K^+ , lo cual repolariza y luego hiperpolariza la membrana. A medida que estos canales se cierran, la membrana regresa a su potencial de reposo (véanse Figs. 22-2 y 22-6).
- Los cationes citosólicos en exceso asociados con un potencial de acción generados en un punto del axón se dispersan pasivamente al segmento adyacente y disparan la apertura de canales de Na^+ regulados por voltaje en las inmediaciones y, así, la propagación del potencial de acción a lo largo del axón.
- Debido al período refractario absoluto de los canales de Na^+ regulados por voltaje y a la breve hiperpolarización resultante del flujo hacia afuera de K^+ , el potencial de acción se propaga en una dirección solamente, hacia la terminal axónica (véase Fig. 22-9).
- Los canales de Na^+ y Ca^{2+} regulados por voltaje son proteínas monoméricas con cuatro dominios estructural y funcionalmente similares a cada una de las subunidades en los canales de K^+ regulados por voltaje tetraméricos. Cada dominio o subunidad en los canales de cationes regulados por voltaje contiene seis α hélices transmembrana y un segmento P no helicoidal que forma el poro selectivo de iones (véase Fig. 22-10).
- La apertura de canales regulados por voltaje resulta del movimiento de las paletas S1-S4 positivamente cargadas hacia el lado extracelular de la membrana en respuesta a una despolarización de magnitud suficiente (véase Fig. 22-11).
- El cierre e inactivación de los canales de cationes regulados por voltaje resulta del movimiento de un segmento citosólico “en forma de pelota” hacia el poro abierto (véase Fig. 22-12a).
- La mielinización, la cual incrementa la tasa de conducción del impulso hasta cien veces, permite el característico empaquetamiento compacto de neuronas de los cerebros de los vertebrados.
- En las neuronas mielinizadas, los canales de Na^+ regulados por voltaje están concentrados en los nodos de Ranvier. La despolarización en un nodo se dispersa rápidamente con poca atenuación hacia el siguiente nodo, de manera que el potencial de acción salta de nodo a nodo (véase Fig. 22-13).
- Las vainas de mielina son producidas por células gliales que se envuelven a sí mismas en espirales alrededor de las neuronas. Los oligodendrocitos producen mielina para el SNC; las células de Schwann, para el SNP (véase Fig. 22-14).

22.3 Comunicación en las sinapsis

Como ya hemos analizado, los pulsos eléctricos transmiten señales a lo largo de las neuronas, pero las señales se transmiten entre neuronas y otras células excitables principalmente por medio de señales químicas. Las sinapsis son puntos de unión en los que las neuronas *presinápticas*

liberan estas señales químicas, o neurotransmisores, los cuales luego actúan en las células diana *postsinápticas* (Fig. 22-3). Una célula diana puede ser otra neurona, un músculo o una célula glandular. Por lo general, la comunicación en las sinapsis químicas va solo en una dirección: de la célula pre a la postsináptica.

La llegada de un potencial de acción a una terminal axónica en una célula presináptica lleva a la apertura de canales de Ca^{2+} de membrana plasmática sensibles al voltaje y a un flujo hacia adentro de Ca^{2+} , lo que causa una elevación localizada en la concentración citosólica de Ca^{2+} en la terminal del axón. A su vez, el aumento en Ca^{2+} dispara la fusión con las vesículas sinápticas (40-50 nm) que contienen neurotransmisores y así, la liberación de estos últimos en la hendidura sináptica, el estrecho espacio que separa la célula pre-sináptica de la postsináptica. La membrana de la célula postsináptica se prelocaliza dentro de los aproximadamente 50 nm de la membrana presináptica, lo cual reduce la distancia a la cual los neurotransmisores deben difundirse.

Los neurotransmisores (moléculas pequeñas solubles en agua, como la acetilcolina y la dopamina) se unen a receptores en la célula postsináptica que, a su vez, inducen cambios localizados en el potencial en toda su membrana plasmática. Si el potencial de membrana se vuelve menos negativo (esto es, se despolariza), un potencial de acción tenderá a ser inducido en la célula postsináptica. Tales sinapsis son **excitadoras**, y en general involucran la apertura de canales de Na^+ en la membrana plasmática postsináptica. En contraste, en una **sinapsis inhibitoria**, la unión del neurotransmisor a un receptor en la célula postsináptica causa la hiperpolarización de la membrana plasmática (generación de un potencial interno más negativo). Típicamente, la hiperpolarización es el resultado de la apertura de canales de Cl^- o de K^+ en la membrana plasmática postsináptica, lo cual tiende a obstaculizar que se genere un potencial de acción.

Los receptores de neurotransmisores se dividen en dos amplias clases: canales iónicos regulados por ligando, los cuales se abren inmediatamente con la unión del neurotransmisor, y los receptores acoplados a proteína G (GPCRs). La unión del neurotransmisor a un GPCR induce la apertura o el cierre de una proteína de canal iónico *independiente* durante un período de segundos a minutos. Estos receptores “lentos” de neurotransmisores se analizaron en el **Capítulo 15** junto con los GPCRs que se unen a diferentes tipos de ligandos y modulan la actividad de proteínas citosólicas distintas a las de los canales iónicos. Aquí examinamos la estructura y cómo opera el *receptor nicotínico de acetilcolina*, encontrado en muchas sinapsis nerviosas musculares. Fue el primer canal iónico regulado por ligando en ser purificado, clonado y caracterizado a nivel molecular, y proporciona un paradigma para otros canales iónicos regulados por neurotransmisores.

La duración de la señal del neurotransmisor depende de la cantidad de transmisor liberado por la célula presináptica, la cual a su vez depende de la cantidad de transmisor que ha sido almacenada, así como de la frecuencia de los potenciales de acción que llegan a la sinapsis. La duración de la señal también depende de cuán rápido cualquier neurotransmisor no unido sea degradado en la hendidura sináptica o transportado de regreso a la célula presináptica. Las membranas de la célula presináptica, así como la glía, contienen proteínas transportadoras que bombean neurotransmisores a través de la membrana plasmática de regreso al interior de la célula, lo que así mantiene bajas las concentraciones extracelulares de transmisor.

En esta sección nos centraremos primero en cómo se forman las sinapsis y cómo controlan la secreción regulada de neurotransmisores

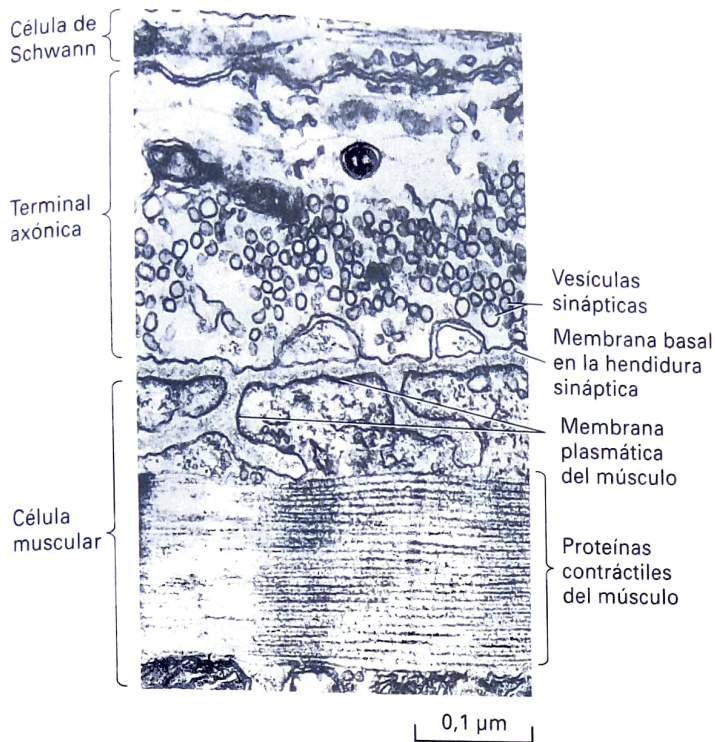


FIGURA 22-16 Vesículas sinápticas en la terminal axónica cercanas a la región en la que el neurotransmisor es liberado. En esta sección longitudinal a través de una unión neuromuscular, la lámina basal yace en la hendidura sináptica separando la neurona de la membrana muscular, la cual está extensamente plegada. Los receptores de acetilcolina están concentrados en la membrana muscular postsináptica en la parte superior y una parte en los lados de los pliegues en la membrana. Una célula de Schwann rodea la terminal axónica. (De J. E. Heuser y T. Reese, 1977, en E. R. Kandel, ed., *The Nervous System*, vol. 1, *Handbook of Physiology*, Williams and Wilkins, p. 266)

en el contexto de los principios básicos del tráfico de vesículas descrito en el **Capítulo 14**. A continuación, veremos los mecanismos que limitan la duración de la señal sináptica y cómo los neurotransmisores son recibidos e interpretados por la célula postsináptica.

La formación de las sinapsis requiere del ensamblado de estructuras pre y postsinápticas

Los axones se extienden desde el cuerpo celular durante el desarrollo, guiados a lo largo del camino por señales desde otras células de manera que la terminal axónica alcance la ubicación correcta (véase **Sección 18-8**). A medida que los axones crecen, entran en contacto con sus potenciales células diana, como dendritas u otras neuronas, y a menudo se forman sinapsis en dichos sitios. En el SNC, las sinapsis con especializaciones presinápticas ocurren frecuentemente a lo largo de todo el axón; en contraste, las neuronas motoras forman sinapsis con células musculares solo en la terminal del axón.

Las neuronas cultivadas en aislamiento no formarán sinapsis muy eficientemente, pero cuando se adiciona glía, la tasa de formación de sinapsis aumenta de manera sustancial. Los astrocitos y las células de Schwann envían señales proteicas a neuronas para estimular la formación de sinapsis y luego ayudar a preservarlas. Una de tales señales es la trombospodina, un componente de la matriz extracelular. Los ratones carentes de dos genes de *trombospodina* tienen solo el 70% del número normal de sinapsis en su cerebro. La comunicación mutua entre las neuronas y la glía que las rodea es frecuente y compleja, lo que hace de las señales y la información que portan un área de investigación activa. También hay evidencia de que las neuronas forman sinapsis en la glía. Mientras que la glía no produce potenciales de acción, sí tiene conformaciones complejas de canales y flujos de iones.

En el sitio de una sinapsis, la célula presináptica tiene cientos a miles de vesículas sinápticas, algunas ancladas a la membrana y otras esperando como reserva. La liberación de neurotransmisor en

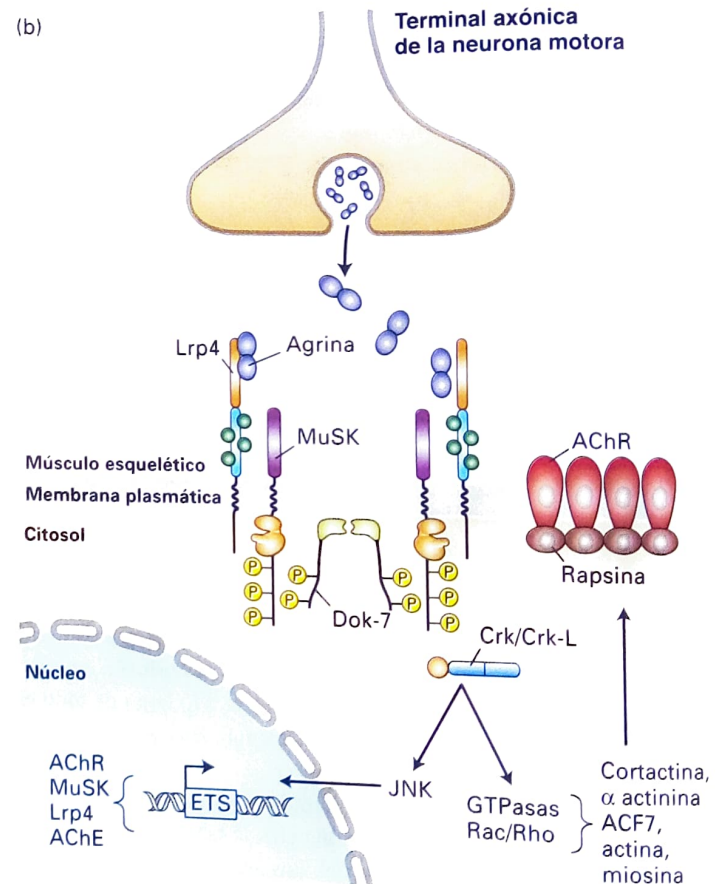
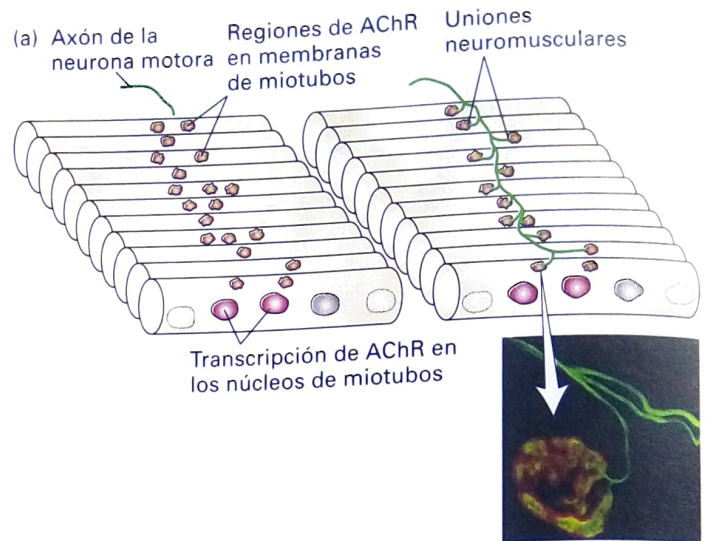
la hendidura sináptica ocurre en la *zona activa*, una región especializada de la membrana plasmática que contiene un ensamblaje notable de proteínas cuyas funciones incluyen modificar las propiedades de las vesículas sinápticas y ponerlas en posición para el anclaje y fusión con la membrana plasmática. Vista por microscopía electrónica, la zona activa tiene material denso en electrones y filamentos citoesqueletales finos (**Fig. 22-16**). Una región similarmente densa de estructuras especializadas se ve a través de la sinapsis en la célula postsináptica, la *densidad postsináptica*. Las moléculas de adhesión celular que conectan las células presinápticas y las postsinápticas mantienen la zona activa y la densidad postsináptica alineadas. Después de la liberación de las vesículas sinápticas en respuesta a un potencial de acción, la neurona presináptica recupera las proteínas de membrana de vesículas sinápticas por *endocitosis* tanto dentro como fuera de la zona activa.

El ensamblado de sinapsis ha sido extensamente estudiado en la *unión neuromuscular* (**Fig. 22-17**). En estas sinapsis, la acetilcolina es el neurotransmisor producido por las neuronas motoras, y su receptor, AChR, es producido por la célula muscular postsináptica. Los precursores de células musculares, los mioblastos, puestos en cultivo se fusionarán espontáneamente en miotubos multinucleados que se ven similares a células musculares normales. A medida que se forman los miotubos, AChR es producido cerca del centro de la célula e insertado en la membrana plasmática del miotubo, donde forma regiones difusas de membrana (**Fig. 22-17a**).

La formación de la sinapsis neuromuscular es un proceso de múltiples pasos que requiere de interacciones de señalización entre neuronas motoras y fibras musculares. Un actor clave es **MuSK**, un receptor tiro-sincinasa que se localiza en las regiones difusas ricas en AChR de la membrana plasmática del miotubo. De formas que se desconocen, MuSK induce la agrupación de receptores de acetilcolina y sirve para atraer el extremo de los axones de neuronas motoras en crecimiento. Por ejemplo, la inactivación de MuSK inhibe ambos procesos, mientras que su sobreexpresión en células musculares en cultivo induce el crecimiento de neuronas motoras en todo el músculo y la formación de sinapsis en exceso.

Otro actor clave es **agrina**, una glucoproteína sintetizada por neuronas motoras en desarrollo, transportada en vesículas a lo largo de los microtúbulos axónicos y secretada cerca de los miotubos en desarrollo. Agrina se une a LRP4, una proteína de un único paso transmembrana; esto estimula una asociación entre LRP4 y MuSK e incrementa la actividad cinasa de MuSK (**Fig. 22-17b**). Esto da lugar a la activación de varias vías de transducción de la señal corriente abajo, una de las cuales conduce a la activación de Rac y Rho (véase **Sección 17-3**) y a la formación de agrupamientos de receptores de acetilcolina con la proteína de citoesqueleto rapsina. Esta interacción, junto con la unión de otras proteínas citoesqueletales (incluyendo actina), lleva a la loca-

FIGURA 22-17 Formación de la unión neuromuscular. (a) Interacciones neurona motora-miotubo. Seguido de la fusión de mioblastos para formar miotubos multinucleados, los núcleos sintetizan mRNA de receptor de acetilcolina (AChR). Los núcleos cercanos al centro de cada fibra muscular sintetizan significativamente más mRNA de AChR que otros núcleos. Los AChR, junto con los receptores de cinasas MuSK, se acumulan en regiones de la membrana cerca del centro de la célula, la región sináptica eventual del músculo, previa a e independiente de invasión; se dice que la célula tiene un "prepatrón". La terminal axónica de la neurona motora crece hacia estas agrupaciones de AChR y secreta la glucoproteína agrina, lo cual a su vez induce la agrupación de AChR (rojo oscuro) y de MuSK alrededor de las terminales axónicas (verde) y forma la unión neuromuscular. (Recuadro) Micrografía de un ratón posnatal (3 semanas de edad), vista por tinción de axones (neurofilamento) y vesículas sinápticas (sinaptotofina), mostrados todos juntos en verde, y AChR, mostrados en rojo. (b) Señalización corriente abajo de los receptores de agrina. Los axones motores secretan agrina, la cual estabiliza la diferenciación postsináptica mediante la unión de LRP4 y la activación de la actividad cinasa de MuSK. La fosforilación de tirosinas en la región de yuxtaposición de membranas, indicada por la P amarilla dentro de un círculo, estimula el reclutamiento y la fosforilación de tirosinas de Dok-7, una proteína adaptadora que se expresa selectivamente en músculo, forma un dímero, estimula así la actividad cinasa de MuSK y recluta la proteína adaptadora Crk/Crk-L. Crk/Crk-L es esencial para activar una vía dependiente de Rac/Rho y rapsina para la agrupación de AChR opuesta a la terminal axónica presináptica; esta vía involucra varias proteínas del citoesqueleto, incluyendo actina y miosinas. La vía para la transcripción específica de una sinapsis es menos comprendida, pero probablemente involucra la activación dependiente de la cinasa JNK de la familia ETS de factores de transcripción que estimulan la expresión de múltiples genes que codifican proteínas sinápticas tales como receptores de acetilcolina, MuSK, LRP4 y acetilcolinesterasa (AChE), la enzima extracelular que se localiza en la hendidura sináptica y que degrada acetilcolina a colina y acetato. (Micrografía de Herbst, P. y cols., 2002, *Development*, 129:5449-5460)



lización de receptores de acetilcolina opuesta al extremo nervioso en la unión neuromuscular. La densidad de receptores de acetilcolina en una sinapsis madura alcanza $\sim 10\,000\text{--}20\,000/\mu\text{m}^2$, mientras que en otra parte en la membrana plasmática la densidad es $\sim 10/\mu\text{m}^2$. Otra vía, de igual modo no bien comprendida, conduce a la activación de factores de transcripción de la familia ETS y a la estimulación de la expresión de múltiples genes que codifican proteínas sinápticas tales como rapsina y receptores de acetilcolina.

Los neurotransmisores son transportados a las vesículas sinápticas por proteínas de antiporte ligadas a H^+

En esta sección, nos fijamos en cómo los neurotransmisores son empaquetados en *vesículas sinápticas* unidas a la membrana en el extremo axónico. Numerosas moléculas pequeñas funcionan como neurotransmisores en varias sinapsis. Con excepción de acetilcolina, los neurotransmisores mostrados en la *Figura 22-18* son aminoácidos o derivados de aminoácidos. Los nucleótidos tales como el ATP y los correspondientes nucleósidos, los cuales carecen de grupos fosfato, también funcionan como neurotransmisores. En general, cada neurona produce solo un tipo de neurotransmisor. Mientras que los tipos de neurotransmisores son variados y operan en diferentes partes del sistema nervioso, toda la señalización por neurotransmisores tiene uno o dos resultados: la transmisión de una señal eléctrica o su inhibición.

Todos estos neurotransmisores son sintetizados en el citosol e importados a las vesículas sinápticas unidas a membrana dentro de 40-50 nm de diámetro, y son almacenados. Estas vesículas tienen el funcionamiento de una bomba de protones clase V en la membrana de la vesícula. En forma similar a la acumulación de metabolitos en vacuolas de plantas (véase *Fig. 11-29*), este gradiente de concentración de protones (lumen vesicular $>$ citosol) acciona la entrada de neurotransmisores por proteínas de antiporte de neurotransmisores ligando específicos ligados a H^+ en la membrana vesicular (*Fig. 22-19*).

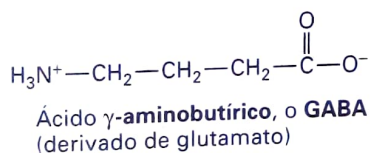
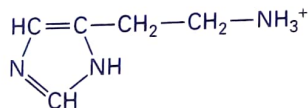
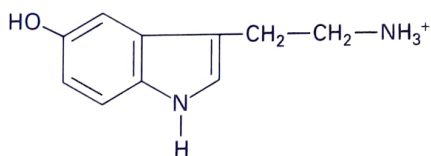
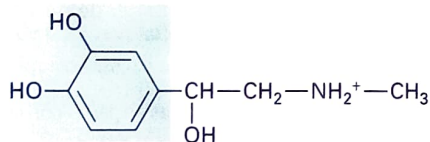
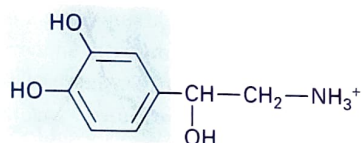
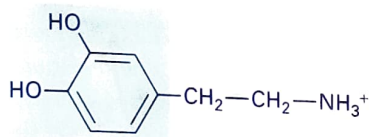
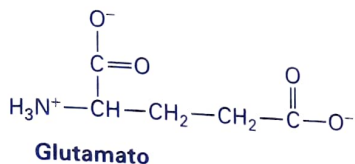
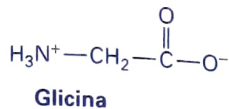
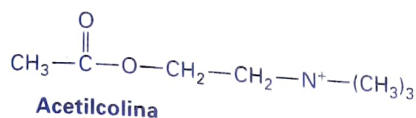
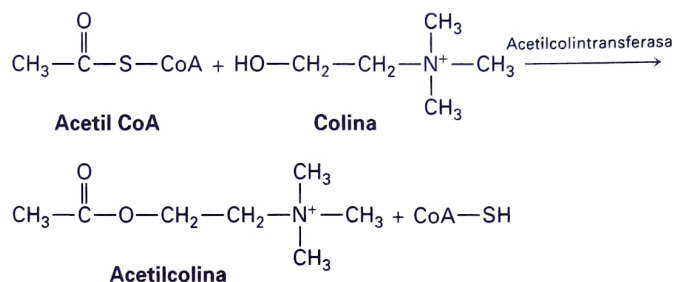


FIGURA 22-18 Estructuras de varias moléculas pequeñas que funcionan como neurotransmisores. Con excepción de acetilcolina, todos estos son aminoácidos (glicina y glutamato) o derivados de los aminoácidos indicados. Los tres transmisores sintetizados a partir de tirosina, los cuales contienen el grupo funcional catecol (destacado en azul), se conocen como *catecolaminas*.

Por ejemplo, la acetilcolina se sintetiza en el citosol a partir de acetil coenzima A (acetil CoA), un intermediario en la degradación de la glucosa y ácidos grasos, y la colina en una reacción catalizada por acetilcolintransferasa:



Las vesículas sinápticas captan y concentran acetilcolina del citosol contra un gradiente de concentración empinado, utilizando una proteína antiporte H^+ /acetilcolina en la membrana vesicular. Como con otras proteínas antiporte, la exportación de protones de la vesícula en formación a favor de su gradiente electroquímico acciona la captación del neurotransmisor. Curiosamente, el gen que codifica este antitransportador está contenido completamente dentro del primer intrón del gen que codifica acetilcolintransferasa, un mecanismo conservado a través de la evolución para asegurar la expresión coordinada de estas dos proteínas.

Diferentes proteínas de antiporte H^+ /neurotransmisor se utilizan para el importe de otros neurotransmisores a las vesículas sinápticas. Por ejemplo, el glutamato se importa a las vesículas sinápticas mediante proteínas llamadas *transportadores de glutamato vesicular*. Los transportadores de glutamato vesicular son extremadamente específicos para glutamato, pero tienen una afinidad más bien baja por el sustrato ($K_m = 1-3 \text{ mM}$). Como el transportador de acetilcolina, los transportadores de glutamato vesicular son proteínas de antiporte y movilizan glutamato hacia las vesículas sinápticas mientras los protones se mueven en la otra dirección.

Las vesículas sinápticas cargadas con neurotransmisores se localizan cerca de la membrana plasmática

Una conformación altamente organizada de fibras citoesqueletales en la terminal axónica ayuda a localizar las vesículas sinápticas en la zona activa. Las vesículas mismas están vinculadas entre sí por *sinapsina*, una fosoproteína fibrosa asociada con la superficie citosólica de todas las membranas vesiculares sinápticas. Los filamentos de sinapsina también emergen desde la membrana plasmática y se unen a sinapsina asociada a vesículas. Estas interacciones probablemente mantienen las vesículas

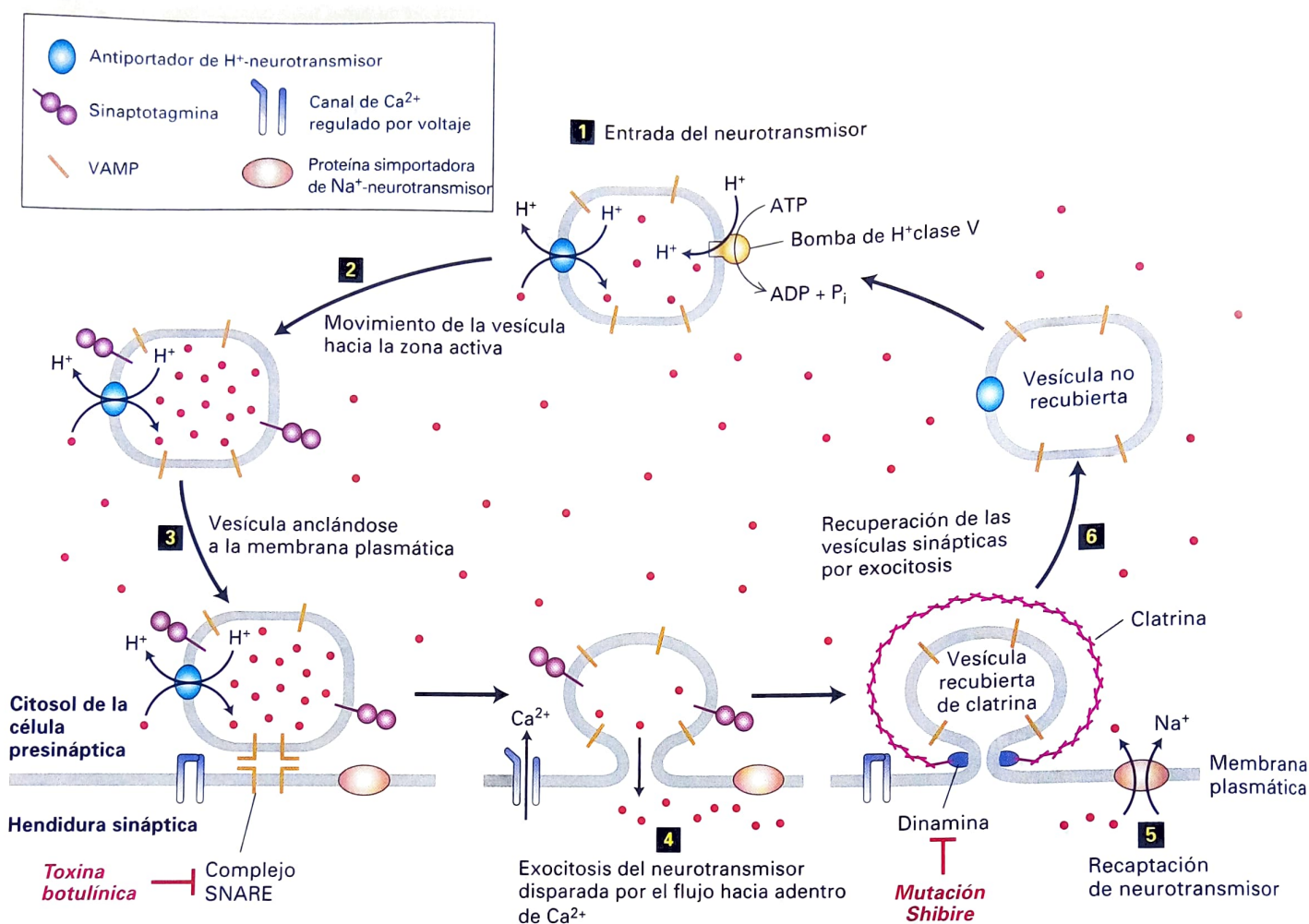


FIGURA 22-19 Ciclo de los neurotransmisores y de las vesículas sinápticas en las terminales axónicas. La mayoría de las vesículas sinápticas se forman por reciclado endocítico, como se esquematiza aquí. Típicamente, el ciclo completo dura alrededor de 60 segundos. Paso **1**: las vesículas no recubiertas expresan una bomba de protones de tipo V (naranja) y un solo tipo de antiportador de H^+ -neurotransmisor (azul), específico para el neurotransmisor particular, para importar neurotransmisores (puntos rojos) desde el citosol. Paso **2**: las vesículas sinápticas cargadas con el neurotransmisor se mueven a la zona activa. Paso **3**: las vesículas se anclan en sitios definidos de la membrana plasmática de la célula presináptica, y los v-SNARE de las vesículas, llamados VAMP, se unen a los t-SNARE de la membrana plasmática y forman un complejo SNARE. La sinaptotagmina impide la fusión de membranas y la liberación de neurotransmisores. La toxina botulínica inhibe la exocitosis cortando proteolíticamente a VAMP, el v-SNARE en las vesículas. Paso **4**: en respuesta a un impulso nervioso (potencial de acción), los canales de Ca^{2+} regulados por voltaje en la membrana plasmática se abren y permiten el flujo hacia el interior de Ca^{2+} desde el medio extracelular. El cambio conformacional resultante inducido por Ca^{2+} en la

sinaptotagmina lleva a la fusión de las vesículas ancladas con la membrana plasmática y a la liberación de neurotransmisores a la hendidura sináptica. La sinaptotagmina no participa en los pasos posteriores del reciclado de vesículas o la entrada de neurotransmisor aunque todavía está presente. Paso **5**: las proteínas simportadoras de Na^+ captan neurotransmisor de la hendidura sináptica hacia el citosol, lo cual limita la duración del potencial de acción y recarga parcialmente la célula con transmisor. Paso **6**: las vesículas se recuperan por medio de endocitosis y crean vesículas no recubiertas, listas para ser llenadas nuevamente y comenzar el ciclo de nuevo. Después de que las vesículas recubiertas de clatrina/AP que contienen proteínas v-SNARE y transportadores de neurotransmisores brotan hacia el interior y son pinzadas en un proceso mediado por dinamina, pierden sus proteínas de cubierta. Las mutaciones en la dinamina tales como *shibire* en la *Drosophila* bloquean la nueva formación de las vesículas sinápticas, lo que da lugar a la parálisis. A diferencia de la mayoría de los neurotransmisores, la acetilcolina no se recicla. (Véase K. Takei y cols., 1996, *J. Cell Biol.* **133**:1237; V. Murthy y C. Stevens, 1998, *Nature* **392**:497, y R. Jahn y cols., 2003, *Cell* **112**:519).

sinápticas cerca de la parte de la membrana plasmática cuya cara está orientada hacia la sinapsis. En efecto, ratones con inactivación de la sinapsina, aunque viables, son propensos a convulsiones; durante la estimulación repetitiva de muchas neuronas en tales ratones, el número de vesículas sinápticas que se fusionan con la membrana plasmática se reduce mucho. En consecuencia, se cree que las sinapsis reclutan vesículas sinápticas a la zona activa.

El flujo de Ca^{2+} hacia el interior dispara la liberación de neurotransmisores

La exocitosis de neurotransmisores desde las vesículas sinápticas involucra que las vesículas sean elegidas como diana y eventos de fusión similares a aquellos que ocurren durante el transporte intracelular de proteínas secretadas y de membrana plasmática (Cap. 14). Sin embargo, dos características críticas únicas para la función sináptica difieren

de otras vías secretorias: (1) la secreción está estrechamente acoplada a la llegada de un potencial de acción a la terminal axónica, y (2) las vesículas sinápticas se reciclan localmente a la terminal del axón después de la fusión con la membrana plasmática. La Figura 22-19 muestra todo el ciclo completo en el que las vesículas sinápticas se llenan con neurotransmisor, liberan sus contenidos y son recicladas.

La despolarización de la membrana plasmática no puede, por sí misma, hacer que las vesículas sinápticas se fusionen con la membrana plasmática. Con el fin de desencadenar la fusión de vesículas, un potencial de acción debe ser convertido en una señal química (a saber, un aumento localizado en la concentración citosólica de Ca^{2+}). Los transductores de las señales eléctricas son *canales de Ca^{2+} regulados por voltaje* localizados en la región de la membrana plasmática adyacente a las vesículas sinápticas. La despolarización de la membrana debida a la llegada de un potencial de acción abre estos canales y permite un flujo hacia adentro de iones Ca^{2+} desde el medio extracelular hacia la región de la terminal axónica próxima a las vesículas sinápticas ancladas. Cabe destacar que el aumento en Ca^{2+} citosólico es localizado. También es transitorio, ya que el exceso de Ca^{2+} es rápidamente bombeado hacia afuera de la célula por bombas de Ca^{2+} de la membrana plasmática.

Un simple experimento demuestra la importancia de los canales de Ca^{2+} regulados por voltaje en la liberación de neurotransmisores. Una preparación de neuronas en un medio que contiene Ca^{2+} se trata con tetrodotoxina, un agente que bloquea los canales de Na^+ regulados por voltaje y así previene la conducción de potenciales de acción. Como se espera, no se secretan neurotransmisores al medio de cultivo. Si la membrana axónica es entonces despolarizada artificialmente, haciendo que el medio sea de ~ 100 mM KCL, en presencia de Ca^{2+} extracelular, los neurotransmisores son liberados desde las células debido al flujo hacia adentro de Ca^{2+} a través de canales de calcio regulados por voltaje abiertos. En efecto, experimentos de fijación de membranas muestran que los canales de Ca^{2+} regulados por voltaje, al igual que los canales de Na^+ regulados por voltaje, se abren transitoriamente con la despolarización de la membrana.

Dos grupos de vesículas sinápticas llenas de neurotransmisor están presentes en la terminal axónica: aquellas ancladas a la membrana plasmática, las cuales pueden ser excitadas fácilmente, y la gran mayoría que está en reserva en la zona activa cerca de la membrana plasmática. Cada aumento en Ca^{2+} generado por la llegada de un único potencial de acción dispara la exocitosis de alrededor del 10% de las vesículas ancladas. Entonces, las proteínas de membrana únicas de las vesículas sinápticas son internalizadas específicamente por endocitosis, por lo general mediante los mismos tipos de vesículas recubiertas de clatrina utilizadas para recuperar otras proteínas de membrana plasmática por otros tipos de células. Luego de que las vesículas endocitadas pierden su cubierta de clatrina, son rápidamente llenadas de nuevo con neurotransmisor. La habilidad de muchas neuronas de disparar 50 veces por segundo es una clara evidencia de que el reciclado de proteínas de membrana de la vesícula es rápido. La maquinaria de la endocitosis y la exocitosis es altamente conservada, y se describe con mayor detalle en el Capítulo 14.

Una proteína de unión al calcio regula la fusión de vesículas sinápticas con la membrana plasmática

La fusión de vesículas sinápticas con la membrana plasmática de la terminal axónica depende de **SNARE**, el mismo tipo de proteínas que media la fusión de membranas de otras vesículas secretoras reguladas.

El principal v-SNARE en vesículas sinápticas (VAMP) une estrechamente sintaxina y SNAP-25, los principales t-SNARE en la membrana plasmática de la terminal axónica, para formar complejos SNARE de cuatro hélices. Después de la fusión, las proteínas SNAP y NSF dentro de la terminal del axón promueven la disociación de VAMP de los t-SNARE, como en la fusión de vesículas secretoras representada en la Figura 14-10.



El mecanismo de acción de la toxina botulínica proporciona una evidencia fuerte del papel de VAMP en la exocitosis de neurotransmisor, una proteína bacteriana que puede causar la parálisis y la muerte características del *botulismo*, un tipo de intoxicación alimenticia. La toxina se compone de dos polipéptidos: uno se une a neuronas motoras que liberan acetilcolina en las sinapsis con células musculares y facilita la entrada del otro polipéptido, una proteasa, al citosol de la terminal axónica. La única proteína que esta proteasa corta es VAMP (véase Fig. 22-19, paso 5). Luego de que la proteasa botulínica entra en una terminal axónica, las vesículas sinápticas que aún no están ancladas pierden rápidamente su habilidad de fusionarse con la membrana plasmática debido a que el corte de VAMP impide el ensamblado de complejos SNARE. El bloqueo resultante en la liberación de acetilcolina en las sinapsis neuromusculares causa parálisis. Sin embargo, las vesículas que ya están ancladas exhiben una notable resistencia a la toxina, lo que indica que los complejos SNARE ya podrían estar en un estado parcialmente ensamblado y resistente a proteasas cuando las vesículas están ancladas en la membrana plasmática. ■

La señal que dispara la exocitosis de vesículas sinápticas ancladas es un aumento muy localizado en la concentración de Ca^{2+} en el citosol cercano a las vesículas de $0,1 \mu\text{M}$ (característico de células en reposo) a $1-100 \mu\text{M}$ tras la llegada de un potencial de acción en células estimuladas. La velocidad a la cual las vesículas sinápticas se fusionan con la membrana presináptica después de un aumento en el Ca^{2+} citosólico (menor de 1 ms) indica que la maquinaria de fusión está ensamblada por completo en el estado de reposo y que puede experimentar rápidamente un cambio conformacional, lo cual da lugar a la exocitosis del neurotransmisor (Fig. 22-20). Una proteína de unión a Ca^{2+} llamada *sinaptotagmina*, localizada en la membrana de vesículas sinápticas, es un componente clave de la maquinaria de fusión vesicular que dispara la exocitosis en respuesta a Ca^{2+} . Se cree que una proteína llamada complexina se une al manojo de α hélices de un complejo v-SNARE/t-SNARE ensamblado que une la vesícula sináptica y las membranas plasmáticas e impide el paso final de fusión. La unión de Ca^{2+} a sinaptotagmina alivia esta inhibición al liberar complexina y al permitir que el evento de fusión ocurra con mucha rapidez. Mientras se debaten los mecanismos por los cuales la sinaptotagmina funciona, la Figura 22-20 muestra un modelo ampliamente aceptado.

Varias líneas de evidencia apoyan un papel de la sinaptotagmina como sensor de Ca^{2+} para la exocitosis de neurotransmisores. Embiones mutantes de *Drosophila* y *C. elegans* que carecen por completo de sinaptotagmina no pueden eclosionar y tienen contracciones musculares muy reducidas y descoordinadas. Las larvas con mutaciones de pérdida parcial de la función de sinaptotagmina sobreviven, pero sus neuronas son defectuosas en la exocitosis vesicular estimulada por Ca^{2+} . Por otra parte, en ratones, las mutaciones en sinaptotagmina que disminuyen su afinidad por Ca^{2+} causan un correspondiente incremento en la cantidad de Ca^{2+} citosólico que se necesita para disparar la exocitosis rápida.

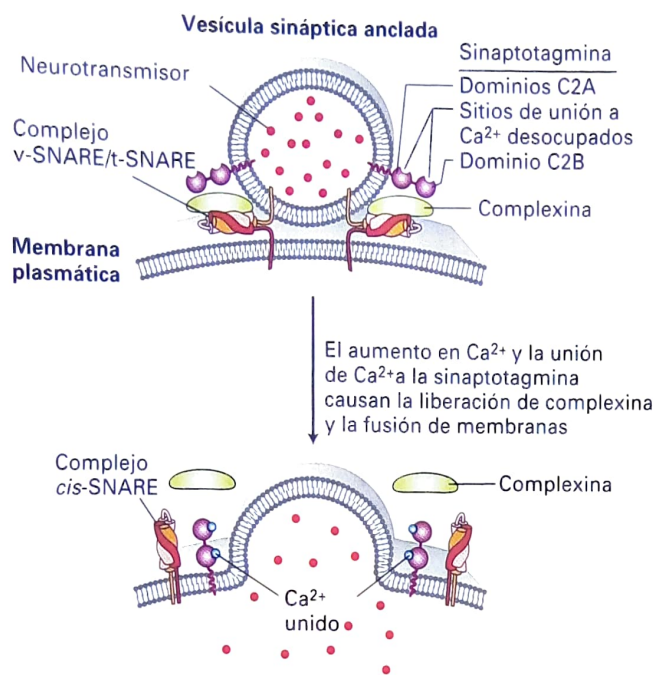


FIGURA 22-20 Fusión de las vesículas sinápticas con la membrana plasmática mediada por sinaptotagmina. Solo unas pocas vesículas sinápticas están ancladas a la membrana plasmática presináptica; estas están cebadas para la fusión con la membrana plasmática. Las estrechas interconexiones entre la vesícula sináptica y la membrana plasmática están mediadas en parte por manojos de cuatro α hélices derivadas de los complejos de proteínas v-SNARE de las vesículas y t-SNARE de la membrana plasmática (véase Fig. 14-10). La fusión de las dos membranas es inhibida por la unión de la proteína complejina al complejo v-SNARE/t-SNARE. La sinaptotagmina se compone de una secuencia intraluminal corta, una sola α hélice transmembrana que la ancla a la membrana de la vesícula sináptica, un vinculador y dos dominios de unión a Ca^{2+} denominados C2A y C2B. La sinaptotagmina sin Ca^{2+} unido podría también unirse al complejo v-SNARE/t-SNARE e impedir la fusión de membranas. Un aumento localizado en Ca^{2+} permite que los iones Ca^{2+} se unan a la sinaptotagmina y alteren así su conformación tridimensional. Esto dispara la liberación del inhibidor de fusión complejina, la unión (o unión modificada) de sinaptotagmina al complejo v-SNARE/t-SNARE, la fusión de membranas instantánea y la liberación de neurotransmisores hacia el espacio extracelular. (De T. Südhof y J. Rothman, 2009, *Science* **323**:474.)

Moscas mutantes carentes de dinamina no pueden reciclar las vesículas sinápticas

Las vesículas sinápticas se forman primariamente por gemación endocítica de la membrana plasmática de la terminal axónica. En general, la endocitosis involucra depresiones recubiertas de clatrina y es bastante específica, debido a que varias proteínas de membrana únicas de las vesículas sinápticas (transportadores de neurotransmisores) son incorporadas específicamente en las vesículas endocitadas, y las proteínas de membrana residentes (el canal de Ca^{2+} sensible a voltaje) permanecen. De esta manera, las proteínas de membrana de la vesícula sináptica pueden ser reutilizadas y las vesículas recicladas, rellenas con neurotransmisor (véase Fig. 22-19, paso 6).

Como en la formación de otras vesículas recubiertas de clatrina/AP, el pinzamiento de las vesículas sinápticas endocitadas requiere

de la proteína de unión a GTP *dinamina* (véase Fig. 14-19). En efecto, el análisis de un mutante de *Drosophila* sensible a la temperatura, llamado *shibire* (*shi*), que codifica la proteína dinamina de mosca, proveyó evidencia temprana del papel de la dinamina en la endocitosis. A la temperatura permisiva de 20 °C, las moscas mutantes son normales, pero a la temperatura no permisiva de 30 °C, se paralizan normales, debido a que el pinzamiento de (*shibire*, “paralizado”, en japonés), las depresiones recubiertas de clatrina en neuronas y otras células está bloqueado. Cuando se observa en el microscopio electrónico, las neuronas *shi* a 30 °C exhiben abundantes depresiones recubiertas de clatrina con largos cuellos pero pocas vesículas recubiertas de clatrina con largos cuellos pero pocas vesículas recubiertas de clatrina. La aparición de terminales nerviosas en mutantes *shi* a la temperatura no permisiva es similar a aquella de las terminales de neuronas normales incubadas en presencia de un análogo no hidrolizable de GTP (véase Fig. 14-20). Debido a su incapacidad de pinzar nuevas vesículas sinápticas, en las neuronas en mutantes *shi* finalmente se agotan las vesículas sinápticas cuando las moscas son expuestas a la temperatura no permisiva, lo que da lugar al cese de la señalización sináptica y a parálisis.

La señalización en las sinapsis es terminada por la degradación o la recaptación de neurotransmisores

Tras su liberación desde una célula presináptica, los neurotransmisores deben ser eliminados o destruidos para prevenir la estimulación continua de la célula postsináptica. La señalización puede ser terminada por difusión de un transmisor lejos de la hendidura sináptica, pero este es un proceso lento. En su lugar, uno o dos mecanismos más rápidos terminan la acción de los neurotransmisores en la mayoría de las sinapsis.

La señalización por acetilcolina se termina cuando es hidrolizada a acetato y colina por la *acetilcolinesterasa*, una enzima localizada en la hendidura sináptica. La colina liberada en esta reacción es transportada de regreso a la terminal axónica presináptica por el simportador $\text{Na}^+/\text{colina}$ y utilizada en la síntesis de más acetilcolina. El funcionamiento de este transportador es similar al de los simportadores vinculados al Na^+ utilizados para transportar glucosa hacia las células en contra de un gradiente de concentración (véase Fig. 11-26).

Con excepción de la acetilcolina, todos los neurotransmisores mostrados en la Figura 22-18 son eliminados de la hendidura sináptica por transporte de regreso a la terminal del axón que los liberó. Así, estos neurotransmisores son reciclados intactos, como se muestra en la Figura 22-19 (paso 5). Los transportadores para GABA, noradrenalina, dopamina y serotonina fueron los primeros en ser clonados y estudiados. Estas cuatro proteínas de transporte son todas simportadores vinculados al Na^+ . Son idénticas en el 60-70% de sus secuencias aminoacídicas, y se cree que cada una contiene 12 α hélices transmembrana. Como con otros simportadores de Na^+ , el movimiento de Na^+ hacia la célula a favor de su gradiente electroquímico provee la energía para la captación del neurotransmisor. Para mantener la electroneutralidad, el Cl^- es a menudo transportado a través de un canal iónico junto con el Na^+ y el neurotransmisor.



Los neurotransmisores y sus transportadores son dianas de una variedad de fármacos poderosos y a veces devastadores. La cocaína se une a e inhibe los transportadores para noradrenalina, serotonina y dopamina. En particular, la unión de cocaína al transportador de dopamina inhibe la recaptación de dopamina y causa que una concentra-

ción más alta de lo normal de esta permanezca en la hendidura sináptica, con lo cual se prolonga la estimulación de las neuronas postsinápticas. La exposición sostenida a la cocaína, como ocurre con su uso habitual, da lugar a la regulación disminuida de los receptores de dopamina y, por lo tanto, a una alteración en la regulación de la señalización dopaminérgica. Se cree que la señalización dopaminérgica disminuida luego del uso crónico de cocaína podría contribuir a desórdenes depresivos del humor y sensibilizar importantes circuitos cerebrales de gratificación para los efectos reforzados de la cocaína, lo que conduce a la adicción. En forma similar, los agentes terapéuticos como los fármacos antidepressivos fluoxetina (Prozac®) e imipramina bloquean la recaptación de serotonina, y el antidepressivo tricíclico desipramina bloquea la recaptación de noradrenalina. Como resultado, estos agentes también causan que una concentración de neurotransmisor más alta de lo normal permanezca en la hendidura sináptica y prolongue la estimulación de neuronas postsinápticas. A menudo, la fluoxetina y fármacos que actúan en forma similar tales como la paroxetina (Paxil®) y la sertralina (Zoloft®) son referidas colectivamente como inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina. ■

La apertura de canales de cationes regulados por acetilcolina da lugar a la contracción muscular

En esta sección vemos cómo la unión de neurotransmisores por los receptores en las células postsinápticas lleva a cambios en el potencial de membrana de la célula, y se utiliza la comunicación entre neuronas motoras y músculos como ejemplo. En estas sinapsis, llamadas uniones neuromusculares, la acetilcolina es el neurotransmisor. Una única terminal axónica de una neurona motora de rana puede contener un millón o más de vesículas sinápticas, cada una con 1 000-10 000 moléculas de acetilcolina. Con frecuencia, estas vesículas se acumulan en hileras en la zona activa (véanse Figs. 22-16 y 22-17). Una neurona de este tipo puede formar sinapsis con una única célula de músculo esquelético en varios cientos de puntos.

El receptor nicotínico de acetilcolina, el cual es expresado en células musculares, es un *canal regulado por ligando* que admite tanto K^+ como Na^+ . Estos receptores también son producidos en neuronas cerebrales y tienen importancia en el aprendizaje y la memoria; la pérdida del receptor de acetilcolina se observa en la esquizofrenia, la epilepsia, la adicción a las drogas y la enfermedad de Alzheimer. Los anticuerpos contra los receptores de acetilcolina constituyen una parte mayoritaria de la reactividad autoinmunitaria en la enfermedad miastenia grave. El receptor recibe su nombre debido a que se une a la nicotina. Ha sido implicado en la adicción a la nicotina en fumadores de tabaco. Existen al menos 14 isoformas diferentes del receptor, las cuales se ensamblan en homo y heteropentámeros con propiedades variadas.

El efecto de la acetilcolina en este receptor puede determinarse por estudios de fijación de membranas en regiones de membranas plasmáticas musculares aislados con el exterior hacia afuera. La fijación de membranas con el exterior hacia afuera es una técnica que mide los efectos de los solutos extracelulares en los receptores de canal dentro de la región aislada (véase Fig. 11-22c). Tales mediciones han mostrado que la acetilcolina causa la apertura de un canal catiónico en el receptor capaz de transmitir 15 000-30 000 iones Na^+ y K^+ por milisegundo. Sin embargo, ya que el potencial de reposo de la membrana plasmática muscular es cercano a E_K , el potencial de equilibrio del potasio, la apertura de los canales receptores de acetilcolina provoca un pequeño aumento en el flujo hacia afuera de iones K^+ . Por

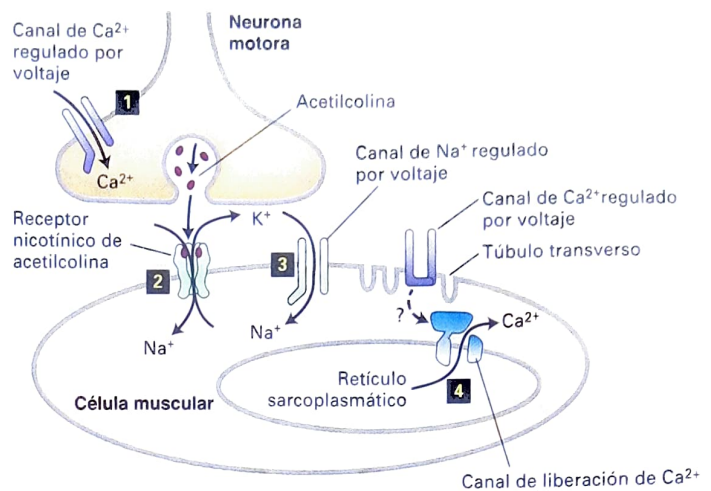


FIGURA 22-21 Activación secuencial de canales iónicos regulados en una unión neuromuscular. La llegada de un potencial de acción a la terminal de una neurona motora presináptica induce la apertura de canales de Ca^{2+} regulados por voltaje en la neurona (paso 1) y la liberación subsiguiente de acetilcolina, lo cual dispara la apertura de los receptores de acetilcolina regulados por ligando en la membrana plasmática muscular (paso 2). El canal de receptor abierto permite un flujo de Na^+ hacia el interior y un flujo hacia el exterior de K^+ desde la célula muscular. El flujo hacia adentro de Na^+ produce una despolarización localizada de la membrana y conduce a la apertura de canales de Na^+ regulados por voltaje y a la generación de un potencial de acción (paso 3). Cuando la despolarización que se está propagando alcanza los túbulos transversos, es detectada por canales de Ca^{2+} regulados por voltaje en la membrana plasmática. Por medio de un mecanismo que se desconoce (indicado como $?$), estos canales permanecen cerrados pero influyen los canales de Ca^{2+} en la membrana del retículo sarcoplásmico (un entramado de compartimientos unidos a la membrana en el músculo) los cuales liberan el Ca^{2+} almacenado hacia el citosol (paso 4). El aumento resultante en el Ca^{2+} citosólico causa la contracción muscular por mecanismos analizados en el Capítulo 17.

otra parte, los iones Na^+ fluyen a la célula muscular impulsados por el gradiente electroquímico de Na^+ .

El aumento simultáneo en la permeabilidad a los iones Na^+ y K^+ seguido de la unión de acetilcolina produce una despolarización neta a aproximadamente -15 mV del potencial de reposo muscular de -85 a -90 mV. Como se muestra en la Figura 22-21, esta despolarización localizada de la membrana plasmática muscular dispara la apertura de canales de Na^+ regulados por voltaje, lo que da lugar a la generación y conducción de un potencial de acción en la membrana de superficie de la célula muscular por medio de los mismos mecanismos descritos previamente para las neuronas. Cuando la despolarización de la membrana alcanza los túbulos transversos (véase Fig. 17-34), que son invaginaciones especializadas de la membrana plasmática, aparentemente actúa sobre los canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática sin causar que se abran. De alguna manera, esto provoca la apertura de canales de liberación de Ca^{2+} adyacentes en la membrana del retículo sarcoplásmico. El flujo subsiguiente de iones Ca^{2+} almacenados desde el retículo sarcoplásmico hacia el citosol eleva la concentración citosólica de Ca^{2+} lo suficiente como para inducir la contracción muscular.

El control cuidadoso del potencial de membrana de la membrana muscular en una sinapsis con una neurona motora colinérgica ha demostrado despolarizaciones espontáneas, intermitentes y aleatorias de ~ 2 ms y aproximadamente 0,5-1,0 mV en ausencia de estimulación de la neurona motora. Cada una de estas despolarizaciones es causada por la liberación espontánea de acetilcolina desde una única vesícula sináptica en la neurona. En efecto, la demostración de tales pequeñas despolarizaciones espontáneas condujo a la noción de la liberación cuántica de acetilcolina (más tarde aplicada a otros neurotransmisores) y de este modo a la hipótesis de la exocitosis vesicular en las sinapsis. La liberación de una vesícula sináptica que contiene acetilcolina resulta en la apertura de alrededor de 3 000 canales iónicos en la membrana postsináptica, muy lejos del número necesitado para alcanzar la despolarización umbral que induce un potencial de acción. Claramente, la estimulación de la contracción muscular por una neurona motora requiere la liberación simultánea cercana de acetilcolina desde numerosas vesículas sinápticas.

Las cinco subunidades en el receptor nicotínico de acetilcolina contribuyen al canal iónico

El receptor de acetilcolina de músculo esquelético es una proteína pentamérica con una composición de subunidades de $\alpha, \beta, \gamma, \delta$. Estos cuatro tipos de subunidades diferentes tienen una homología de secuencia considerable entre sí; en promedio, aproximadamente el 35-40% de los residuos en cualquiera de las dos subunidades es similar. El receptor completo tiene simetría quíntuple, y el canal catiónico real es un poro central cónico revestido por segmentos homólogos de cada una de las cinco subunidades (Fig. 22-22).

El canal se abre cuando el receptor une cooperativamente dos moléculas de acetilcolina a sitios localizados en las interfaces de las subunidades $\alpha\delta$ y $\alpha\gamma$, como se muestra en la Figura 22-22a. Una vez que la acetilcolina se une a un receptor, el canal se abre en unos pocos microsegundos. Estudios de medición de la permeabilidad del receptor a diferentes cationes pequeños sugieren que el canal iónico abierto tiene en su parte más angosta aproximadamente 0,65-0,80 nm de diámetro, de acuerdo con las estimaciones a partir de micrografías electrónicas. Esto podría ser suficiente para permitir el paso de ambos iones Na^+ y K^+ con su capa de moléculas de agua asociada.

De este modo, el receptor de acetilcolina probablemente transporta iones hidratados, a diferencia de los canales de Na^+ y K^+ , los cuales solo permiten el paso de iones no hidratados (véase Fig. 11-21).

El canal iónico central está revestido por cinco α hélices M2. Las hélices M2 se componen mayormente de aminoácidos hidrófobos o polares no cargados, pero los residuos

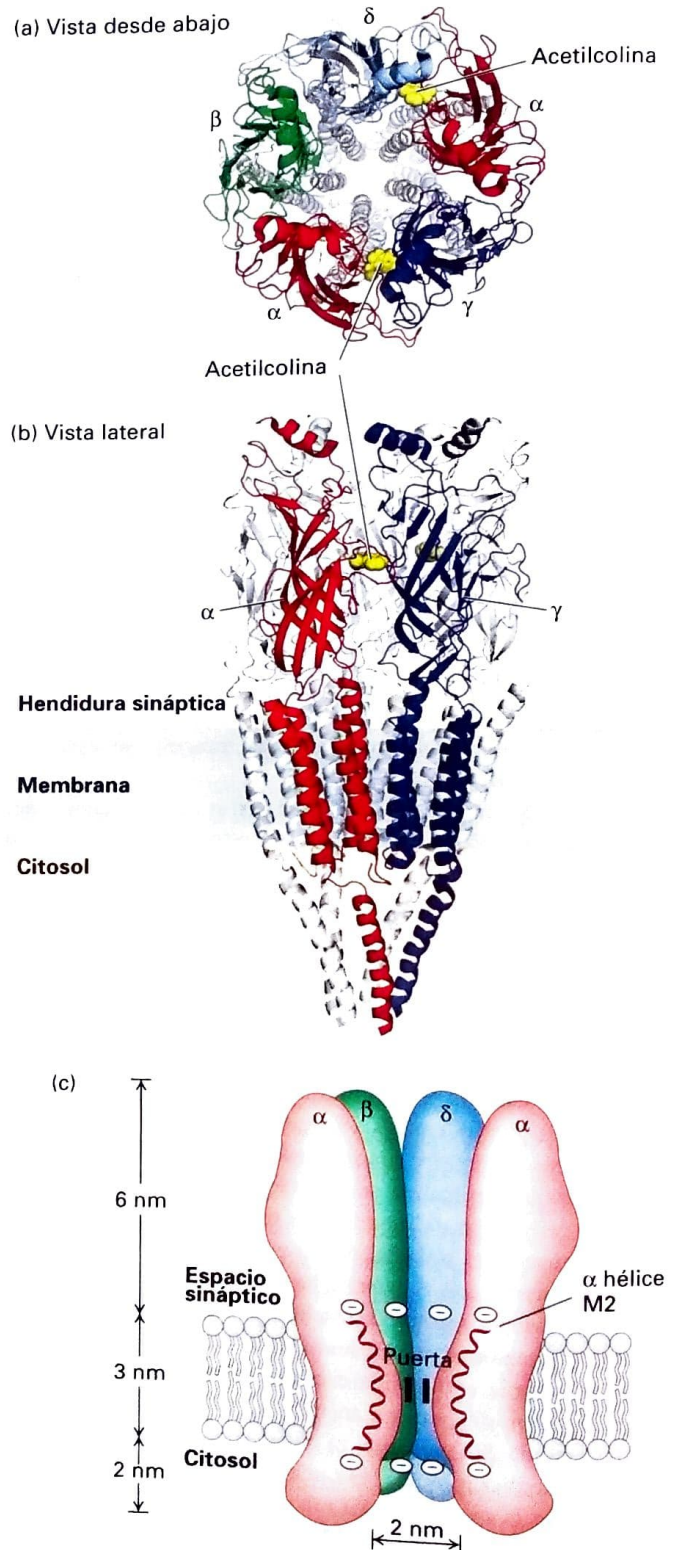


FIGURA 22-22 Estructura tridimensional del receptor nicotínico de acetilcolina. La estructura molecular tridimensional del receptor nicotínico de acetilcolina *Torpedo* como se ve (a) desde la hendidura sináptica y (b) paralela al plano de la membrana. Para mayor claridad, solamente las dos subunidades frontales, α y γ , están destacadas en (b) (colores: α , rojo; β , verde; γ , azul; δ , azul claro). Los dos sitios de unión a acetilcolina están ubicados aproximadamente a 3 nm de la superficie de la membrana y están destacados en amarillo; solo el que está en la interfaz $\alpha\gamma$ se muestra en el panel b. (c) Modelo en corte esquemático del receptor pentamérico en la membrana. Cada subunidad tiene cuatro α hélices que atraviesan la membrana, M1-M4; la α hélice M2 (rojo) mira hacia el poro central. Las cadenas laterales de glutamato y aspartato forman dos anillos de cargas negativas, uno en cada extremo de las hélices M2, que ayudan a excluir a los aniones del canal y a atraer cationes. La entrada, la cual se abre por la unión de acetilcolina, yace dentro del poro. (Partes [a] y [b] de N. Unwin,

2005, *J. Mol. Biol.* **346**:967-989).

de aspartato negativamente cargados o glutamato se localizan en cada extremo, cercanos a las caras de la membrana, y varios residuos de serina o treonina están próximos al centro. Los receptores de acetilcolina mutantes en los cuales un único glutamato o aspartato negativamente cargado en una de las hélices M2 se reemplaza por una lisina positivamente cargada han sido expresados en oocitos de rana. Mediciones tomadas por fijación de membranas indican que tales proteínas modificadas pueden funcionar como canales, pero el número de iones que las atraviesan durante el estado abierto es reducido. Cuanto mayor es el número de residuos de glutamato o aspartato mutados (en una o en múltiples hélices M2), mayor es la reducción en la conductividad iónica. Estos descubrimientos sugieren que los residuos de aspartato y glutamato forman un anillo de cargas negativas en la superficie externa del poro que ayuda a repeler aniones y a atraer iones Na^+ o K^+ a medida que entran en el canal. Un anillo similar de cargas negativas que tapiza la superficie citosólica del poro también contribuye a seleccionar cationes para el paso.

Los dos sitios de unión a acetilcolina en el dominio extracelular del receptor se encuentran a ~ 4-5 nm de la superficie de la membrana (véase Fig. 22-22b). Por lo tanto, la unión de acetilcolina debe disparar cambios conformacionales en las subunidades del receptor que causen la apertura del canal a cierta distancia de los sitios de unión. Los receptores en membranas postsinápticas aisladas pueden ser atrapados en el estado abierto o cerrado por congelamiento rápido en nitrógeno líquido. Imágenes de microscopía electrónica de tales preparaciones sugieren que las cinco hélices M2 rotan en relación con el eje vertical del canal durante la apertura y el cierre.

Hemos analizado la unión neuromuscular como un excelente ejemplo de cómo los neurotransmisores y sus receptores trabajan. Al igual que la acetilcolina, el glutamato, un neurotransmisor principal en el cerebro de los vertebrados, utiliza dos tipos de receptores. Una clase, denominada receptores de glutamato ionotrópicos, son canales regulados por ligando que permiten el flujo de K^+ , Na^+ y en ocasiones Ca^{2+} en respuesta a la unión de glutamato y que trabajan según los mismos principios que el AChR. El glutamato también se une a una segunda clase de receptores, acoplados a proteínas G. Más tarde en este capítulo, veremos cómo tales receptores acoplados a proteínas G (GPCR) y los canales iónicos funcionan como receptores para odorantes y sustancias estimuladoras del gusto que activan varias células nerviosas sensoriales. ¡Cubrir todos los receptores de neurotransmisores, canales iónicos y otras proteínas de señalización que funcionan en el cerebro requeriría un libro mucho más grande que este!

Las células nerviosas toman una decisión todo o nada para generar un potencial de acción

En la unión neuromuscular, virtualmente todo potencial de acción en la neurona motora presináptica dispara un potencial de acción en la célula muscular postsináptica que se propaga a lo largo de la fibra muscular. La situación en las sinapsis entre neuronas, en especial en las del cerebro, es mucho más compleja debido a que la neurona postsináptica comúnmente recibe señales de muchas neuronas presinápticas. Los neurotransmisores liberados desde las neuronas presinápticas podrían unirse a un *receptor excitador* en la neurona postsináptica y abrir de este modo un canal que admita iones Na^+ o iones Na^+ y K^+ . Los receptores de acetilcolina y glutamato recién estudiados son ejemplos de receptores excitadores, y la apertura de

tales canales iónicos conduce a la despolarización de la membrana plasmática postsináptica, lo cual promueve la generación de un potencial de acción. En contraste, la unión de un neurotransmisor a un *receptor inhibitor* en la célula postsináptica causa la apertura de canales de Ca^{2+} o Cl^- , y da lugar a un flujo hacia afuera de iones Cl^- . En cualquier caso, el flujo de iones tiende a hiperpolarizar la membrana plasmática, lo cual inhibe la generación de un potencial de acción en la célula postsináptica.

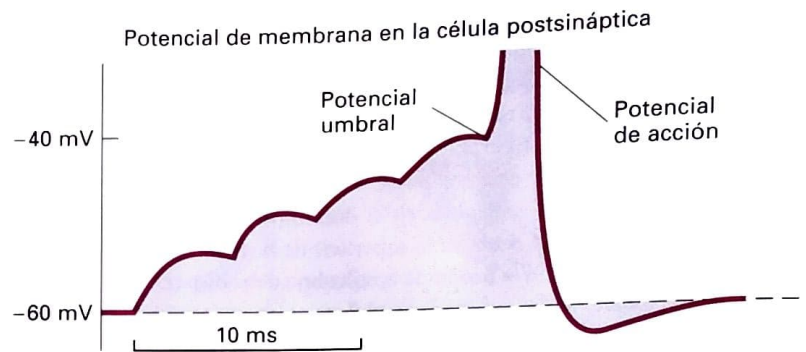
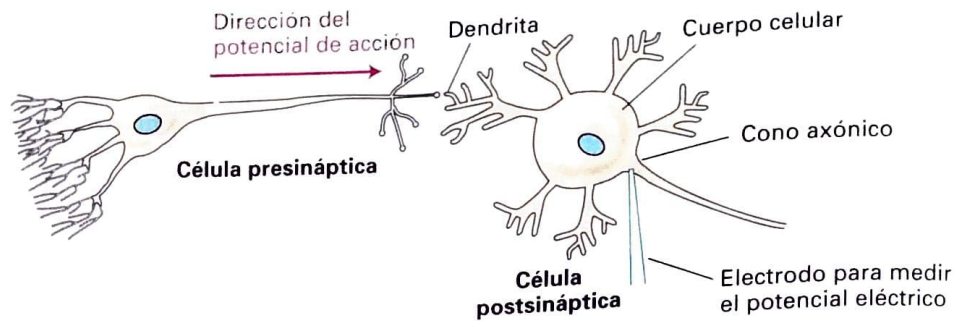
Una única neurona puede ser afectada simultáneamente por señales recibidas en múltiples sinapsis excitadoras e inhibitoras. La neurona integra estas señales de manera continua y determina si generar o no un potencial de acción. En este proceso, las varias pequeñas despolarizaciones e hiperpolarizaciones generadas en las sinapsis se mueven a lo largo de la membrana plasmática desde las dendritas hasta el cuerpo celular y luego al cono axónico, donde son sumadas todas juntas. Un potencial de acción se genera siempre que la membrana en el cono axónico se vuelva despolarizada a un cierto voltaje, el cual puede ser diferente para distintas neuronas, llamado *potencial umbral* (Fig. 22-23). De este modo, un potencial de acción es generado de manera todo o nada: la despolarización que alcanza el umbral siempre da lugar a un potencial de acción, mientras que cualquier despolarización que no alcance el potencial umbral nunca lo inducirá.

Que una neurona genere un potencial de acción en el cono axónico depende del balance de la sincronización, la amplitud y la localización de todas las señales de entrada que recibe; este cómputo de la señal es diferente para cada tipo de neurona. En cierto modo, cada neurona es una pequeña conversión analógica a digital que promedia todas las activaciones de los receptores y perturbaciones eléctricas en su membrana (analógica) y toma una decisión sobre si disparar o no (digital) un potencial de acción y conducirlo por el axón. Un potencial de acción siempre tendrá la misma *magnitud* en cualquier neurona en particular. Como hemos notado, la *frecuencia* con la cual los potenciales de acción son generados en una neurona particular es un parámetro importante en su habilidad para señalar otras células.

Las uniones de hendidura de tipo gap permiten que ciertas neuronas se comuniquen directamente

Las *sinapsis químicas* que emplean neurotransmisores permiten comunicaciones en un sentido a una velocidad razonablemente alta. Sin embargo, algunas veces las señales van de célula a célula eléctricamente, sin la intervención de sinapsis químicas. Las *sinapsis eléctricas* dependen de canales de **uniones de hendidura de tipo gap** que conectan dos células entre sí (Capítulo 20). El efecto de las conexiones de las uniones de tipo gap es el de coordinar perfectamente las actividades de células unidas. Una sinapsis eléctrica es *bidireccional*; cualquier neurona puede excitar a la otra. Las sinapsis eléctricas son comunes en la neocorteza y el tálamo, por ejemplo. La característica clave de las sinapsis eléctricas es su velocidad. Mientras que toma alrededor de 0,5-5 ms para que una señal cruce una sinapsis química, la transmisión a través de una sinapsis eléctrica es casi instantánea, del orden de una fracción de milisegundo, puesto que el citoplasma es continuo entre células. Además, la célula presináptica (la que envía la señal) no tiene que alcanzar un umbral en el cual pueda causar un potencial de acción en la célula postsináptica. En cambio, cualquier corriente eléctrica continúa hasta la siguiente célula y causa una despolarización proporcional a la corriente.

FIGURA EXPERIMENTAL 22-23 Las señales de entrada deben alcanzar el potencial umbral para disparar un potencial de acción en una neurona postsináptica. En este ejemplo, la neurona presináptica está generando cerca de un potencial de acción cada 4 ms. La llegada de cada potencial de acción a la sinapsis causa un pequeño cambio en el potencial de membrana en el cono axónico de la neurona postsináptica, en este ejemplo, una despolarización de ~ 5 mV. Cuando múltiples estímulos causan que la membrana de esta célula postsináptica se despolarice hasta el potencial umbral, aquí aproximadamente 40 mV, un potencial de acción es inducido en esta.



Una sinapsis eléctrica puede contener miles de canales gap, cada uno compuesto por dos hemicanales, uno en cada célula en aposición. Los canales de las uniones gap en la neurona tienen una estructura similar a las uniones gap convencionales (véase Fig. 20-20). Cada hemicanal es un ensamblado de seis copias de la proteína conexina. Dado que existen 20 genes de mamíferos que codifican conexina, la diversidad en la estructura del canal y la función puede provenir de los diferentes componentes proteicos. El propio canal de 1,6-2,0 nm permite la difusión de moléculas de hasta aproximadamente 1 000 Da de tamaño y no presenta ningún problema en la acomodación de iones.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 22.3

Comunicación en las sinapsis

- Las sinapsis son las uniones entre una célula presináptica y una postsináptica, y consisten en pequeños espacios (véase Fig. 22-3).
- La comunicación entre las células presinápticas y postsinápticas es abundante a medida que una sinapsis está siendo formada. Las moléculas de adhesión celular mantienen a las células alineadas. En la unión neuromuscular, las neuronas motoras inducen la acumulación de receptores de acetilcolina en la membrana plasmática muscular postsináptica próxima a la terminal axónica en formación (véase Fig. 22-17).
- En células presinápticas, los neurotransmisores de bajo peso molecular (acetilcolina, dopamina, epinefrina) son importados desde el citosol a vesículas sinápticas por antiportadores vinculados al H^+ . Bombas de protones clase V mantienen el pH intravesicular bajo, que impulsa la entrada de neurotransmisor en contra de un gradiente de concentración.

• Los neurotransmisores (véase Fig. 22-18) son almacenados en cientos a miles de vesículas sinápticas en las terminales axónicas de la célula presináptica (véase Fig. 22-16). Cuando un potencial de acción llega allí, los canales de Ca^{2+} sensibles al voltaje se abren y el calcio causa que las vesículas sinápticas se fusionen con la membrana plasmática y se liberen moléculas de neurotransmisor a la sinapsis (véase Fig. 22-19, paso 4).

• Los neurotransmisores difunden a través de la sinapsis y se unen a receptores en la célula postsináptica, la cual puede ser una neurona o un músculo. Las sinapsis químicas de este tipo son unidireccionales (véase Fig. 22-3).

• Las vesículas sinápticas se fusionan con la membrana plasmática utilizando maquinaria celular que es estándar para la exocitosis, incluyendo SNARE, syntaxina y proteínas SNAP. La proteína sinaptotagmina es el sensor de calcio que detecta el aumento en calcio estimulado por un potencial de acción que lleva a la fusión (véase Fig. 22-20).

• Tras la liberación de neurotransmisor desde la célula presináptica, las vesículas se forman nuevamente por endocitosis y se reciclan (véase Fig. 22-19, paso 6).

• La dinamina, una proteína de endocitosis, es esencial para la formación de nuevas vesículas sinápticas, es probable que específicamente para el "pinzamiento" de las vesículas entrantes.

• La operación coordinada de cuatro canales iónicos regulados en la sinapsis de una neurona motora y una célula de músculo estriado lleva a la liberación de acetilcolina desde la terminal axónica, la despolarización de la membrana muscular, la generación de un potencial de acción y la subsiguiente contracción muscular (véase Fig. 22-21).

- El receptor nicotínico de acetilcolina, un canal catiónico regulado por ligando, contiene cinco subunidades, cada una de las cuales tiene una hélice α transmembrana (M2) que reviste el canal (véase Fig. 22-22).
- Los receptores de neurotransmisores se dividen en dos clases: canales iónicos regulados por ligando, los cuales permiten el paso de iones cuando están abiertos, y receptores acoplados a proteína G, vinculados a canales iónicos independientes.
- Una neurona postsináptica genera solo un potencial de acción cuando la membrana plasmática en el cono axónico es despolarizada hasta el potencial umbral por la suma de pequeñas despolarizaciones e hiperpolarizaciones causadas por las activación de múltiples receptores neuronales (véase Fig. 22-23).
- Las sinapsis eléctricas son conexiones de unión de espacio directas entre neuronas. Las sinapsis eléctricas, a diferencia de las sinapsis químicas que utilizan neurotransmisores, son extremadamente rápidas en la transmisión de la señal y son bidireccionales.

22.4 Percibiendo el entorno: tacto, dolor, gusto y olfato

Nuestros cuerpos constantemente están recibiendo señales de nuestro entorno (luz, sonido, olores, gustos, estimulación mecánica, calor y frío). En los últimos años, se ha hecho un progreso dramático en el entendimiento de cómo nuestros sentidos graban las impresiones del mundo externo, y cómo el cerebro procesa esa información. Por ejemplo, en el Capítulo 15 analizamos las funciones de uno de dos tipos de fotorreceptores en la retina humana, los *bastones*, y aprendimos cómo estos sirven como recipientes primarios de la estimulación visual. Los bastones son estimulados por luz tenue, como la luz de la luna, sobre un rango de longitudes de onda, mientras que otros fotorreceptores, los *conos*, median la visión del color. Estos fotorreceptores hacen sinapsis en capa sobre capa de interneuronas que están innervadas por diferentes combinaciones de células fotorreceptoras. Estas señales son procesadas e interpretadas por la parte del cerebro llamada *corteza visual*, donde estos impulsos nerviosos son traducidos en una imagen del mundo que nos rodea.

En esta sección, analizaremos los mecanismos celulares y moleculares y las células nerviosas especializadas que subyacen a varios de nuestros otros sentidos: tacto y dolor, gusto y olfato. Vemos cómo dos grandes clases de receptores (los canales iónicos y GPCR) funcionan en estos procesos sensitivos. Como con la visión, múltiples interneuronas conectan estas células sensoriales con el cerebro, donde señales que se retransmiten son convertidas en percepciones del entorno. En su mayoría, aún no comprendemos completamente cómo estos subsistemas neuronales están conectados. Sin embargo, en el caso del olfato, cada neurona sensorial expresa un único receptor de odorante, y veremos cómo múltiples neuronas sensoriales que expresan el mismo receptor activan el mismo centro cerebral. Así, las conexiones entre la unión del odorante y la percepción por el cerebro son directas y bastante bien entendidas.

Los mecanorreceptores son canales catiónicos regulados

Nuestra piel, en especial la de nuestros dedos, es altamente especializada para recoger información sensorial. De hecho, todo nuestro

cuerpo tiene numerosos **mecanosensores** embebidos en sus varios tejidos. Con frecuencia, estos sensores nos hacen conscientes del tacto, las posiciones y los movimientos de nuestros miembros o cabeza (propiocepción), el dolor y la temperatura, aunque a menudo atravesamos periodos en los que ignoramos las señales de entrada. Los mamíferos utilizan diferentes conjuntos de células receptoras para informar sobre el dolor, la temperatura y el dolor.

Muchos receptores mecanosensoriales son canales de Na^+ o $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ que son regulados, o abiertos, en respuesta a estímulos específicos. La activación de tales receptores causa un flujo hacia adentro de iones Na^+ o de Na^+ y Ca^{2+} , lo que conduce a la despolarización de la membrana. Algunos ejemplos incluyen a los receptores de estiramiento y tacto que se activan por estiramiento de la membrana celular. Estos han sido identificados en un amplio conjunto de células, que van desde células musculares y epiteliales de vertebrados hasta levaduras, plantas, e incluso bacterias.

La clonación de genes que codifican receptores del tacto comenzó con el aislamiento de cepas mutantes de *Caenorhabditis elegans* que eran insensibles al tacto suave en el cuerpo. Tres de los genes en los que las mutaciones fueron aisladas (MEC4, MEC6 y MEC10) codifican tres subunidades de un canal de Na^+ en las células receptoras del tacto. Los estudios en gusanos con mutaciones en estos genes mostraron que estos canales son necesarios para la transducción de un toque corporal suave; los estudios biofísicos indicaron que estos canales probablemente se abren de manera directa en respuesta a la estimulación mecánica (Fig. 22-24). Los complejos sensibles al tacto contienen varias otras proteínas esenciales para la sensibilidad al tacto, incluyendo subunidades de novedosos microtúbulos de 15 protofilamentos en el citosol y proteínas específicas en la matriz extracelular, pero aún no se sabe con precisión cómo estos afectan la función de los canales. Clases similares de canales se encuentran en bacterias

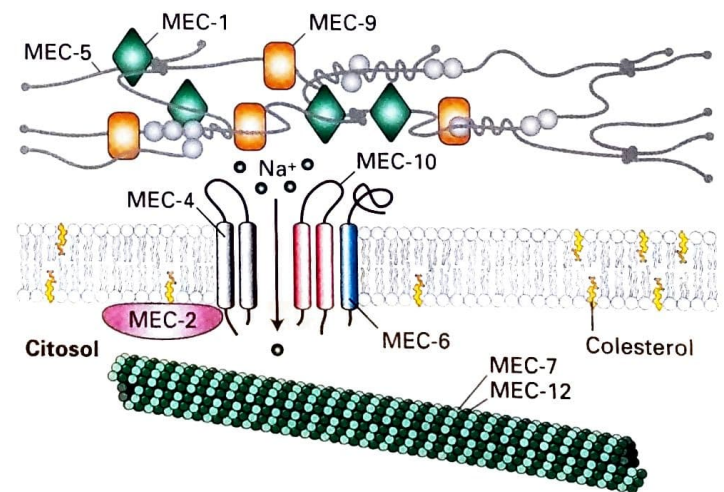


FIGURA 22-24 Un modelo molecular del complejo del receptor del tacto MEC-4 en *C. elegans*. Las mutaciones en cualquiera de los genes MEC pueden reducir o inactivar las respuestas normales del gusano a un toque corporal suave. Las proteínas MEC-4 y MEC-10 son las subunidades que forman el poro del canal de Na^+ ; MEC-2 y MEC-6 son subunidades accesorias que posibilitan la actividad del canal. La mecanotransducción también requiere de una matriz extracelular especializada, que consiste de MEC-5, una isoforma del colágeno, y MEC-1 y MEC-9, ambas proteínas con múltiples repeticiones EGF. MEC-7 y MEC-12 son monómeros de tubulina que forman novedosos microtúbulos de 15 protofilamentos que de alguna manera también se requieren para la sensibilidad al tacto. (De E. Lumpkin, K. Marshall, y A. Nelson, 2010, *J. Cell Biol.* **191**:237).

Un número de moléculas relacionadas con MEC se expresan en neuronas de mamíferos en los ganglios de la raíz dorsal, y sus funciones en la recepción del tacto han sido examinadas en ratones con desactivación génica. Por ejemplo, la rotura de la proteína-3 similar a la stomatina (SLP-3) causa defectos en la discriminación de la textura y pérdida de la mecanosensibilidad en un subconjunto de neuronas de ratón receptoras del tacto.

Animales tan diversos como las serpientes y los seres humanos detectan eventos nocivos (el proceso denominado nocicepción); los receptores del dolor, llamados **nociceptores**, responden al cambio mecánico, al calor y a ciertos químicos tóxicos. El dolor sirve para alertarnos sobre eventos como el daño tisular, capaces de producir lesiones, y evoca comportamientos que promueven la curación del tejido. El dolor persistente en respuesta al daño tisular es común, y muchos individuos sufren de dolor crónico. Así, la comprensión del dolor tanto agudo como crónico es uno de los principales objetivos de investigación, como es el desarrollo de nuevos tipos de fármacos para su tratamiento.

Otro gen asociado con el dolor que ha atraído una amplia atención es *SCN9A*, el cual codifica una subunidad del canal de Na^{++} regulado por voltaje Nav1.7, que es expresada a alta densidad en muchas neuronas sensitivas al dolor. No está claro qué es lo que Nav1.7 detecta directamente, pero homocigotos humanos para mutaciones sin sentido en *SCN9A* son completamente incapaces de detectar dolor, aunque en todos los otros aspectos son normales. Esto sugiere que Nav1.7 es un componente vital en la percepción del dolor en seres humanos. De hecho, los individuos con ciertas mutaciones de activación en el gen de *SCN9A* tienen dolor episódico grave, y un polimorfismo común en el gen *SCN9A* se correlaciona con la percepción del dolor en una variedad de enfermedades. De este modo, los fármacos que modifican la función del canal Nav1.7 también serían potencialmente útiles en el tratamiento de una amplia gama de condiciones dolorosas.

Saboreamos muchos químicos, y todos ellos son moléculas hidrófilas y no volátiles que flotan en la saliva. Todos los sabores son detec-

Existen receptores para los gustos salado, dulce, agrio, sabroso y amargo en todas las partes de la lengua. Los receptores son de dos tipos diferentes: proteínas de canal para sabores salado y agrio y proteínas de siete dominios transmembrana (GPCR) para la dulzura, lo sabroso y la amargura. Receptores específicos de membrana que detectan ácidos grasos están presentes en células de yemas gustativas, y el sabor graso podría llegar a ser reconocido como una cualidad de un sexto sabor básico.

La recepción de una señal de gusto causa despolarización celular que dispara potenciales de acción. A su vez, estos ocasionan la captación de Ca^{2+} a través de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y la liberación de neurotransmisores (Fig. 22-25c-e). En las células gustativas no crecen axones; en cambio, estas envían señales a neuronas adyacentes a distancias cortas. Lo que aún no se comprende es cómo el cerebro interpreta las señales de entrada de nervios corriente abajo de todas las yemas y nos dice exactamente lo que estamos saboreando.

1048 CAPÍTULO 22 • Células nerviosas

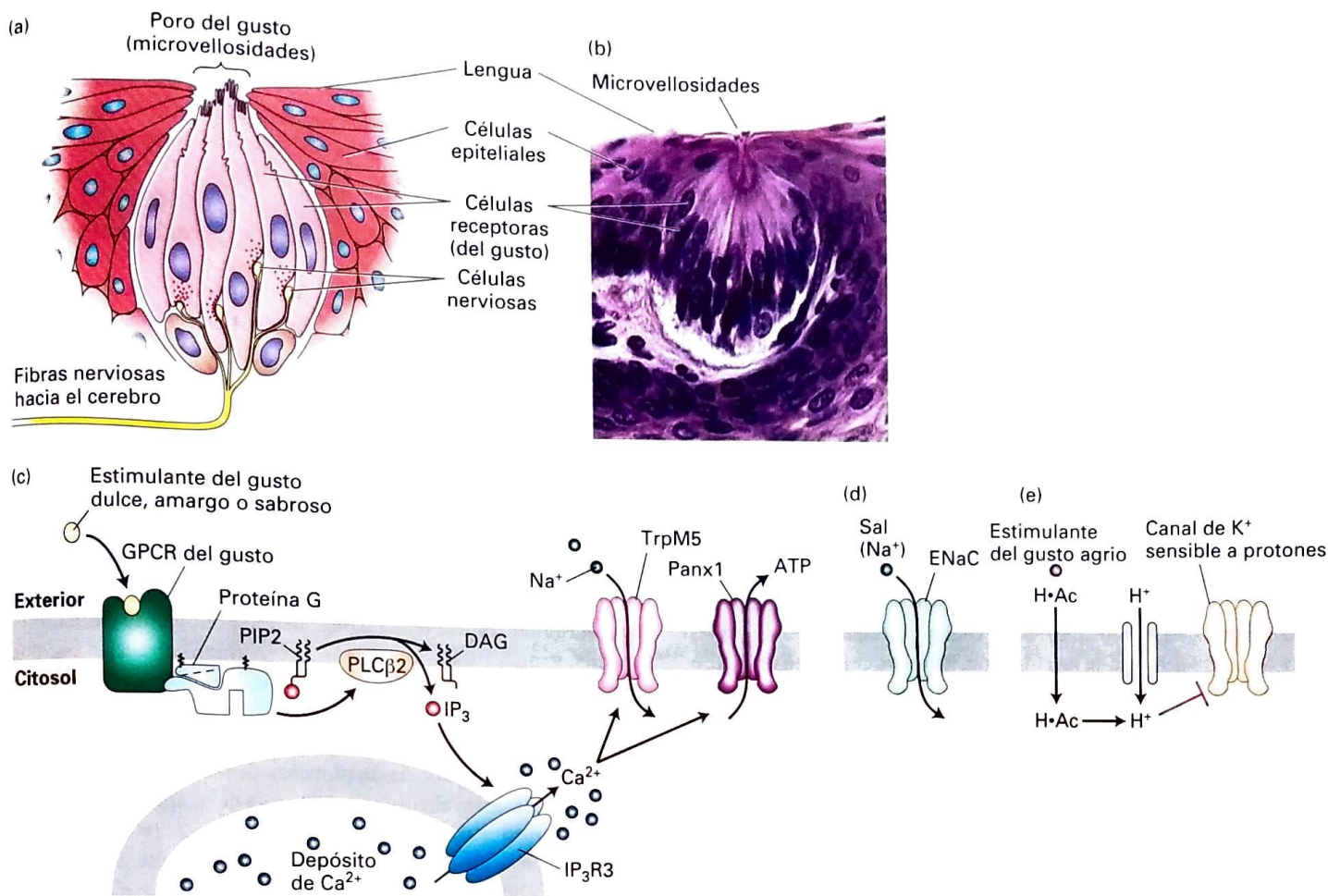


FIGURA 22-25 El sentido del gusto. Los paneles (a) y (b) muestran una yema gustativa de mamífero y sus receptores. (a) Las células rosadas son las células del gusto. Estas células receptoras epiteliales contactan con las células nerviosas (amarillo). Las señales químicas llegan a las microvellosidades que se observan en la parte superior. (b) Micrografía de una yema gustativa, que muestra las células receptoras. Las microvellosidades son ligeramente visibles en la parte superior de la yema gustativa, indicado por las flechas. Los paneles (c) a (e) muestran los mecanismos por los cuales cinco cualidades del gusto son reconocidas y transducidas en células del gusto. (c) Ligandos dulce, amargo y sabroso se unen a GPCR específicos expresados en células receptoras Tipo II, lo que activa una vía fosfoinosítica que eleva el Ca^{2+} citosólico. A su vez, el Ca^{2+} se une a y activa canales de Na^{+} regulados por Ca^{2+} , TrpM5, lo que da lugar a un flujo hacia adentro de Na^{+} y a la despolarización de la membrana. La acción combinada del Ca^{2+} elevado y la despolarización de la membrana abre los grandes poros de un canal de membrana inusual denominado Panx1, y esto resulta en la liberación de ATP y, probablemente, de otras moléculas de señalización hacia el espacio extracelular. El ATP y tal vez estas otras moléculas

estiman las células nerviosas que, por último, llevarán la información hacia el cerebro. (d) La sal es detectada por la entrada directa de iones Na^{+} a través de canales iónicos de la membrana, incluyendo el canal ENaC, despolarizando directamente la membrana plasmática. (e) Los ácidos orgánicos como el ácido acético difunden en sus formas protonadas (HAc) a través de la membrana plasmática y se disocian en un anión y un protón, lo que acidifica el citosol. La entrada de ácidos fuertes como HCl es facilitada por un canal de protones en la membrana apical de las células sensibles al sabor agrio que permite que los protones alcancen el citosol. Se cree que los H^{+} intracelulares bloquean un canal de K^{+} sensible a protones (hasta ahora no identificado) y que de este modo despolarizan la membrana. Los canales de Ca^{2+} regulados por voltaje se abrirían, lo cual conduciría a una elevación en el Ca^{2+} citosólico que dispararía la exocitosis de vesículas sinápticas, no representadas. (Parte [a] adaptado de B. Kolb y I. Q. Whishaw, 2006, *An Introduction to Brain and Behavior*, 2d ed., Worth, p. 400; parte [b] de Ed Reschke/ Peter Arnold, partes [c] y [d] de N. Chaudhri y S. D. Roper, 2010, *J. Cell Biol.* **190**:285; parte [e] de S. Frings, 2010, *PNAS* **107**:21955).

señalización al espacio extracelular. El ATP estimula las células nerviosas que, por último, llevan la información del gusto al cerebro.

Diferentes moléculas de sabor amargo son muy distintas en cuanto a la estructura, lo cual probablemente explica la necesidad de la diversa familia de T2R. Algunos receptores T2R unen solo 2-4 componentes de sabor amargo, mientras otros unen una variedad más amplia de componentes amargos. El primer miembro de la familia T2R en ser identificado provino de estudios genéticos en seres humanos que mostraron un gen de detección de la amargura importante en el cromosoma 5. Ratones T2R5 que tienen cambios en 5 aminoácidos en la proteína

T2R son incapaces de detectar el sabor amargo de la cicloheximida (un inhibidor de la síntesis de proteínas, véase Cuadro 9-1). A menudo, múltiples tipos de T2R son expresados en la misma célula gustativa, y alrededor del 15% de todas las células gustativas expresan T2R.

Un dramático experimento de intercambio en la regulación génica fue hecho para demostrar el papel de las proteínas T2R. Ratones fueron diseñados para expresar un receptor del gusto amargo, una proteína T2R, en células que normalmente detectan estimulantes del gusto dulces que atraen a los ratones. Los ratones desarrollaron una fuerte atracción por los sabores amargos, evidentemente debido a que las cé-

lulas continuaban enviando una señal de “ve y come esto”, incluso a pesar de que estaban detectando estimulantes amargos del gusto. Este experimento demuestra que la especificidad de las células del gusto se determina dentro de las mismas células y que las señales que envían se interpretan según las conexiones neuronales hechas por esa clase de células. A su vez, esto implica un sistema altamente regulado que conecta las diferentes clases de células receptoras del gusto a regiones superiores específicas del cerebro.

Sabores dulce y sabroso Los estimulantes del gusto dulce y sabroso son detectados por una familia de GPCR llamada *T1R*, relacionada con los T2R. Los tres T1R de mamíferos difieren uno del otro en un pequeño número de aminoácidos. Los T1R tienen dominios extracelulares muy grandes que comprenden el dominio de unión al gusto de la proteína. En el receptor de glutamato que detecta el gusto, el dominio extracelular se cierra alrededor del glutamato de una manera que es descrita como análoga a una Venus atrapamoscas. A diferencia de la mayoría de los GPCR, los cuales por lo general funcionan como monómeros, los T1R forman homodímeros y heterodímeros, lo cual se piensa que incrementa el repertorio de moléculas que pueden actuar como señales. Sin embargo, el código de respuestas a diferentes moléculas todavía está en investigación. Ratones que carecen de T1R2 o T1R3 fallan en detectar azúcar. Se piensa que el receptor real es un heterodímero de los dos. T1R3 parece ser un receptor para ambos sabores dulce y sabroso, y eso es debido a que detecta dulces cuando se combina con T1R2 y sabroso cuando se combina con T1R1. En consecuencia, las células gustativas expresan T1R1 o T1R2 pero no ambos, ya que de otra forma enviarían un mensaje ambiguo al cerebro.

Resulta interesante que los receptores del gusto dulce también se encuentran en la superficie de ciertas células endocrinas en el intestino; estas células también expresan gusducina y varias otras proteínas de transducción del gusto. La presencia de glucosa en el intestino provoca que estas células secreten la hormona péptido-1 similar al glucagón (GLP-1), el cual a su vez regula el apetito y potencia la secreción de insulina y la motilidad intestinal. De este modo, ciertas células del intestino “saborean” la glucosa a través de los mismos mecanismos utilizados por células gustativas de la lengua.

Sabor salado La sal es detectada por un miembro de una familia de los canales de Na^+ llamada *canales ENaC* (Fig. 22-25d). De hecho, la inactivación de una subunidad crítica de ENaC en yemas gustativas alteró la detección del sabor salado en ratones. El flujo hacia adentro de Na^+ a través del canal despolariza la célula gustativa, y esto da lugar a la liberación de neurotransmisor. El papel de los canales ENaC como sensores de sal es evolutivamente antiguo: las proteínas de ENaC también detectan sal cuando son expresadas en insectos. En *Drosophila*, los sensores del gusto están localizados en múltiples lugares, incluyendo las patas, de manera que cuando la mosca pisa algo sabroso, la probóscide se extiende para explorarlo más a fondo.

Sabor agrio La percepción de la acidez es debida a la detección de iones H^+ . Muchos estimulantes ácidos del gusto son ácidos orgánicos débiles (ácido acético en vinagre), los cuales en sus formas protonadas difunden a través de la membrana plasmática. Entonces se disocian en un anión y un protón, el cual acidifica el citosol. Los ácidos fuertes como el HCl son detectados por un canal de protones en la membrana apical de las células que detecta sabores amargos que le permite a los protones llegar al citosol. Independientemente de cómo se incrementa

la concentración de H^+ intracelular, se cree que los protones bloquean un canal de K^+ sensible a protones hasta ahora no identificado y así despolarizan la membrana (Fig. 22-25e). Como con la detección de sal, los canales de Ca^{2+} regulados por voltaje entonces se abrirían y elvarían el Ca^{2+} citosólico, y de esta manera se dispararía la exocitosis de vesículas sinápticas llenas de neurotransmisor.

Una gran cantidad de receptores detectan olores

La percepción de químicos volátiles transportados por el aire impone diferentes demandas que la percepción de la luz, el sonido, el tacto o el gusto. La luz es detectada solo por cuatro moléculas de rodopsina, sintonizada a diferentes longitudes de onda. El sonido es detectado por efectos mecánicos a través de cabellos que están sintonizados a diferentes longitudes de onda. El tacto y el dolor requieren un pequeño número de canales iónicos regulados diferentes. El sentido del gusto mide un pequeño número de sustancias disueltas en agua. En contraste con todos estos otros sentidos, los sistemas olfativos pueden discriminar entre muchos cientos de moléculas volátiles que se mueven a través del aire. La discriminación entre un gran número de químicos es útil para encontrar comida o una pareja, detectar feromonas y evitar predadores, toxinas e incendios. Los *receptores olfativos* trabajan con una sensibilidad enorme. Las polillas macho, por ejemplo, pueden detectar moléculas individuales de las señales enviadas a la deriva a través del aire por hembras. Para poder lidiar con tantas señales, el sistema olfativo utiliza una gran familia de proteínas de receptores olfativos. Los seres humanos tienen alrededor de 700 genes de receptores olfativos, de los cuales aproximadamente la mitad son funcionales (el resto son seudogenes improductivos), una proporción notablemente grande de los 20 000 genes humanos estimados. Los ratones son más eficientes, con más de 1 200 genes de receptores olfativos, de los cuales unos 800 son funcionales. Eso significa que el 3% del genoma de ratón se compone de genes de receptores olfativos. La *Drosophila* tiene unos 60 genes de receptores olfativos. En esta sección, examinaremos cómo los genes de receptores olfativos son utilizados y cómo el cerebro puede reconocer qué olor ha sido detectado (los estadios iniciales de interpretación de nuestro mundo químico). Las moléculas de olor se llaman *odorantes*. Tienen diversas estructuras químicas, de modo que los receptores olfativos enfrentan algunos de los mismos desafíos enfrentados por los receptores de anticuerpos y de hormonas (la necesidad de unirse y distinguir muchas variantes de moléculas relativamente pequeñas).

Los receptores olfativos son proteínas de siete dominios transmembrana (Fig. 22-26). En mamíferos, los receptores olfativos son producidos por células del epitelio nasal. Estas células, llamadas *neuronas receptoras olfativas* (ORN, *olfactory receptor neurons*), transducen la señal química a potenciales de acción. Cada ORN extiende una única dendrita a la superficie luminal del epitelio, desde la cual cilios inmóviles se extienden para unirse a los odorantes inhalados del aire (Fig. 22-27a). Estos cilios sensoriales olfativos están enriquecidos en los receptores de odorantes y proteínas de transducción de la señal que median los eventos iniciales de transducción. En la *Drosophila*, las ORN tienen estructuras similares y están localizadas en las antenas (Fig. 22-27b).

Tanto en mamíferos como en *Drosophila*, las ORN proyectan sus axones al siguiente nivel superior del sistema nervioso, que en mamíferos está localizado en el bulbo olfativo del cerebro. Los axones de las ORN hacen sinapsis con dendritas de *neuronas mitrales* en mamíferos (llamadas *neuronas de proyección* en insectos); estas sinapsis ocurren en las agrupaciones de estructuras sinápticas lla-

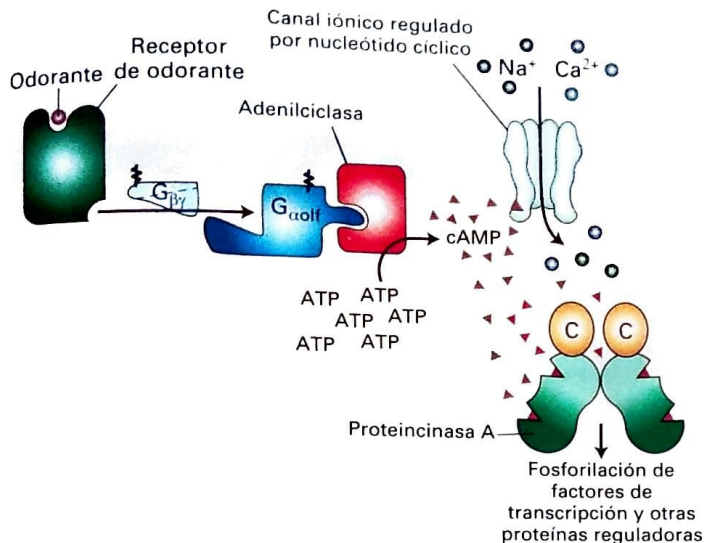


FIGURA 22-26 Transducción de la señal de los GPCR olfativos. La unión de un odorante a su receptor de odorante afín dispara la activación de la proteína G trimérica G_{olf} · $G_{\beta\gamma}$ y libera G_{olf} · GTP activo. A su vez, G_{olf} · GTP activado activa la adenilciclase tipo III, y esto conduce a la producción de AMP cíclico (cAMP) a partir de ATP. Las moléculas de cAMP se unen a y abren el canal iónico regulado por nucleótido cíclico, lo que da lugar al flujo hacia adentro de Na^+ y Ca^{2+} y despolariza la célula. El cAMP también activa a proteína quinasa A (PKA), la cual fosforila y de este modo regula factores de transcripción y otras proteínas intracelulares.

madras *glomérulos*. Las neuronas mitrales se conectan con centros del olfato superiores en el cerebro (Fig. 22-28).

Los seres humanos varían marcadamente en su habilidad para detectar ciertos olores. Algunos no pueden detectar el esteroide androsterona, un compuesto derivado de la testosterona y encontrado en la transpiración humana. Algunos describen el olor como agradable y almizclado, mientras otros lo comparan con el olor de calcetines sucios. Todas estas diferencias se atribuyen a mutaciones de inactivación de cambio de sentido en el gen que codifica el único GPCR de androsterona. Los individuos con dos copias del alelo silvestre perciben la androsterona como desagradable, mientras que aquellos que tienen uno o ningún alelo funcional la perciben como menos desagradable o no la detectan. ■

A pesar del vasto número de receptores olfativos, todos generan las mismas señales intracelulares a través de la activación de la misma proteína G trimérica: G_{olf} · $G_{\beta\gamma}$ (véase Fig. 22-26). G_{olf} se expresa principalmente en las neuronas olfativas. Como G_{as} , el G_{olf} · GTP activado después de la unión del ligando activa una adenilciclase que conduce a la producción de AMP cíclico (cAMP; véase Fig. 15-27). Dos vías de señalización corriente abajo son activadas por cAMP. Se une a un sitio en la cara citosólica de un canal Na^+/Ca^{2+} regulado por un nucleótido cíclico, abre el canal y da lugar a un flujo hacia adentro de Na^+ y Ca^{2+} y a una despolarización local de la membrana celular. Esta despolarización inducida por el odorante en las dendritas olfativas se propaga por toda la membrana neuronal, lo que resulta en la apertura de canales de Na^+ regulados por voltaje en el cono

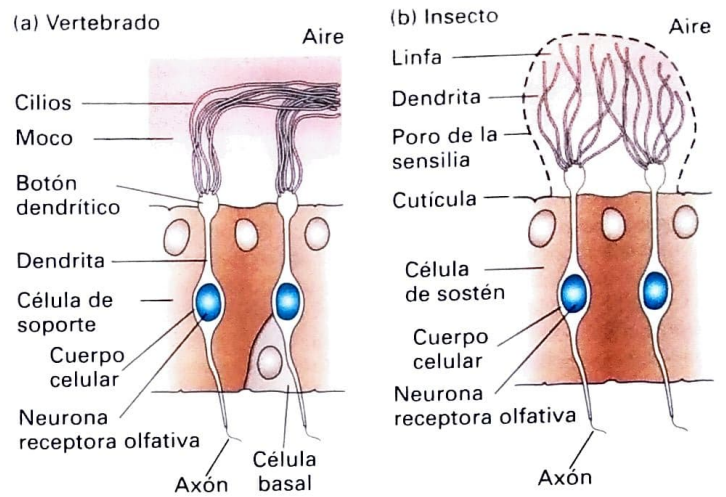


FIGURA 22-27 Estructuras de las neuronas receptoras olfativas. A lo largo de un vasto tramo de distancia evolutiva (vertebrados e insectos), las neuronas receptoras olfativas tienen formas similares. (a) Las neuronas receptoras olfativas de vertebrado tienen una dendrita, la cual finaliza en un botón dendrítico; de cada botón dendrítico, aproximadamente 15 cilios se extienden dentro del moco nasal. (b) Las neuronas receptoras olfativas de insectos son morfológicamente similares: la neurona bipolar origina un único axón basal que se proyecta hacia un glomérulo olfativo en el lóbulo antenal. En su lado apical, tiene un solo proceso dendrítico, desde el cual se extienden cilios sensoriales. (Adaptado de U. B. Kaupp, 2010, *Nature Rev. Neurosci.* 11:188-200.)

axónico y en la generación de potenciales de acción. Las moléculas de cAMP también activan proteína quinasa A (PKA), la cual fosforila y así regula factores de transcripción y otras proteínas intracelulares.

Cada neurona receptora olfativa expresa un único tipo de receptor de odorante

La clave para entender la especificidad del sistema olfativo es que tanto en mamíferos como en insectos cada ORN produce solo un único tipo de receptor de odorante. Cualquier señal eléctrica desde esa célula le transmitirá al cerebro un mensaje simple: “mi odorante se está uniendo a mis receptores”. Los receptores no son siempre completamente monoespecíficos para los odorantes. Algunos receptores pueden unir más de un tipo de molécula, pero por lo general las moléculas detectadas están cercanamente relacionadas en su estructura. De manera inversa, algunos odorantes se unen a múltiples receptores.

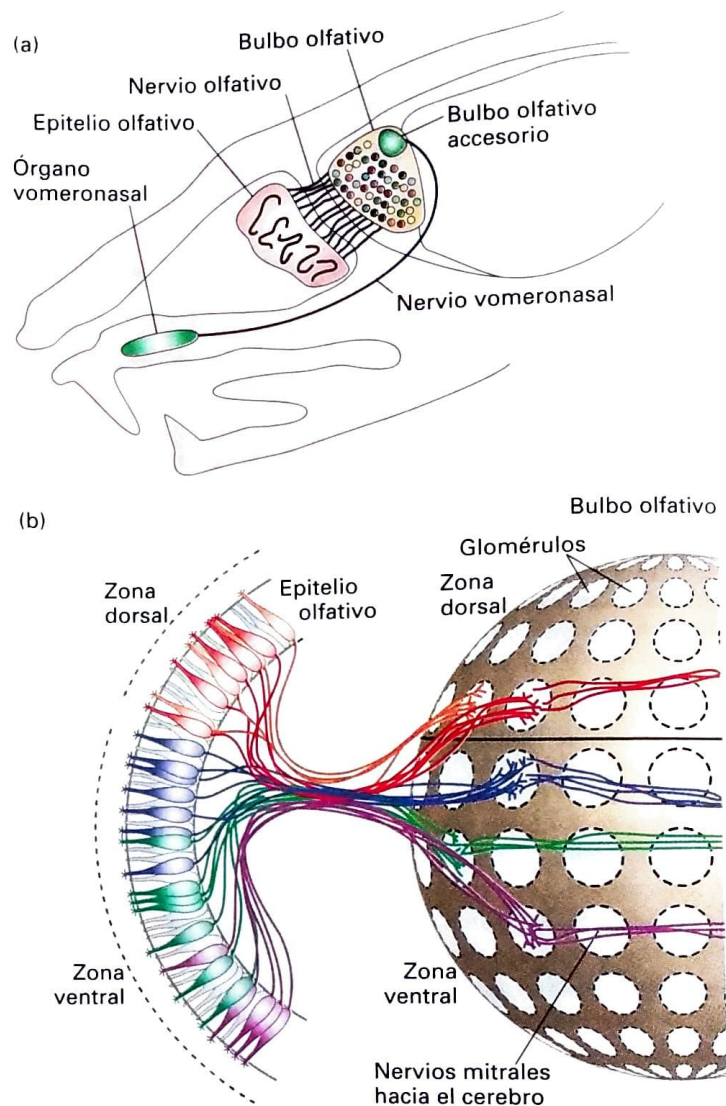
Existen unos 5 millones de ORN en el ratón, por lo que en promedio cada uno de los aproximadamente 800 genes de receptores olfativos está activo en alrededor de 6 000 células. Hay cerca de 2 000 glomérulos (más o menos 2 por cada gen de receptor de odorante), de manera que, en promedio, los axones de unos pocos miles de neuronas receptoras de olfato convergen en cada glomérulo (véase Fig. 22-28). Desde allí, unos 25 axones mitrales por glomérulo, o un total de 50 000 neuronas mitrales, conectan con centros cerebrales superiores. De este modo, la información inicial de la detección de un odorante se transporta directamente a partes superiores del cerebro sin ser procesada, un informe simple de qué odorante ha sido detectado.

FIGURA 22-28 La anatomía de la olfacción en el ratón.

Representación esquemática de una sección sagital a través de la cabeza de un ratón adulto. Los axones de las neuronas receptoras olfativas (ORN) en el epitelio olfativo principal se agrupan para formar un nervio olfativo e inervar el bulbo olfativo. Cada ORN en el epitelio olfativo principal expresa solo un gen de receptor de odorante. El órgano vomeronasal y el bulbo olfativo accesorio están involucrados en la detección de feromonas. (b) Todas las neuronas receptoras olfativas que expresan un solo tipo de receptor envían sus axones al mismo glomérulo. En esta figura, cada color representa las conexiones neuronales para cada receptor distinto expresado. Los glomérulos están ubicados en el bulbo olfativo cercano al cerebro; en los glomérulos, las ORN realizan sinapsis con *neuronas mitrales*; cada neurona mitral tiene sus dendritas localizadas en un solo glomérulo y sus correspondientes ORN, lo que de este modo lleva la información sobre un odorante en particular a centros superiores del cerebro. Así, cada glomérulo recibe invasión de neuronas sensoriales que expresan un único receptor de odorante, y provee las bases anatómicas del mapa sensorial olfativo. (De T. Komiyama y I. Luo, 2005, *Curr Opin Neurobiol* 16:67-73 y S. Demaria y J. Ngai, 2010, *J Cell Biol* 191:443.)

La regla un receptor-una neurona se extiende a la *Drosophila*. Se han realizado estudios detallados en larvas, en las que un sistema olfativo simple con solo 21 ORN utiliza alrededor de 10-20 genes de receptores del olfato. Parece que un único receptor se expresa en cada neurona receptora de olfato, el cual envía sus proyecciones a un glomérulo. Las neuronas receptoras de olfato envían señales excitadoras o inhibitoras desde su terminal axónica, probablemente con el fin de distinguir olores atractivos de olores repulsivos. En forma similar a los de los mamíferos, los axones de las ORN terminan en los glomérulos, los cuales en moscas están localizados en el lóbulo antenal del cerebro de la larva. La investigación en la *Drosophila* comenzó con pruebas para ver qué odorantes se unen a qué receptores (Fig. 22-29a). Algunos odorantes son detectados por un único receptor, algunos por varios, de forma que el patrón de combinaciones permite que muchos más odorantes sean distinguidos que solo el número de receptores olfativos diferentes. El pequeño número total de neuronas ha permitido que se construya un mapa que muestra qué odorantes son detectados por cada glomérulo (Fig. 22-29b). Un descubrimiento sorprendente fue que los glomérulos localizados cerca uno del otro responden a odorantes con estructuras químicas relacionadas, es decir, compuestos alifáticos lineales o compuestos aromáticos. La disposición podría reflejar la evolución de nuevos receptores concomitante con un proceso de subdivisión de la porción olfativa del cerebro.

El simple sistema de que cada célula haga un solo tipo de receptor también presenta algunas dificultades impresionantes que debe superar: (1) cada receptor debe ser capaz de distinguir un tipo de molécula de odorante o un conjunto de moléculas con una especificidad adecuada a las necesidades del organismo. Un receptor que es estimulado en forma muy frecuente podría no ser muy útil. (2) Cada célula debe expresar un solo y único producto del gen de receptor. Todos los otros genes de receptores deben ser desactivados. Al mismo tiempo, los esfuerzos colectivos de todas las células en el epitelio nasal deben permitir la producción de suficientes receptores diferentes que le den al animal una versatilidad sensorial adecuada. No sirve de mucho tener genes para cientos de receptores si la mayoría de ellos nunca son expresados, pero es un desafío regulador activar un solo y único gen en cada célula y al mismo tiempo expresar todos los genes de receptores en toda la población



de células. (3) Las conexiones neuronales del sistema olfativo deben hacer una discriminación entre los odorantes posibles para que el cerebro pueda determinar qué odorantes están presentes. De otra manera, el animal podría sentirse a gusto y relajado cuando debería estar huyendo lo más rápidamente posible.

La solución al primer problema es la gran variabilidad de las proteínas de los receptores olfativos, tanto dentro como entre especies. La solución al segundo problema, la expresión de un único gen de receptor olfativo por célula, ha sido explorada utilizando ratones transgénicos, pero el mecanismo aún no se comprende. Cuando un gen de receptor olfativo modificado se utiliza para producir un receptor olfativo, otros genes que codifican proteínas de receptores son inactivados transcripcionalmente debido a algún tipo de regulación por retroalimentación. Si un gen de receptor olfativo modificado que produce una proteína reportera es expresado (no una proteína de receptor olfativo), entonces otros genes aún pueden ser expresados. De este modo, el sistema de retroalimentación debe involucrar la detección de la presencia de una proteína de receptor

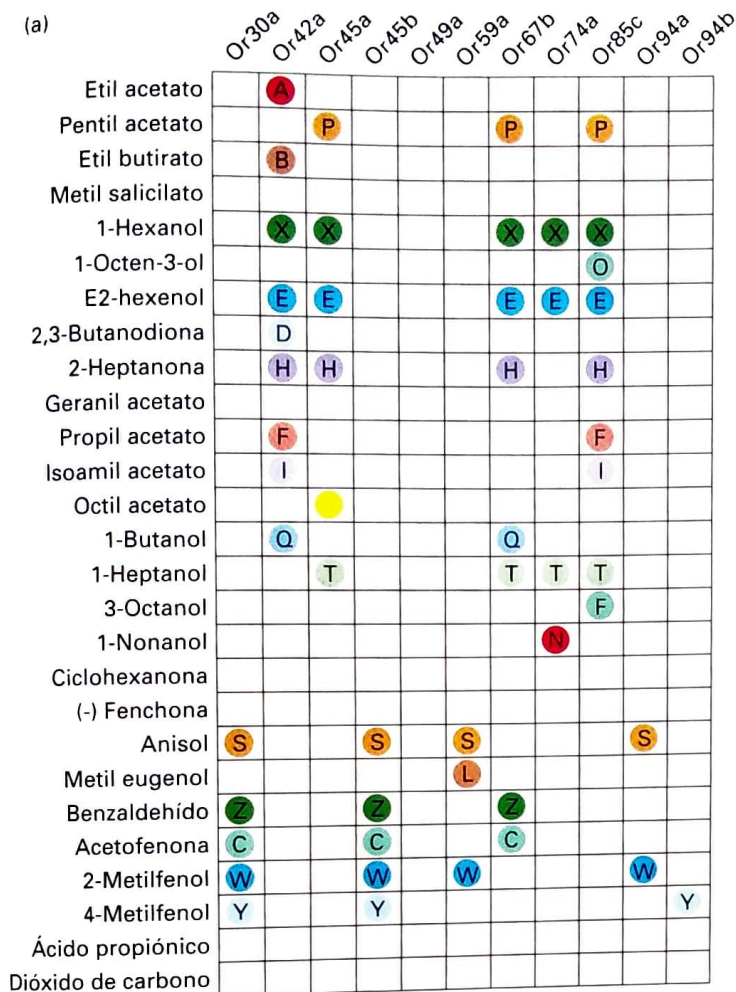
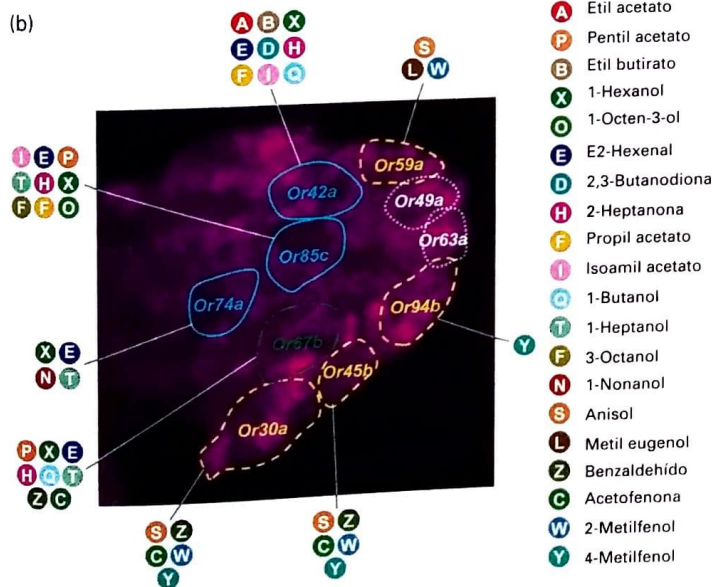


FIGURA EXPERIMENTAL 22-29 Tipos de receptores olfativos individuales pueden ser vinculados experimentalmente con varios odorantes y rastreados a glomérulos específicos en el sistema olfativo larval de *Drosophila*. (a) Las diferentes proteínas de receptores olfativos se enumeran en la parte superior, y los 27 odorantes ensayados se muestran en el lado izquierdo. Los puntos coloreados indican respuestas fuertes al olor.

Notar que algunos odorantes estimulan múltiples receptores (pentil acetato), mientras otros (etil butirato) actúan sobre un solo receptor. Nótese que muchos receptores, tales como Or42a u Or67b, responden principalmente a compuestos alifáticos, mientras otros, tales como Or30a y Or59a, lo hacen a compuestos aromáticos. (b) Mapa espacial de la información olfativa en glomérulos del cerebro larval de *Drosophila*. El mapeo se hizo expresando un gen reportero bajo el control de cada una de las neuronas receptoras olfativas seleccionadas. La fotografía indica los glomérulos que reciben proyecciones de ORN que producen cada uno de los diez tipos de proteína de receptores indicados (Or42a, etc.). También están indicados los odorantes a los cuales cada receptor responde fuertemente. Nótese que, con una excepción (Or30a y Or45b), cada glomérulo tiene capacidades sensoriales únicas. La excepción podría no ser tal si más patrones de expresión de genes olfativos fueran ensayados. Los glomérulos que detectan odorantes y que son similares químicamente tienden a estar situados uno a continuación del otro. Por ejemplo, los tres glomérulos indicados por una línea continua azul detectan compuestos alifáticos lineales. Aquellos con líneas de trazos discontinuos, compuestos aromáticos. (Parte [a] de S. A. Kreher, J. Y. Kwon, y J. R. Carlson, 2005, *Neuron* 46:445-456. Parte [b] cortesía de Jae Young Kwon, Scott Kreher, y John Carlson)



El tercer problema, cómo el sistema está conectado de forma que el cerebro pueda comprender qué olor ha sido detectado, ha sido parcialmente respondido. Primero, las ORN que expresan el mismo receptor envían sus axones al mismo glomérulo. Así, todas las células que responden al mismo odorante envían procesos hacia el mismo

destino. En ratones, una pista crucial acerca del patrón del sistema olfativo provino del descubrimiento de que los receptores del olfato juegan dos papeles en las ORN: la unión a odorantes y, durante el desarrollo, el direccionamiento axónico. Múltiples axones de ORN que expresan el mismo receptor son guiados hacia el mismo destino glomerular. El mecanismo completo no se conoce, pero está claro que los axones de las ORN responden a sus propios receptores del olfato y a moléculas de direccionamiento axónico utilizadas en otras partes del sistema nervioso.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 22.4

Percibiendo el entorno: tacto, dolor, gusto y olfato

- Los mecanosensores y los receptores de dolor son canales de Na^+ regulados o canales de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.
- La sensibilidad al tacto requiere de varias proteínas citoesqueletales y de matriz extracelular, así como de un canal de Na^+ regulado (véase Fig. 22-24).
- Cinco gustos principales son detectados por subconjuntos de células en cada yema gustativa. Los sabores salado y agrio son detectados por proteínas de canal específicas, y los receptores acoplados a proteína G detectan la dulzura, el sabor sabroso y la amargura.

- En todos los casos, los estimulantes del gusto llevan a la despolarización de la membrana y a la secreción de pequeñas moléculas, tales como ATP, que estimulan las neuronas adyacentes. Algunos GPCR de estimulantes del gusto son encontrados en diferentes combinaciones homo y heterotriméricas para detectar diferentes sabores (véase Fig. 22-25).

- Los receptores de odorantes, los cuales son receptores acoplados a proteína G de siete pasos transmembrana, están codificados por un grupo muy grande de genes. Cualquier neurona receptora olfativa expresa uno y solo un gen de receptor olfativo, de manera que una señal de esa célula al cerebro transmite en forma inequívoca la naturaleza del químico detectado.

- Las ORN que expresan el mismo gen de receptor envían sus axones al mismo glomérulo, y los nervios que se proyectan (neuronas mitrales en mamíferos) llevan información específica de un odorante desde los glomérulos hacia el cerebro (véanse Figs. 22-27, 22-28 y 22-29).

Perspectivas para el futuro

En este capítulo hemos provisto una introducción a las notables propiedades de las células nerviosas que sirven como nuestra interfaz con el mundo. El cuerpo humano contiene múltiples tipos de neuronas, cada una con su propia forma, neurotransmisor, número de dendritas, longitud del axón y números de conexiones con otras neuronas. Cómo cada uno de estos tipos de células se desarrolla precisamente en el lugar correcto y realiza conexiones sinápticas apropiadas con otras neuronas y contactos adecuados con la glía circundante sigue siendo en gran parte un misterio. Por ejemplo, ¿cuáles son las señales extracelulares, circuitos reguladores transcripcionales y proteínas inducidas o reprimidas que le dicen a una neurona que se vuelva mielinizada o que genere un número específico de dendritas de una longitud específica? ¿Cómo logra una neurona alcanzar su estructura tan alargada, polarizada y ramificada? ¿Por qué una parte de una neurona se convierte en una dendrita y otra en un axón? ¿Por qué hay ciertas proteínas de membrana clave agrupadas en puntos particulares (receptores de neurotransmisor en densidades postsinápticas en dendritas, canales de Ca^{2+} en las terminales axónicas y canales de Na^+ en neuronas mielinizadas en los nodos de Ranvier)? Tales preguntas sobre la forma de la célula y las dianas proteicas también se aplican para otros tipos de células, pero la diversidad morfológica de diferentes tipos de neuronas hace que estas sean preguntas particularmente intrigantes respecto del sistema nervioso.

Una comprensión detallada de la estructura y función de las células nerviosas requerirá del conocimiento de las estructuras tridimensionales de muchos canales diferentes, receptores de neurotransmisor, otras proteínas de membrana y proteínas del citoesqueleto. Mientras que la determinación de la estructura del primer canal de K^+ regulado por voltaje ha iluminado los mecanismos de la regulación de canales que probablemente aplica a otros canales regulados por voltaje, carecemos de estructuras para los canales de calcio. No conocemos las estructuras de los “receptores de dolor” y de este modo no podemos derivar racionalmente estructuras de antagonistas putativos que podrían ser útiles en el control del dolor. Conocemos las estructuras de solo unos pocos cientos de GPCR utilizados en el sistema nervioso (ninguno en el sistema olfativo) y, así, los detalles de cómo estos receptores diferencian entre ligandos cercanamente relacionados permanecen oscuros.

Desde el punto de vista de la biología celular molecular, una excitación ha rodeado a la investigación en los mecanismos de la memoria. En la mayoría de los casos, la memoria no depende de la

formación de nuevas neuronas. En cambio, las neuronas existentes son modificadas: cambios en el número y fuerza de las sinapsis a menudo subyacen el establecimiento y la perduración de las memorias. Los estudios actuales están dirigidos a los cambios moleculares que alteran las sinapsis, tanto en células pre como postsinápticas. Por ejemplo, en muchas neuronas en el cerebro de mamífero las espinas dendríticas que emergen de las dendritas y forman sinapsis con otras neuronas están constantemente formándose y desapareciendo, dependiendo del grado de estimulación del nervio por otras neuronas. Tales cambios afectan la habilidad de la neurona postsináptica de responder a señales de las presinápticas. La idea de que pueda relacionarse con plasticidad funcional de las sinapsis necesita ser probada aún más.

Los avances en la biología celular del sistema nervioso han sido nivelados por los avances extraordinarios en la exploración de cómo los circuitos neuronales llevan a cabo la interpretación de la información sensorial, el pensamiento analítico, los mecanismos de retroalimentación para el control motor, el establecimiento y la recuperación de las memorias, la herencia de los instintos, el control hormonal regulado y las respuestas emocionales. Algunos experimentos se hacen con tecnologías de imagen no invasivas, observando miles a millones de neuronas y detectando la actividad global eléctrica. Otros se hacen observando in vivo unas pocas células al mismo tiempo que se utilizan electrodos insertados. Esto está siendo logrado por mejoras en los métodos de imagen (invasivos y no invasivos) combinadas con el desarrollo de mejores formas de manipular las actividades de neuronas individuales, o de grandes números de neuronas simultáneamente. Por ejemplo, uno puede generar ratones transgénicos que expresan en conjuntos específicos de neuronas una proteína de canal de Na^+ modificada que se activa por luz. Un haz de luz microscópico enfocado excitará estas células pero no otras, y uno puede observar las consecuencias para el comportamiento del animal. Hay muchas razones para esperar que estos avances continúen, una perspectiva emocionante para la comprensión del cerebro y para hacer un mejor trabajo en el tratamiento de enfermedades que afectan el sistema nervioso.

Palabras clave

agrina 1037
astrocitos 1023
axón 1021
canal regulado por
ligando 1043
canal regulado por voltaje 1025
células de Schwann 1023
células gliales 1023
conducción saltatoria 1033
dendritas 1021
despolarización 1021
endocitosis 1037
glomérulos 1051
hiperpolarización 1027
interneurona 1020
MuSK 1037
neurona 1020

neurona motora 1020
neurona sensorial 1020
neurotransmisores 1022
nociceptores 1048
nodo de Ranvier 1033
odorantes 1050
oligodendrocitos 1023
período refractario 1027
potencial de acción 1021
receptor excitador 1045
receptor inhibitorio 1045
receptores olfativos 1050
repolarización 1021
sinapsis 1022
unión neuromuscular 1037
vaina de mielina 1021
vesículas sinápticas 1022

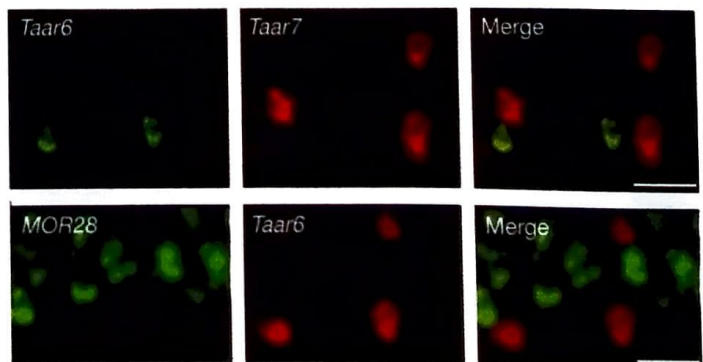
Revisión de los conceptos

1. ¿Cuál es el papel de las células gliales en el cerebro y otras partes del sistema nervioso?
2. El potencial de reposo de una neurona es -60 mV en el interior en comparación con el exterior de la célula. ¿Cómo se mantiene el potencial de reposo en las células animales?
3. Nombre las tres fases de un potencial de acción. Describa para cada una las bases moleculares subyacentes y el ion involucrado. ¿Por qué se aplica el término *canal regulado por voltaje* a los canales de Na^+ involucrados en la generación de un potencial de acción?
4. Explique cómo las estructuras cristalinas de los canales iónicos de potasio sugieren la forma en la que los dominios sensibles al voltaje interactúan con otras partes de las proteínas para abrir y cerrar los canales iónicos. ¿Cómo se aplica esta relación estructura-función a otros canales iónicos regulados por voltaje?
5. Explique por qué la fuerza de un potencial de acción no decrece a medida que viaja por el axón.
6. Explique por qué el potencial de membrana no continúa aumentando, sino que más bien llega a una meseta y entonces decrece durante el curso de un potencial de acción.
7. ¿Qué significa decir que los potenciales de acción son “todo o nada”?
8. ¿Qué impide que una señal nerviosa viaje “hacia atrás” hacia el cuerpo celular?
9. ¿Por qué la célula es incapaz de iniciar otro potencial de acción si es estimulada durante el período refractario?
10. La mielinización incrementa la velocidad de la propagación de un potencial de acción a lo largo de un axón. ¿Qué es la mielinización? La mielinización causa la agrupación de canales de Na^+ regulados por voltaje y de bombas Na^+/K^+ en los nodos de Ranvier a lo largo del axón. Prediga las consecuencias en la propagación de un potencial de acción de incrementar el espacio entre nodos de Ranvier por un factor de 10.
11. Describa el mecanismo de acción para las drogas adictivas tales como la cocaína.
12. La acetilcolina es un neurotransmisor común liberado en la sinapsis. Prediga las consecuencias en la activación muscular de la actividad disminuida de la esterasa de acetilcolina en las sinapsis nervio-músculo.
13. Describa las dinámicas iónicas del proceso de contracción muscular.
14. Tras la llegada de un potencial de acción en células estimuladas, las vesículas sinápticas se fusionan rápidamente con la membrana presináptica. Esto sucede en menos de 1 ms. ¿Qué mecanismos permiten que este proceso tenga lugar a una velocidad tan grande?
15. Las neuronas, particularmente aquellas en el cerebro, reciben múltiples señales excitadoras e inhibitorias. ¿Cuál es el nombre de la extensión de la neurona en la cual se reciben dichas señales? ¿Cómo integra la neurona estas señales para determinar si generar o no un potencial de acción?
16. Explique el mecanismo por el cual se impide que los potenciales de acción se propaguen a una célula postsináptica si son transmitidos a través en una sinapsis inhibitoria.
17. ¿Cuál es el papel de la dinamina en el reciclado de vesículas sinápticas? ¿Qué evidencia apoya esto?
18. Compare y contraste las sinapsis eléctricas y químicas.
19. Compare las estructuras y funciones de las moléculas de receptores para el sabor salado y agrio, las moléculas de receptores del gusto para la dulzura, la amargura y el sabor sabroso y las moléculas de receptores de olor.

Análisis de los datos

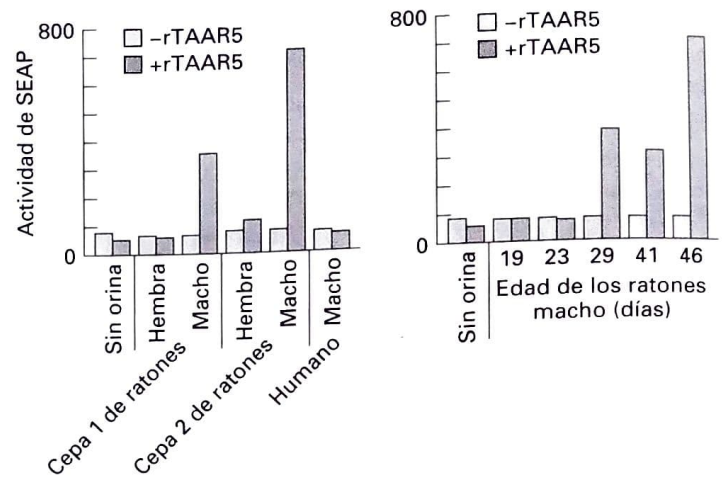
La olfacción ocurre cuando compuestos volátiles se unen a receptores de odorantes específicos. En mamíferos, cada neurona receptora olfativa en el epitelio nasal olfativo expresa un único tipo de receptor de odorante. Estos receptores de odorantes constituyen una gran familia multigénica ($> 1\,000$ miembros) de proteínas relacionadas. La unión del odorante induce una cascada de señalización que es mediada a través de una proteína G, $G_{\alpha_{olf}}$. Estudios recientes sugieren que existe un pequeño número de neuronas sensoriales olfativas en el epitelio nasal que expresan miembros la familia del receptor asociado al seguimiento de aminas (TAAR), quimiorreceptores que son receptores acoplados a proteínas G (GPCR) pero que no están relacionados a los receptores de odorantes clásicos (véase Liberles y Buck, 2006, *Nature* 442:645-650). El genoma de ratón codifica 15 genes TAAR, mientras que el genoma humano codifica 6.

a. Con el fin de examinar el patrón de expresión de diferentes TAAR en el epitelio nasal olfativo, los investigadores localizaron RNA de TAAR por hibridización in situ en combinaciones por pares. Todas las combinaciones de pares posibles de los 15 TAAR de ratón fueron examinadas. Un ejemplo típico de los resultados obtenidos se muestra en el conjunto superior de paneles en la figura más abajo, en el cual TAAR6 y TAAR7 han sido localizados con sondas fluorescentes en el epitelio nasal de ratón. La sonda para TAAR6 se marcó con verde fluorescente; la sonda para TAAR7, con rojo fluorescente. El conjunto inferior de paneles muestra la localización del receptor 28 de odorante de ratón (MOR28; verde), un receptor de odorante clásico y TAAR6 (rojo). Cada región teñida en las imágenes es el patrón de tinción de una neurona olfativa individual. Los paneles “Merge” muestran las otras dos imágenes superpuestas. ¿Qué sugieren estos datos sobre los patrones de expresión de los TAAR?



b. Un número de líneas celulares que no produce receptores de odorantes clásicos ni TAAR ha sido cada una transfectada con el

neuronas TAAR5 en ratones? ¿Qué otros estudios adicionales llevaría usted a cabo para apoyar su hipótesis?



Neuronas y glía: componentes básicos del sistema nervioso

Stevens, B. 2003. Glia: much more than the neuron's side-kick. *Curr. Biol.* 13:R469-R472.

Long, S. B., E. B. Campbell, and R. MacKinnon. 2005. Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* 309(5736):897-903.

Long, S. B., E. B. Campbell, and R. MacKinnon. 2005. Voltage sensor of Kv 1.2: structural basis of electromechanical coupling. *Science* 309(5736):903-908.

Long, S. B., X. Tao, E. Campbell, and R. MacKinnon. 2007. Atomic structure of a voltage-dependent K⁺ channel in a lipid membrane-like environment. *Nature* 450:376-382.

Nave, K.-A. 2010. Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature* 468:244-252.

Neher, E. 1992. Ion channels for communication between and within cells. Nobel Lecture reprinted in *Neuron* 8:605-612 and *Science* 256:498-502.

Neher, E., and B. Sakmann. 1992. The patch clamp technique. *Sci. Am.* 266(3):28-35.

Payandeh, J., T. Scheuer, N. Zheng, and W. A. Catterall. 2011. The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature* doi:10.1038/nature 10238.

Comunicación en las sinapsis

Burden, S. J. 2011. Snapshot: neuromuscular junction. *Cell* 144:826-826 el.

Haucke, V., E. Neher, and S. Sigrist. 2011. Protein scaffolds in the coupling of synaptic exocytosis and endocytosis. *Nature Rev. Neurosci.* 12:127-138.

Ikeda, S. R. 2001. Signal transduction. Calcium channels—link locally, act globally. *Science* 294:318-319.

Kummer, T. T., T. Misgeld, and J. R. Sanes. 2006. Assembly of the postsynaptic membrane at the neuromuscular junction: paradigm lost. *Curr. Opin. Neurobiol.* 16(1):74-82.

McCue, H., L. P. Haynes, and R. D. Burgoyne. 2010. The diversity of calcium sensor proteins in the regulation of neuronal function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2:a004085

Sakmann, B. 1992. Elementary steps in synaptic transmission revealed by currents through single ion channels. Nobel Lecture reprinted in *EMBO J.* 11:2002-2016 and *Science* 256:503-512.

Shen, K., and P. Scheiffele. 2010. Genetics and cell biology of building specific synaptic connectivity. *Ann. Rev. Neurosci.* 33:473-507.

Siksou, L., A. Triller, and S. Marty. 2011. Ultrastructural organization of presynaptic terminals. *Curr. Opin. Neurosci.* 21:261-268.

Südhof, T., and J. Rothman. 2009. Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science* 323:474-477.

Unwin, N. 2005. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 346:967-989.

Vrljic, M., et al. 2010. Molecular mechanism of the synaptotagmin-SNARE interaction in Ca²⁺-triggered vesicle fusion. *Nature Struct. Mol. Biol.* 17:325-331.

Wu, H., W. Xiong, and L. Mei. 2010. To build a synapse: signaling pathways in neuromuscular junction assembly. *Development* 137:1017-1033.

Percibiendo el entorno: tacto, dolor, gusto y olfato

Brochtrup, A., and T. Hummel. 2010. Olfactory map formation in the *Drosophila* brain: genetic specificity and neuronal variability. *Curr. Opin. Neurobiol.* 21:85-92.

Buck, L., and R. Axel. 1991. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition. *Cell* 65:175-187.

Chaudhari, N., and S. D. Raper. 2010. The cell biology of taste. *J. Cell. Biol.* 190:285-296.

Delmas, P., J. Hao, and L. Rodat-Despoix. 2011. Molecular mechanisms of mechanotransduction in mammalian sensory neurons. *Nature Rev. Neurosci.* 12:139-153.

DeMaria, S., and J. Ngai. 2010. The cell biology of smell. *J. Cell. Biol.* 191:443-452.

Kaupp, U. B. 2010. Olfactory signaling in vertebrates and insects: differences and commonalities. *Nature Rev. Neurosci.* 11:188-200.

Lin, S. Y., and D. P. Corey. 2005. TRP channels in mechanosensation. *Curr. Opin. Neurobiol.* 15(3):350-357.

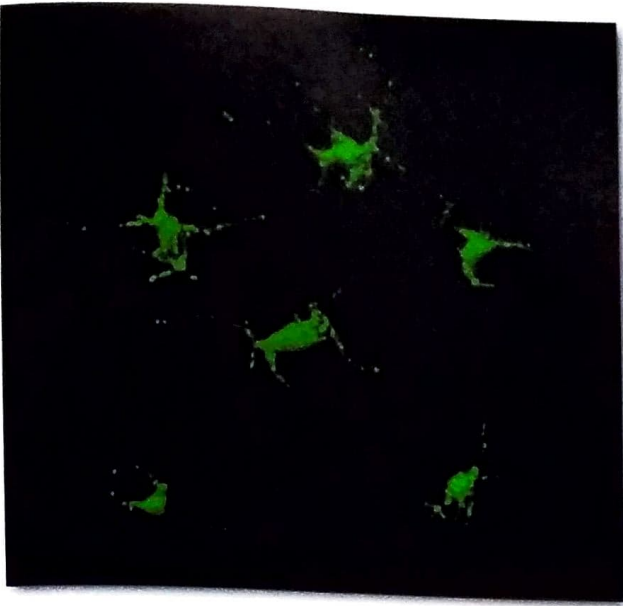
Lumpkin, E., K. Marshall, and A. Nelson. 2010. The cell biology of touch. *J. Cell. Biol.* 191:237-248.

McKemy, D. D., W. M. Neuhauser, and D. Julius. 2002. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 416:52-58.

Nelson, G., et al. 2001. Mammalian sweet taste receptors. *Cell* 106(3):381-390.

Zhang, X., and S. Firestein. 2002. The olfactory receptor gene superfamily of the mouse. *Nature Neurosci.* 5(2):124-133.

Inmunología



Las células dendríticas en la piel tienen moléculas MHC clase II en su superficie. Las que se muestran aquí fueron manipuladas genéticamente para expresar la proteína de fusión clase II MHC-GFP, la cual emite fluorescencia verde. (Cortesía de M. Boes y H.L. Ploegh.)

Inmunidad es el estado de protección contra los efectos dañinos de la exposición a patógenos. Las defensas del huésped pueden tomar formas muy diversas, y todos los patógenos exitosos han encontrado modos para desarmar el sistema inmunitario o manipularlo para ventaja propia. Es por ello que las interacciones huésped-patógeno constituyen un trabajo evolutivo en progreso. Esto explica por qué todavía seguimos siendo agredidos por virus, bacterias y parásitos patógenos. La prevalencia de enfermedades infecciosas demuestra las imperfecciones en las defensas del huésped. Un sistema inmunitario capaz de producir una inmunidad perfectamente esterilizadora llevaría a un mundo sin patógenos, un resultado distinto de la vida tal cual la conocemos. Más bien, la coevolución de los patógenos y sus huéspedes le permite a los patógenos, que tienen tiempos generacionales cortos, seguir evolucionando contramedidas sofisticadas a las cuales el huésped debe responder ajustando, o mejorando, sus defensas. Las defensas sofisticadas tienen un precio: un sistema inmunitario capaz de tratar una colección masiva y diversa de patógenos que evolucionan rápidamente podría montar un ataque sobre las células y tejidos del propio organismo huésped, un fenómeno denominado *autoinmunidad*.

En este capítulo trataremos sobre todo el sistema inmunitario en vertebrados, con énfasis particular en aquellas moléculas, tipos celu-

lares y rutas que distingan particularmente al sistema inmunitario de otros tipos de células y tejidos. Dos características notables que caracterizan al sistema inmunitario en vertebrados son la habilidad para distinguir entre dos sustancias estrechamente relacionadas (**especificidad**) y para recordar una exposición previa a una sustancia extraña (**memoria**). Esto se realiza a través de la generación de un conjunto masivo y diverso de receptores de antígenos específicos (**diversidad**), entrenado con moléculas propias y libres de componentes autorreactivos (**tolerancia**), aunque es claro que ninguno de estos objetivos deseados se logra con absoluta precisión.

Desde una perspectiva práctica, los poderes del sistema inmunitario no son explotados solo terapéuticamente. Los anticuerpos monoclonales representan un mercado multimillonario en dólares para el tratamiento de trastornos inflamatorios, autoinmunidad y cáncer. Las moléculas que forman parte del sistema inmunitario, en particular los anticuerpos, son herramientas indispensables para los biólogos celulares. Los anticuerpos permiten la visualización y el aislamiento de las moléculas que reconocen, y esto lo realizan con una precisión exacta. Esta habilidad ha sido invaluable para realizar una descripción precisa de los componentes que constituyen la célula y sus orgánulos, y su localización tanto en células como en tejidos.

CONTENIDO

23.1 Generalidades de la defensa del huésped	1061	23.5 Linfocitos T: receptores y desarrollo	1092
23.2 Inmunoglobulinas: estructura y función	1068	23.6 La colaboración de las células del sistema inmunitario en la respuesta adaptativa	1102
23.3 Generación de diversidad de anticuerpos y desarrollo de linfocitos B	1073		
23.4 El MCH y la presentación del antígeno	1081		

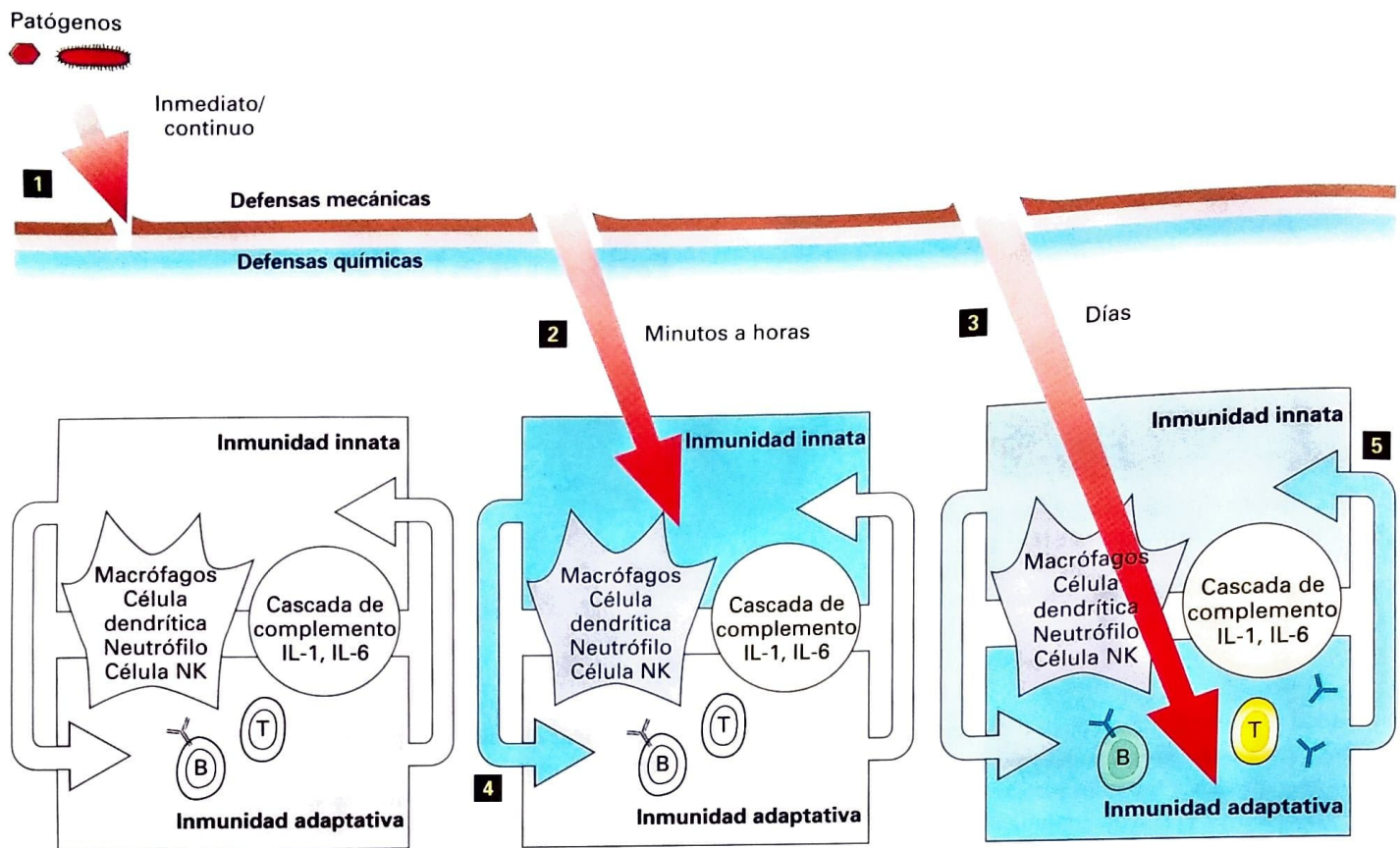


FIGURA 23-1 Las tres capas de defensa inmunitaria en mamíferos.

Izquierda: las defensas mecánicas consisten en el epitelio y la piel. Las defensas químicas incluyen bajo pH en el ambiente gástrico y enzimas antibacterianas en el líquido lagrimal. Estas barreras proporcionan una protección continua contra a agentes invasores. Los patógenos deben generar una brecha física en estas defensas (paso 1) para infectar al huésped. *Medio:* los patógenos que han generado una brecha en las defensas físicas y químicas (paso 2) son manejados por células y moléculas del sistema inmunitario innato (azul), que incluye células fagocíticas (neutrófilos, células dendríticas, macrófagos), células NK (natural killer, "asesina natural"), complementos proteicos y ciertas interleucinas (IL-1, IL-6). Las defensas innatas son activadas desde minutos

hasta horas una vez iniciada la infección. *Derecha:* los patógenos que no hayan sido eliminados por el sistema inmunitario innato son tratados por el sistema inmunitario adaptativo (paso 3), en particular por linfocitos B y T. La activación completa de la inmunidad adaptativa requiere de días. Los productos de la respuesta innata pueden potenciar una consiguiente respuesta adaptativa (paso 4). Del mismo modo, los productos de una respuesta adaptativa pueden intensificar la inmunidad innata (paso 5). Muchos tipos celulares y productos secretados se extienden de un lado a otro de la valla entre el sistema inmunitario innato y el adaptativo, lo que permite así la conexión entre estas dos capas de defensa del huésped.

La defensa del huésped está compuesta por tres estratos: (1) defensas mecánicas/químicas, (2) inmunidad innata, e (3) inmunidad adaptativa (Fig. 23-1). Las defensas mecánicas y químicas operan continuamente. Las respuestas inmunitarias innatas, que involucran células y moléculas presentes todo el tiempo, son activadas rápidamente (de minutos a horas), pero sus habilidades para distinguir entre gran cantidad de patógenos diferentes es algo limitada. Por el contrario, las respuestas inmunitarias adaptativas requieren de varios días para desarrollarse totalmente y son muy específicas; es decir, son capaces de distinguir entre patógenos afines basándose en pequeñas diferencias moleculares de sus estructuras.

La manera en la que los **antígenos**, y cualquier material que pueda evocar la respuesta inmunitaria, son reconocidos y cómo estos materiales extraños son eliminados involucran principios moleculares y celulares que son únicos del sistema inmunitario. Comenzaremos este capítulo con un breve esquema de la organización del sistema inmunitario de mamíferos, introduciendo los participantes esenciales de la inmunidad innata y adaptativa y describiendo la inflamación, una respuesta

local a heridas o infecciones que conduce a la activación de células del sistema inmunitario y a su reclutamiento hacia el sitio afectado. En las siguientes dos secciones, analizaremos la estructura y la función de las moléculas anticuerpos (o **inmunoglobinas**), que se unen a características moleculares específicas en antígenos, y cómo la variabilidad en la estructura de los anticuerpos contribuye a un reconocimiento específico de los antígenos. La enorme diversidad de antígenos que puede reconocer el sistema inmunitario es explicado por reordenamientos únicos en el material genético de linfocitos B y T, comúnmente denominados **linfocitos B** y **linfocitos T**, que son los glóbulos blancos (leucocitos) que realizan el reconocimiento específico de antígenos. Estos reordenamientos genéticos no solo controlan la especificidad de los receptores de antígenos en los linfocitos, sino que también determinan el destino celular durante el curso de desarrollo del linfocito.

Aunque los mecanismos que originan los receptores antígeno-específicos en linfocitos B y T son muy similares, el modo a través del cual estos receptores reconocen a los antígenos es muy distinto. Los receptores en las linfocitos B pueden interactuar directamente con antígenos

intactos, pero los receptores en los linfocitos T no. En cambio, como se describe en la Sección 23.4, los receptores de los linfocitos T reconocen formas del antígeno procesado (escisión), presentado en la superficie de células blanco por glucoproteínas codificadas por el complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Como estas glucoproteínas codificadas por el CMH exhiben los antígenos procesados, es importante para nuestro entendimiento de cómo se inician las respuestas inmunitarias, no solo para entender la fisiología de la respuesta inmunitaria sino también para fines prácticos. ¿Cuál es el mejor modo de crear anticuerpos para la defensa contra agentes infecciosos? ¿Cómo podemos crear anticuerpos que sirvan como herramientas para reconocer nuestra proteína favorita dentro del laboratorio? El conocimiento del procesamiento de antígenos y cómo se presenta brindan información para el diseño de **vacunas** a fin de proteger contra enfermedades infecciosas y para generar herramientas esenciales para la investigación. Las glucoproteínas codificadas por el MHC también ayudan a determinar el destino de desarrollo de los linfocitos T de modo tal que las propias células y tejidos de un organismo (antígenos propios) normalmente no evoquen una respuesta inmunitaria, mientras que los antígenos extraños sí. Concluiremos el capítulo con una visión integradora de la respuesta inmunitaria a patógenos y resaltaremos la colaboración entre distintas células del sistema inmunitario que se requiere para una respuesta efectiva.

23.1 Generalidades de la defensa del huésped

Debido a que el sistema inmunitario ha evolucionado para tratar con los patógenos, comenzaremos examinando dónde se encuentran los patógenos y dónde se replican. Luego, introduciremos conceptos básicos de la inmunidad innata y adaptativa, incluyendo algunos de los participantes celulares y moleculares esenciales.

Los patógenos ingresan en el cuerpo mediante rutas diferentes y se replican en sitios distintos

La exposición a patógenos ocurre por rutas distintas. La piel tiene por sí misma una superficie de $\approx 1,8581$ metros cuadrados (20 pies cuadrados); las superficies epiteliales que recubren las vías respiratorias, el tubo digestivo y el tracto genital presentan un área aún más formidable, de $\sim 371,61$ metros cuadrados (4 000 pies cuadrados). Todas estas superficies se encuentran continuamente expuestas a virus y bacterias del ambiente. Los patógenos transmitidos por alimentos y los agentes transmitidos sexualmente tienen como blanco el epitelio al que están expuestos. El estornudo de un individuo infectado con gripe libera millones de partículas de virus en forma de aerosol, listas para ser inhaladas por la siguiente persona por infectar. La rotura de la piel, incluso por mínima abrasión, o de las barreras epiteliales que recubren los tejidos internos, proporciona una ruta de fácil acceso para el ingreso de patógenos, que luego acceden a una fuente rica de nutrientes (para las bacterias) y de células requeridas para su replicación (virus).

La replicación de los virus se encuentra estrictamente confinada al citoplasma o al núcleo de las células del huésped, donde ocurre la síntesis proteica y la replicación del material genético viral. Los virus se propagan hacia otras células como partículas libres de virus (viriones) o por propagación de célula a célula. Muchas bacterias pueden replicarse en el espacio intercelular, pero muchas otras se encuentran especia-

lizadas para invadir células del huésped y sobrevivir allí. Estas bacterias intracelulares residen en vesículas delimitadas por membranas a través de las cuales ingresan en la célula por endocitosis o fagocitosis, o bien en el citoplasma si se liberan de estas vesículas. Entonces, un sistema de defensa efectivo en el huésped debe ser capaz de eliminar virus y bacterias fuera de las células, pero también a aquellas células que hospeden estos patógenos.

Los organismos parásitos también pueden causar enfermedades. Con ciclos de vida cada vez más complejos como aquellos de los protozoos que producen la enfermedad del sueño (tripanosomas) o el paludismo (especies de *Plasmodium*), las contramedidas de los patógenos también se tornan más complejas. Las bacterias, protozoos y hongos, en especial aquellos que causan enfermedades en los animales, comúnmente reciben el nombre de microbios.

Los leucocitos circulan por el cuerpo y residen en tejidos y ganglios linfáticos

Exceptuando los eritrocitos, pocas células con función asignada recorren tanta distancia como lo hacen las células que proporcionan inmunidad. La circulación en mamíferos funciona como un vehículo de transporte necesario para eritrocitos, leucocitos y plaquetas. Aunque los eritrocitos nunca abandonan la circulación (su función de acarrear oxígeno no lo requiere), los leucocitos (glóbulos blancos) utilizan la circulación exclusivamente para transporte. La función de transporte en la circulación asegura que los linfocitos sean distribuidos desde los sitios donde son generados (médula ósea, timo, hígado fetal) hacia aquellos donde serán activados (ganglios linfáticos, bazo), y luego a los sitios de la infección donde podrán eliminar a los invasores. Una vez que los linfocitos arriban a un determinado sitio, luego pueden abandonarlo y reingresar a la circulación en el curso de su labor.

El inmunitario es un sistema interconectado de vasos, órganos y células, dividido en estructuras linfoides primarias y secundarias (Fig. 23-2). Los *órganos linfoides primarios*, los sitios donde se generan los **linfocitos** (el subconjunto de leucocitos que incluyen linfocitos B y T) y adquieren sus propiedades funcionales, incluyen el timo, donde se generan los linfocitos T, y la médula ósea, donde se generan las células B (linfocitos B). Las respuestas inmunitarias adaptativas, que requieren de linfocitos funcionalmente competentes, se inician en los *órganos linfoides secundarios*, incluyendo los ganglios linfáticos y el bazo. Todos los órganos linfoides se encuentran poblados por células de origen hematopoyético (véase la Fig. 21-18), generadas en el hígado del feto y luego en la médula ósea durante el resto de la vida. Se estima que el número total de linfocitos en un hombre adulto joven es de 500×10^9 , de los cuales aproximadamente el 15% se encuentra en el bazo, 40% en otros órganos linfoides secundarios (amígdalas, ganglios linfáticos), 10% en el timo y 10% en la médula ósea; el resto se encuentra circulando el torrente sanguíneo.

Los vasos sanguíneos de vertebrados permiten la salida de líquido desde la circulación, impulsado por la tensión arterial positiva que ejerce el bombeo del corazón. Estos líquidos no solo contienen nutrientes, sino también proteínas que llevan a cabo funciones de defensa. Para mantener la homeostasis, el líquido que sale de la circulación debe finalmente regresar y lo hace en forma de *linfa*, a través de los vasos linfáticos. El volumen total de linfa es hasta 3 veces mayor que el volumen total de sangre. Los vasos linfáticos se encuentran abiertos en su extremo más distal para coleccionar el líquido intersticial que baña las células y los tejidos. Los vasos linfáticos se unen a vasos colectores de mayor

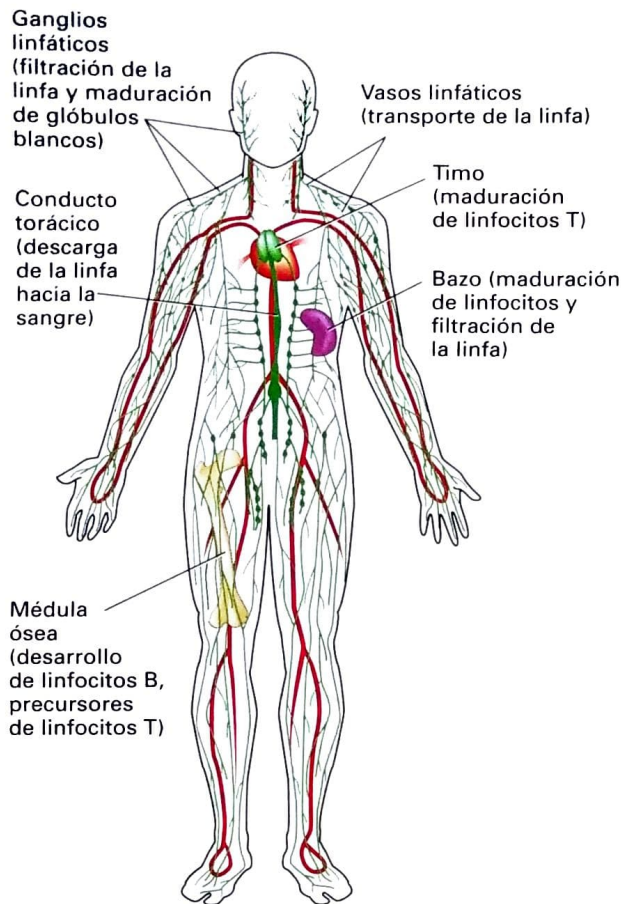


FIGURA 23-2 Aparato circulatorio y sistema linfático. La tensión arterial positiva ejercida por el bombeo del corazón es responsable de la pérdida de líquido desde la circulación (rojo) hacia los espacios intersticiales de los tejidos, de modo que las células del cuerpo puedan tener acceso a los nutrientes y eliminar los residuos. Este líquido intersticial, cuyo volumen es aproximadamente tres veces mayor que el de toda la sangre circulante, regresa a la circulación en forma de linfa, que atraviesa estructuras anatómicas especializadas denominadas ganglios linfáticos. Los órganos linfoides primarios, donde se generan los linfocitos, son la médula espinal (linfocitos B y precursores de linfocitos T) y el timo (linfocitos T). El inicio de una respuesta inmunitaria involucra a los órganos linfoides secundarios (ganglios linfáticos, bazo).

tamaño que transportan la linfa a los *ganglios linfáticos*. Un ganglio linfático está formado por una cápsula organizada en áreas definidas por el tipo de célula que se encuentra allí. Los vasos sanguíneos que ingresan en un ganglio linfático le entregan linfocitos B y T. La linfa que llega a un ganglio linfático transporta las células que han encontrado (“muestra”) antígenos, como también antígenos solubles, drenados del tejido por ese vaso linfático aferente en particular. En el ganglio linfático, interaccionan las células y moléculas requeridas para la respuesta inmunitaria adaptativa y responden a la nueva información antigénica adquirida. Luego, ejecutan las funciones efectoras necesarias para eliminar el patógeno del cuerpo (Fig. 23-3).

Se puede pensar en los ganglios linfáticos como filtros en los cuales se colecta la información antigénica obtenida en sitios distales y es presentada al sistema inmunitario de forma tal de evocar la respuesta apropiada. Todos los pasos relevantes que conducen a

la activación de linfocitos tienen lugar en los órganos linfoides. Las células que ya han recibido las instrucciones apropiadas para ser funcionalmente activas salen del ganglio linfático a través de vasos linfáticos aferentes que por último drenan al sistema circulatorio. Estas células activadas circulan por el torrente sanguíneo y, listas para la acción, pueden llegar a un sitio donde abandonen la circulación, se muevan hacia los tejidos y busquen invasores patógenos o destruyan células infectadas por virus.

Como discutiremos luego, la salida de linfocitos y otras formas de leucocitos de la circulación, el reclutamiento de estas células a los sitios de infección, el procesamiento de la información antigénica y el regreso de las células del sistema inmunitario a la circulación son todos procesos regulados cuidadosamente que involucran eventos de adhesión celular, señales quimiotácticas y el recorrido a través de barreras endoteliales.

Los límites mecánicos y físicos forman la primera barrera de defensa contra los patógenos

Como se señaló anteriormente, las defensas mecánicas y físicas forman la primera línea de defensa del huésped contra patógenos (Fig. 23-1). Las defensas mecánicas incluyen la piel, los epitelios y el exoesqueleto de artrópodos, y constituyen barreras que pueden ser abiertas por daño mecánico o a través de ataques químicos enzimáticos específicos. Las defensas químicas incluyen no solo el bajo pH que se encuentra en las secreciones gástricas, sino también enzimas como la *lisozima*, hallada en el líquido lacrimal y que puede atacar directamente a los microbios.

La importancia de las defensas mecánicas, que operan de forma continua, es inmediatamente evidente en el caso de víctimas de quemaduras. Cuando la integridad de la epidermis y la dermis se encuentra comprometida, la rica fuente de nutrientes en los tejidos subyacentes se halla expuesta, y las bacterias transportadas por el aire o bacterias no dañinas que se encuentran en la piel pueden multiplicarse sin restricción y, finalmente, superan las defensas del huésped. Los virus y las bacterias han evolucionado en sus estrategias para romper la integridad de estas barreras físicas. Los virus con envoltura, como el del HIV, la rabia y la gripe, tienen proteínas de membrana dotadas de propiedades fusogénicas. Después de la adhesión del virión con la superficie de la célula por infectar, ocurre una fusión directa de la cubierta viral con la membrana celular del huésped, lo que resulta en la liberación del material genético viral en el citoplasma del huésped, donde ahora se encuentra disponible para transcripción, traducción y replicación (véase las Figs. 4-47 y 4-49). Ciertas bacterias patógenas (p. ej., *S. aureus*) secretan collagenasas que comprometen la integridad del tejido conectivo y facilitan así el ingreso de bacterias.

La inmunidad innata proporciona una segunda línea de defensa después que las barreras mecánicas y químicas han sido cruzadas

El sistema inmunitario innato es activado una vez que las barreras mecánicas y químicas han fallado y es posible percibir la presencia de algún invasor (véase la Fig. 23-1). El sistema inmunitario innato consiste para responder a los patógenos. Los **fagocitos**, células que ingieren y destruyen patógenos, se encuentran ampliamente distribuidas por los tejidos y epitelios y pueden ser reclutadas a los sitios de infección.

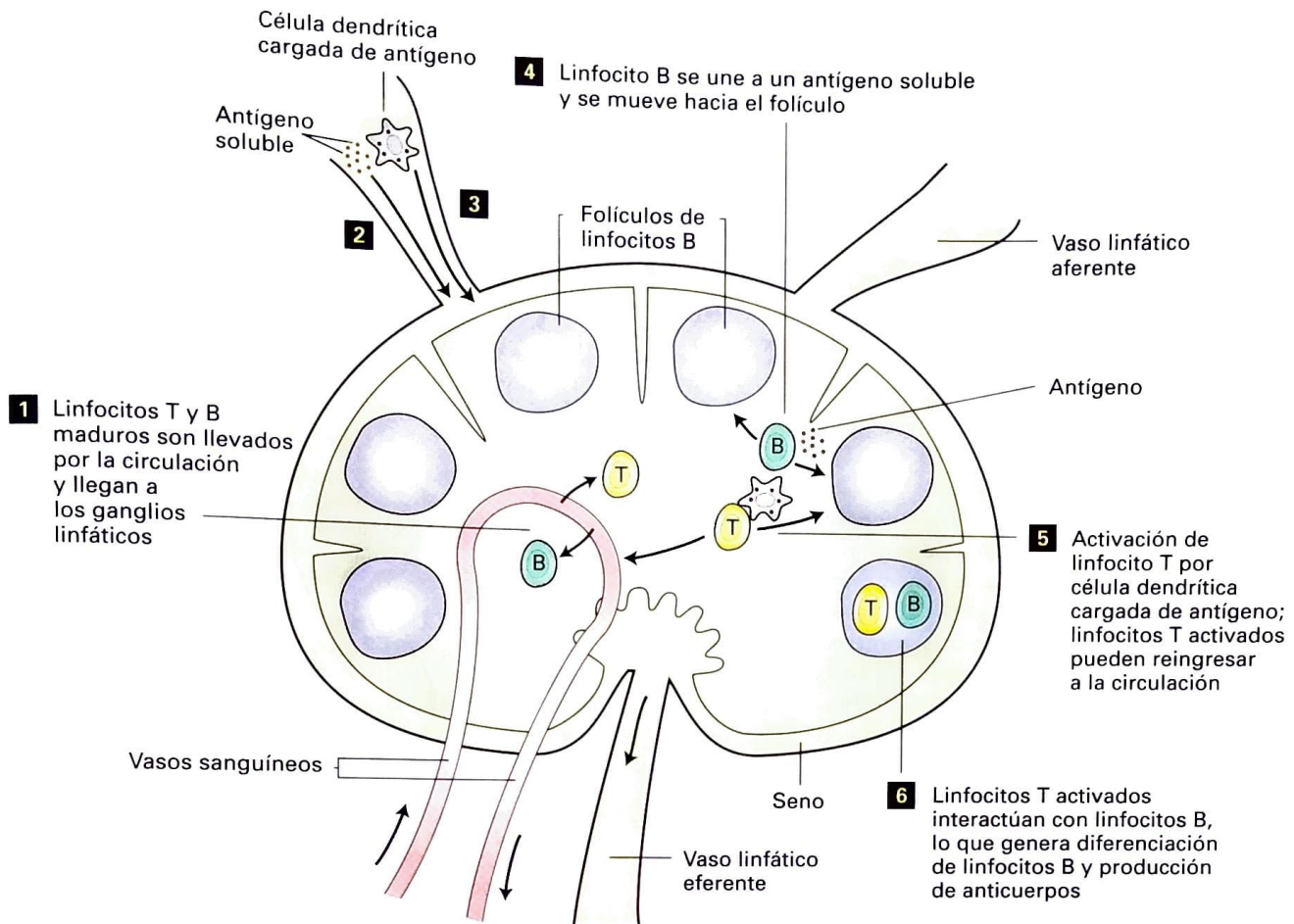


FIGURA 23-3 Inicio de la respuesta inmunitaria adaptativa en los ganglios linfáticos. El reconocimiento de antígenos por los linfocitos B y T localizados en los ganglios linfáticos inicia una respuesta inmunitaria adaptativa. Los linfocitos salen de la circulación y comienzan a residir en los ganglios linfáticos (paso 1). La linfa transporta el antígeno en dos formas: como antígeno soluble y en células dendríticas portadoras del antígeno. Ambas formas son transportadas hacia los ganglios linfáticos por la vía aferente

linfática (pasos 2, 3). El antígeno soluble es reconocido por los linfocitos B (paso 4), y las células dendríticas portadoras de antígeno presentan el antígeno a los linfocitos T (paso 5). Las interacciones productivas entre los linfocitos T y B (paso 6) permiten a los linfocitos B moverse hacia los folículos y diferenciarse en células del plasma, las cuales producen y secretan grandes cantidades de inmunoglobulinas (anticuerpos). Los vasos linfáticos eferentes regresan la linfa desde el ganglio linfático hacia la circulación.

Varias proteínas solubles presentes constitutivamente en la sangre, o producidas en respuesta a una infección o inflamación, contribuyen también a las defensas innatas. Los animales que carecen de sistema inmunitario adaptativo, como los insectos, dependen exclusivamente de las defensas innatas para combatir infecciones.

Fagocitos y células presentadoras de antígenos El sistema inmunitario innato incluye macrófagos, neutrófilos y células dendríticas. Todas estas células son fagocíticas y se encuentran equipadas con **receptores tipo Toll (TLR)**. Los miembros de esta familia de proteínas de superficie celular detectan amplios patrones de marcadores específicos de patógenos y, por lo tanto, son sensores clave para detectar la presencia de invasores bacterianos o virales. La acción de los receptores tipo Toll es importante para inducir moléculas efectoras, incluyendo péptidos antimicrobianos. Aquellas **células dendríticas** y **macrófagos** cuyos receptores tipo Toll hayan detectado patógenos también funcionan como **células presentadoras de antígenos (APC)** que presentan el material extraño procesado a los linfocitos T antígeno-específicos. La estructura y la función de los receptores tipo Toll y su papel en la activación de células dendríticas se describen en detalle en la Sección 23.6.

Sistema del complemento Otro componente importante de sistema inmunitario innato es el **complemento**, un grupo de proteínas séricas que se unen directamente a las superficies de los microbios y de los hongos. Esta unión activa una cascada proteolítica que culmina, entre otras cosas, en la formación del **complejo de ataque a la membrana**, capaz de permeabilizar la membrana protectora del patógeno (Fig. 23-4). La cascada de señalización del complemento es conceptualmente similar a la cascada de la coagulación, con amplificaciones de la reacción en cada etapa sucesiva de la activación. La **vía clásica** requiere de la presencia de anticuerpos producidos en el curso de la respuesta adaptativa y que se encuentren unidos a la superficie del microbio. Más abajo se describirá cómo se producen dichos anticuerpos. Muchas superficies microbianas tienen propiedades físicas y químicas, conocidas parcialmente, que resultan en la activación del complemento por la **vía alternativa**. Por último, los patógenos que tienen paredes con gran cantidad de manosa activan el complemento a través de la **vía de las lectinas de unión a manosas**. La unión de la lectinas produce la activación de dos proteasas de unión a manosas asociadas a lectinas, MASP-1 y MASP-2, que permiten la activación de componentes de la cascada del complemento. Las tres vías convergen en la activación de la proteína de complemento C3.

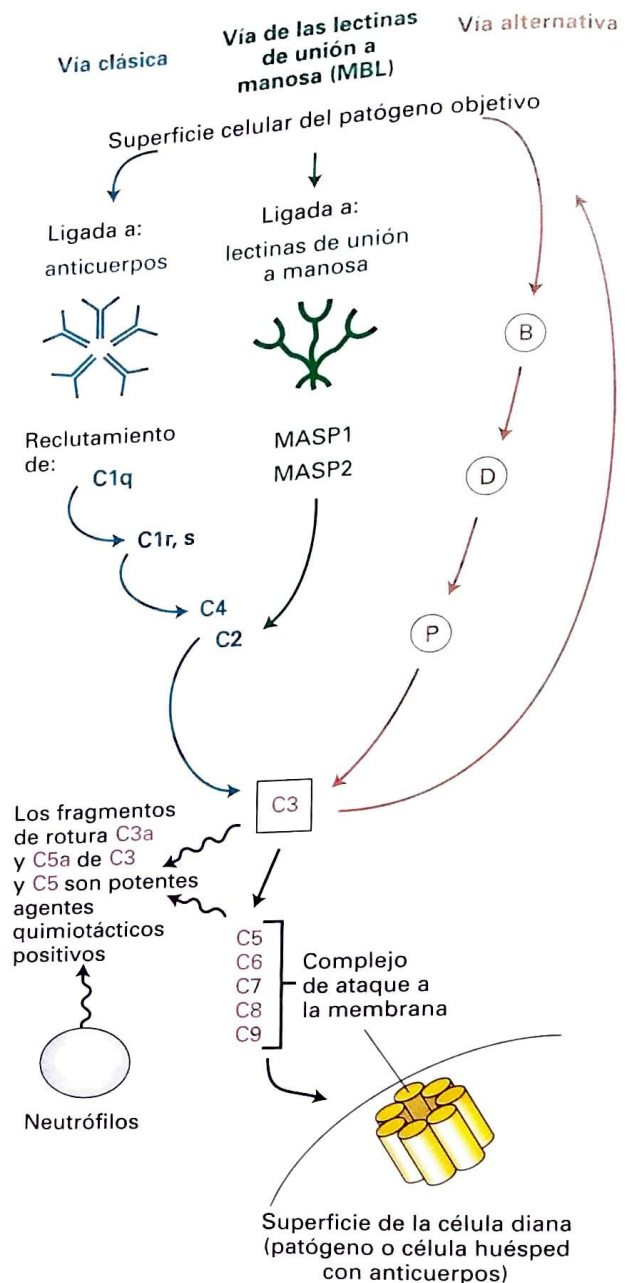
FIGURA 23-4 Tres vías de activación del complemento. La vía clásica involucra la formación de complejos antígeno-anticuerpo, mientras que en la vía de las lectinas de unión a manosas, las superficies de varios patógenos con estructuras ricas en manosas son reconocidas por lectinas de unión a manosas. La vía alternativa requiere que se deposite una forma especial de proteína sérica C3, un componente mayor del sistema del complemento, sobre la superficie microbiana. En cada paso se produce una amplificación de la actividad. Las tres vías convergen en C3, que se adhiere a C5 y así provoca la formación del complejo de ataque de membrana, que conducirá a la destrucción de las células diana. Los pequeños fragmentos de C3 y C5 generados en el curso de la activación del complemento inician la inflamación atrayendo neutrófilos, células fagocíticas que pueden eliminar bacterias dentro de un corto alcance o por ingestión.

El C3 es sintetizado como un precursor que tiene un enlace tioéster interno entre una cisteína y un residuo de glutamato cercanos entre sí. Este enlace tioéster se vuelve extremadamente reactivo después de la activación proteolítica de C3. El enlace activado de tioéster en C3 puede reaccionar con aminas primarias o hidroxilos cercanos, creando un enlace covalente entre C3 con una proteína o hidrato de carbono cercanos. Si dichos reactivos no se encuentran disponibles, el enlace tioéster simplemente es hidrolizado y los productos de la hidrólisis quedan inactivos. Este modo de acción asegura que C3 será depositado covalentemente tan solo en complejos antígeno-anticuerpo que se encuentren cercanos. De modo similar, también serán un objetivo las superficies que contengan lectinas unidas a manosas o que hayan recibido depósitos de C3 por la vía alternativa. Esto limita el efecto del complemento a superficies cercanas y se evita así el ataque inapropiado a células que no presenten el antígeno.

Independientemente de la vía de activación, los C3 activados disparan componentes terminales de la cascada del complemento, C5 a través de C9, lo que culmina en la formación del complejo de ataque a la membrana, el cual se inserta en la mayoría de las membranas biológicas y las convierte en permeables. Esto resulta en la pérdida de electrolitos y pequeños solutos que producen lisis y muerte celular de la célula diana. Siempre que se active el complemento, se formará un complejo de ataque a la membrana y producirá la muerte de la célula sobre la cual se deposite dicho complejo. El efecto microbicida directo de una cascada de activación del complemento es una función protectora importante.

Las tres vías de activación del complemento también generan los fragmentos de ruptura de C3a y C5a, que se unen a los receptores acoplados a proteínas G y realizan quimiotaxis positiva para neutrófilos y otras células involucradas en la inflamación (véase luego). Las tres vías también hacen que los fragmentos de C3 se depositen covalentemente sobre las estructuras diana del complemento. Las células fagocíticas utilizan estos marcadores derivados de C3 para reconocer, ingerir y destruir estas partículas marcadas, proceso denominado *opsonización*.

La cascada del complemento cumple así múltiples papeles en la defensa del huésped: puede destruir la membrana que envuelve al patógeno (virus, bacteria); puede marcar o señalar covalentemente los patógenos diana para que sean más fácilmente ingeridos por células fagocíticas capaces de matar al patógeno y presentar sus contenidos a células que iniciarán una respuesta inmunitaria adaptativa, y, finalmente la activación del complemento genera señales quimiotácticas



positivas para atraer células del sistema inmunitario innato (neutrófilos, macrófagos, células dendríticas) y adaptativo (linfocitos) al sitio de infección.

Células natural killer (NK) El sistema inmunitario proporciona defensas contra los virus, además de contra los invasores bacterianos. Cuando se detecta la presencia de una célula infectada por virus, otras células del sistema inmunitario se vuelven activas, buscan las células infectadas por virus y las matan. Por ejemplo, muchas células infectadas por virus producen **interferones tipo I**, efectivos en la activación de **células natural killer (NK)**. Las células NK activadas no solo proporcionan protección directa al eliminar la fabricación de nuevas partículas de virus, sino que también secretan interferón γ (IFN- γ), esencial para dirigir varios aspectos de la defensa antiviral (Fig. 23-5). El reconocimiento

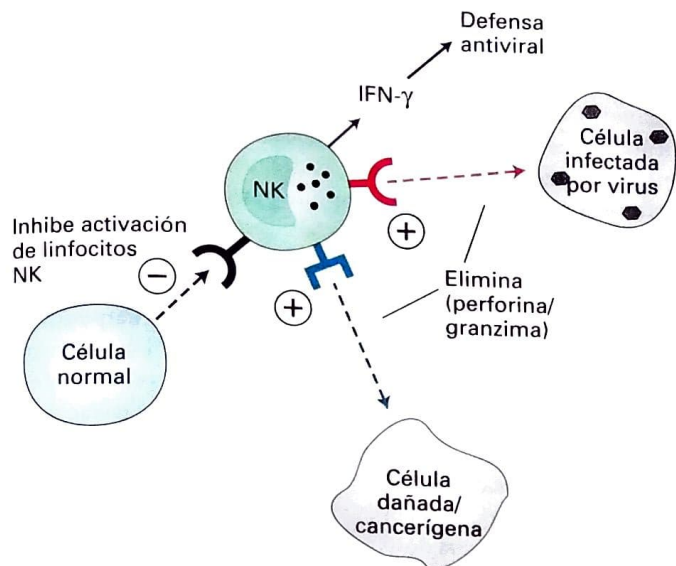


FIGURA 23-5 Células natural killer. Las células natural killer (NK) son una fuente importante del interferón γ (IFN- γ) y pueden destruir células infectadas con virus y células cancerígenas por medio de perforinas. Estas proteínas formadoras de poros permiten el acceso al citoplasma de las serina proteasas denominadas granzimas de la célula que va a ser eliminada. Las granzimas pueden también iniciar la apoptosis a través de la activación de caspasas (véase Cap. 12). Los receptores NK identifican células infectadas o dañadas y estimulan a las células NK a destruirlas. Otros receptores identifican a las células normales e inhiben la activación de células NK.

realizado por las células NK involucra varias clases de receptores, capaces de enviar señales de estimulación (lo que promueve la eliminación de la célula) o de inhibición. Los interferones se clasifican dentro de la familia de pequeñas proteínas citocinas secretadas que ayudan a regular la respuesta inmunitaria de modos variados. Durante el progreso del capítulo, nos encontraremos con otras citocinas y se analizarán algunos de sus receptores.

La inflamación es una respuesta compleja a las heridas e incluye la respuesta inmunitaria innata y la adaptativa

Cuando un tejido vascularizado es herido, la respuesta estereotipada que sigue es la **inflamación**. El daño puede ser simplemente el corte con una hoja de papel o el resultado de una infección por un patógeno. La inflamación, o respuesta inflamatoria, se caracteriza por cuatro signos clásicos: *rubor*, *tumefacción*, *calor* y *dolor*. Estos signos son causados por un aumento en el flujo sanguíneo (vasodilatación), la atracción de células al sitio de daño y la producción de mediadores solubles responsables de la sensación de calor y dolor. La inflamación tiene un valor de protección inmediato a través de la activación de tipos celulares y productos solubles que, juntos, llevarán a cabo la respuesta inmunitaria innata. Además, la inflamación crea un ambiente local que conducirá a la iniciación de la respuesta inmunitaria adaptativa. Sin embargo, si no es controlada correctamente, la inflamación puede ser una causa mayor de daño tisular.

La Figura 23-6 ilustra los componentes principales que intervienen en la respuesta inflamatoria a patógenos bacterianos y la subse-

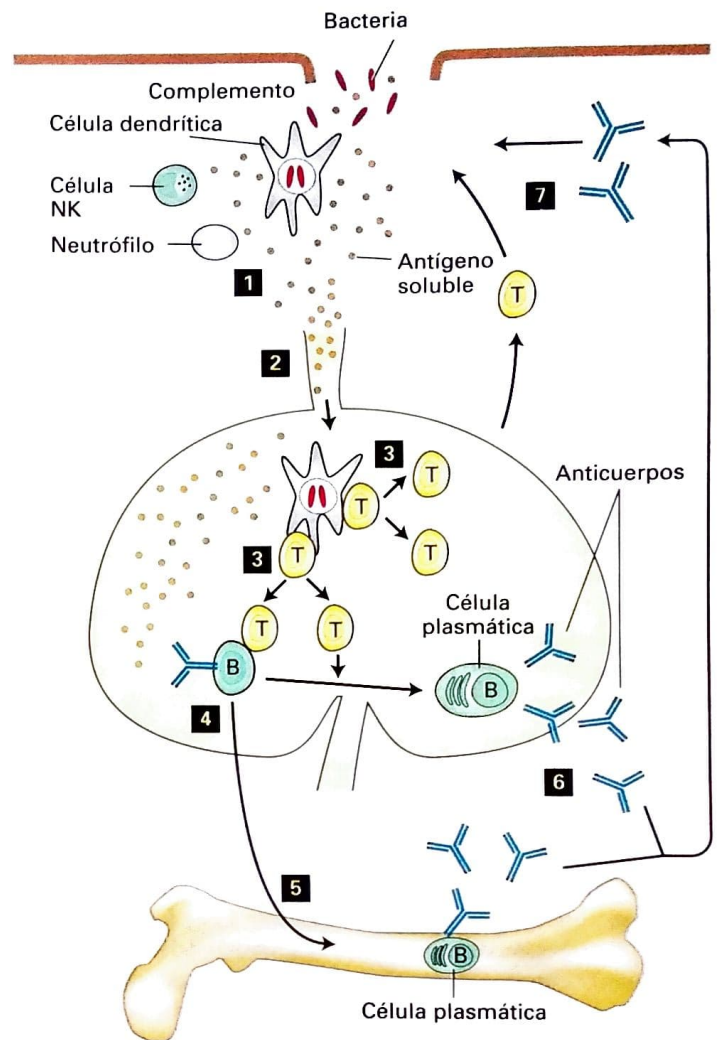


FIGURA 23-6 Interacción de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa contra una bacteria patógena. Una vez que la bacteria rompe las defensas mecánicas y químicas del huésped, la bacteria es expuesta a componentes de la cascada del complemento, como así también a células que brindan protección inmediata, como los neutrófilos (paso 1). Varios mediadores inflamatorios inducidos por el daño al tejido contribuyen a la respuesta inflamatoria local. La destrucción local de la bacteria resulta en la liberación de antígenos bacterianos, que son transportados por la vía linfática aferente hacia el drenaje del ganglio linfático (paso 2). Las células dendríticas en respuesta a los productos microbianos y se mueven al ganglio linfático, donde activan a los linfocitos T (paso 3). En el ganglio linfático, los linfocitos T, estimulados por el antígeno, proliferan y adquieren habilidades efectoras, incluyendo la habilidad de ayudar a los linfocitos B (paso 4), y algunos se moverán a la médula ósea y completarán su diferenciación en células plasmáticas (paso 5). En respuestas más tardías del sistema inmunitario, los linfocitos T activados proporcionan asistencia adicional a los linfocitos B que han experimentado el antígeno a producir células plasmáticas que secretarán a una tasa rápida anticuerpos específicos para el antígeno (paso 6). Los anticuerpos producidos como consecuencia de la exposición inicial a la bacteria actúan en sinergia con el complemento para eliminar la infección (paso 7) si persiste, o proporcionar una protección rápida en el caso de reexposición al mismo patógeno.

cuenta iniciación de la respuesta inmunitaria adaptativa. Las células dendríticas que residen en los tejidos detectan la presencia de patógenos a través de sus receptores tipo Toll (TLR) y responden liberando mediadores solubles como citocinas y **quimiocinas**; estas últimas funcionan como atractores químicos para las células del sistema inmunitario. Los **neutrófilos**, un segundo tipo celular importante en la respuesta inflamatoria, abandonan la circulación y migran hacia cualquier herida en un tejido o infección en respuesta a las citocinas y quimiocinas producidas en el tejido dañado. Los neutrófilos, que constituyen casi la mitad de todos los leucocitos en circulación, son fagocíticos e ingieren y destruyen directamente los patógenos bacterianos y micóticos. Los neutrófilos pueden interactuar con una gran variedad de macromoléculas derivadas de patógenos a través de sus receptores tipo Toll. La activación de estos receptores permite a los neutrófilos producir citocinas y quimiocinas, que luego atraerán más leucocitos (neutrófilos, macrófagos y, por último, linfocitos T y B) al área. Los neutrófilos activados pueden liberar enzimas destructoras de bacterias (p. ej.; lisozimas y proteasas), y también pequeños péptidos con actividad microbicida, denominados colectivamente *defensinas*. También, los neutrófilos activados pueden activar enzimas que producen aniones de superóxido y otras especies reactivas del oxígeno (véase Cap. 12, p. 541) que pueden eliminar microbios en un rango corto. Otro tipo celular que contribuye a la respuesta inflamatoria y reside en los tejidos son los *mastocitos* (o células cebadas). Cuando son activadas por una variedad de estímulos físicos o químicos, los mastocitos liberan histamina, un mediador que aumenta la permeabilidad vascular y así facilita el acceso de las proteínas del plasma (p. ej., el complemento) que pueden actuar contra el patógeno invasor.

Una respuesta temprana importante frente a una infección o una herida es la activación de una variedad de proteasas del plasma, incluidas las proteínas de la cascada del complemento discutidas previamente (véase la Fig. 23-4). Los péptidos producidos durante la activación de estas proteasas tienen actividad quimiotáctica, responsable de la atracción de neutrófilos al sitio de tejido dañado. Luego, inducen la producción de citocinas proinflamatorias como las interleucinas 1 y 6 (IL-1 e IL-6). El reclutamiento de neutrófilos depende también de un incremento en la permeabilidad vascular, controlada en parte por mediadores lipídicos (p. ej., prostaglandinas y leucotrienos) derivados de fosfolípidos y ácidos grasos. Todos estos eventos ocurren rápidamente, y comienzan minutos después de producida la herida. Si se fracasa en resolver la causa de esta respuesta inmediata, puede producirse una inflamación crónica, en la cual las células del sistema inmunitario adaptativo tienen un papel importante.

Cuando la carga de patógenos es alta en el sitio donde el tejido fue dañado, puede exceder las capacidades del sistema de defensas mecánicas innatas de luchar con él. A su vez, muchos patógenos han adquirido, en el curso de la evolución, herramientas para desarmar o evitar las defensas inmunitarias innatas. En dichas situaciones, se requiere que el sistema inmunitario adaptativo controle la situación. Esta respuesta adaptativa depende de células que incluyan la interfase entre la inmunidad innata y la adaptativa, incluyendo células presentadoras de antígenos como los macrófagos y células dendríticas, capaces de incluir patógenos intactos y matarlos después de ingerirlos. Estas células presentadoras de antígeno, en particular las dendríticas, pueden iniciar una respuesta inmunitaria adaptativa al transportar antígenos derivados de patógenos incluidos recientemente en los órganos linfoides secundarios (véase Fig. 23-6).

La inmunidad adaptativa, tercera línea de defensa, tiene especificidad

Inmunidad adaptativa es el término reservado para el reconocimiento altamente específico de sustancias extrañas, cuya elaboración completa requiere de días o semanas después de que haya ocurrido la exposición inicial. Los linfocitos que portan los receptores específicos de antígenos son las células clave responsables de la inmunidad adaptativa. Un indicador temprano de la naturaleza específica de la respuesta adaptativa provino del descubrimiento por Emil von Behring y Shibasaburo Kitasato en 1905 de los **anticuerpos**, moléculas efectoras claves en la inmunidad adaptativa. Ellos comenzaron transfiriendo suero (líquido de color trigo que se separa de los restos celulares después de completar el proceso de coagulación) de cobayas o conejillos de indias inmunizados con dosis subletales de la toxina de la enfermedad letal difteria a animales que no habían sido expuestos a la bacteria. Los animales que recibieron el suero estaban así protegidos contra una dosis letal de la misma bacteria (Fig. 23-7, izquierda). La transferencia de suero de animales que no habían sido expuestos a la toxina de difteria falló en la protección, que estaba limitada al microbio que producía la toxina de difteria. Este experimento demostró la *especificidad*, esto es, la habilidad de distinguir entre dos sustancias relacionadas, toxinas, de la misma clase. Dicha especificidad es distintiva del sistema inmunitario adaptativo. Incluso proteínas que difieran en un único aminoácido pueden diferenciarse por medios inmunológicos.

A partir de estos experimentos, von Behring infirió la existencia de corpúsculos (*Antikörper*), o anticuerpos, como el factor de transferencia responsable de la protección. El suero inmunitario que contenía anticuerpos no solo brindaba protección in vivo, sino que también mataba microbios en tubos de ensayo (Fig. 23-7, derecha). El calentamiento del suero inmune a 56 °C causaba destrucción de esta actividad capaz de matar, pero era restituida al agregar suero fresco no calentado de animales no expuestos al microbio. Este descubrimiento sugería que un segundo factor, ahora denominado complemento, actuaba en sinergia con los anticuerpos para matar las bacterias. Ahora sabemos que los anticuerpos de von Behring son proteínas séricas conocidas como **inmunoglobulinas** y que el complemento es una serie de proteasas descritas anteriormente que llevan a cabo la destrucción del patógeno (véase Fig. 23-4). Las inmunoglobulinas pueden neutralizar no solo toxinas de bacterias, sino también otros agentes dañinos como virus al unirse directamente a ellos de modo tal de prevenir que los virus se unan a células huésped. En este sentido, es posible administrar anticuerpos producidos contra veneno de serpiente a víctimas de mordeduras de serpientes para protegerlos contra la intoxicación: los anticuerpos antiveneno de serpiente impiden a la toxina que se una a las dianas en el huésped, y por lo tanto la neutralizan. Este proceso se conoce como inmunización pasiva, un procedimiento que salva vidas a través de la neutralización instantánea de sustancias dañinas como una toxina. Entonces, los anticuerpos pueden tener efectos de protección inmediata. Los avances médicos actuales permiten la supervivencia de individuos cuyos sistemas inmunitarios se encuentran gravemente comprometidos (pacientes con cáncer que reciben quimioterapia o irradiación, trasplantados con sistema inmunitario farmacológicamente suprimido, pacientes que padecen HIV/sida, individuos con deficiencias congénitas en sus sistemas inmunitarios); la inmunización pasiva es de importancia práctica inmediata.

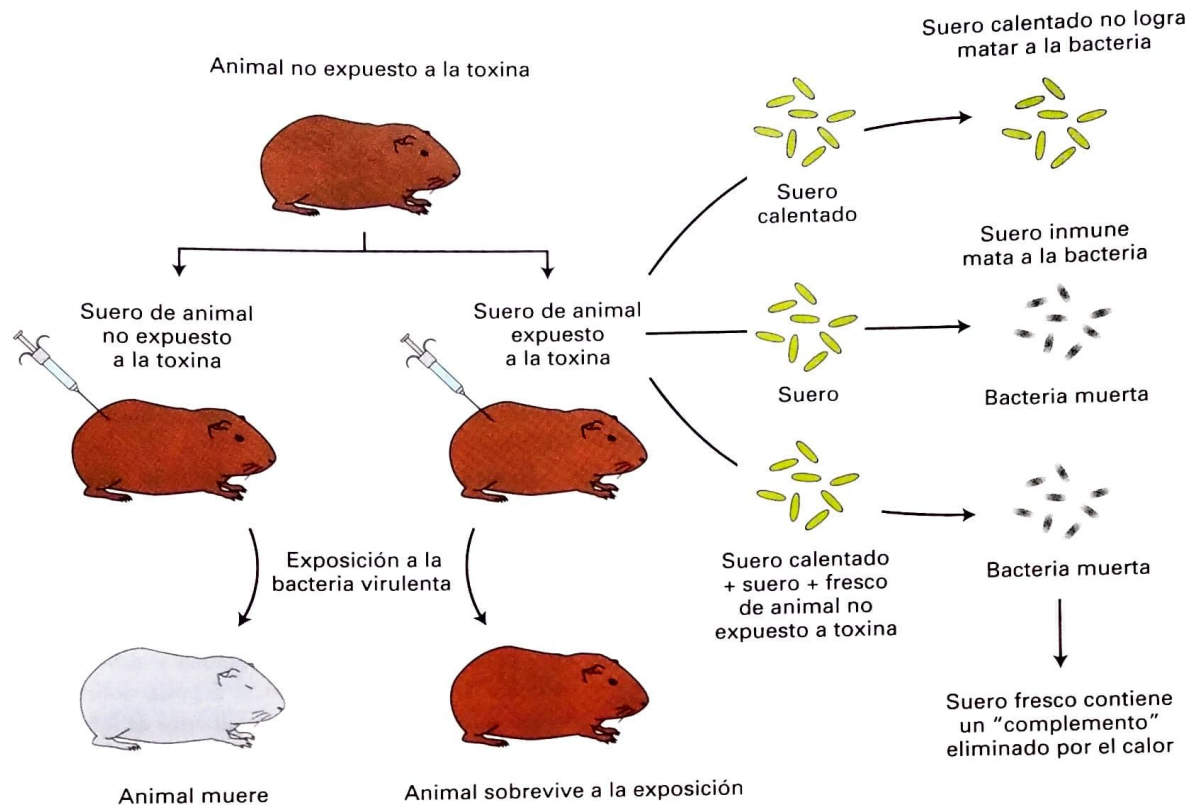


FIGURA EXPERIMENTAL 23-7 La existencia de anticuerpos en el suero de animales infectados fue demostrada por von Behring y Kitasato

La exposición de animales a dosis subletales de la toxina de difteria (o la bacteria que la produce) genera en el suero sustancias que protegen contra una exposición subsecuente a una dosis letal de la toxina (o la bacteria que la produce). El efecto protector de este suero puede ser transferido desde un animal que ha sido expuesto al patógeno hacia otro que no lo ha sido. Cuando el animal recibe el suero y es luego expuesto a una dosis letal de la bacteria, sobrevive. Este efecto es específico para el patógeno utilizado para generar

la respuesta. Así, el suero contiene una sustancia transferible (anticuerpos) que protegen contra los efectos dañinos de patógenos virulentos. El suero recolectado de estos animales, que se llama **inmune**, muestra actividad bactericida in vitro. El calentamiento del suero inmune destruye su actividad bactericida. La adición de suero de animales no expuestos al patógeno y que no ha sido calentado restablece la actividad bactericida del suero inmune calentado. Entonces, el suero tiene otra sustancia que complementa la actividad de los anticuerpos.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 23.1

Generalidades de la defensa del huésped

- Las defensas químicas y mecánicas brindan protección contra la mayoría de los patógenos. Esta protección es inmediata y continua, pero tiene poca especificidad. La inmunidad innata y la adaptativa proporcionan defensa contra los patógenos que logren romper con las barreras mecánicas y químicas del cuerpo (véase Fig. 23-1).
- El aparato circulatorio y el sistema linfático distribuyen los componentes moleculares y celulares de la inmunidad innata y adaptativa a través del cuerpo (véase Fig. 23-2).
- La inmunidad innata es mediada por el sistema del complemento (véase Fig. 23-4) y diversos tipos de leucocitos, de los cuales los más importantes son los neutrófilos y otras células fagocíticas como los

macrófagos y las células dendríticas. Las células y moléculas de la inmunidad innata son desplegadas rápidamente (minutos a horas). Los receptores tipo Toll pueden reconocer patrones moleculares diagnósticos de la presencia de patógenos, pero la especificidad de dicho reconocimiento es modesta.

- La inmunidad adaptativa es mediada por linfocitos T y B. Estas células requieren de algunos días para su activación completa y despliegue, pero pueden distinguir entre antígenos estrechamente relacionados. Esta especificidad en el reconocimiento de antígenos es la característica clave y distintiva de la inmunidad adaptativa.
- La inmunidad innata y la adaptativa actúan de modo sinérgico. La inflamación, una respuesta temprana a un daño en el tejido o a una infección, involucra una serie de sucesos que combinan elementos de la inmunidad innata y de la adaptativa (véase la Fig. 23-6).

23.2 Inmunoglobulinas: estructura y función

Las inmunoglobulinas, producidas por los linfocitos B, son las moléculas mejor conocidas que confieren inmunidad adaptativa. En esta sección describiremos la organización estructural general de las inmunoglobulinas, su diversidad estructural y cómo se unen a antígenos.

Las inmunoglobulinas han conservado una estructura que consiste en cadenas pesadas y ligeras

Al igual que el complemento, las inmunoglobulinas son proteínas del suero que pueden ser clasificadas según sus estructuras y propiedades funcionales. El fraccionamiento de antisueros, basado en su actividad funcional (p. ej., eliminación de microbios, unión a antígenos), condujo a la identificación de las inmunoglobulinas como la clase de proteínas séricas responsables de la actividad de anticuerpos. Las inmunoglobulinas están compuestas por dos *cadenas pesadas* (H, *heavy*) idénticas, unidas covalentemente a dos *cadenas ligeras* (L, *light*) idénticas (Fig. 23-8). Entonces, la inmunoglobulina típica tiene una estructura doble simétrica, descrita como H_2L_2 . Una excepción a esta arquitectura H_2L_2 ocurre en los camélidos (camellos, llamas, vicuñas). Estos animales pueden generar inmunoglobulinas que son dímeros de cadenas pesadas (H_2) y no tienen cadenas ligeras.

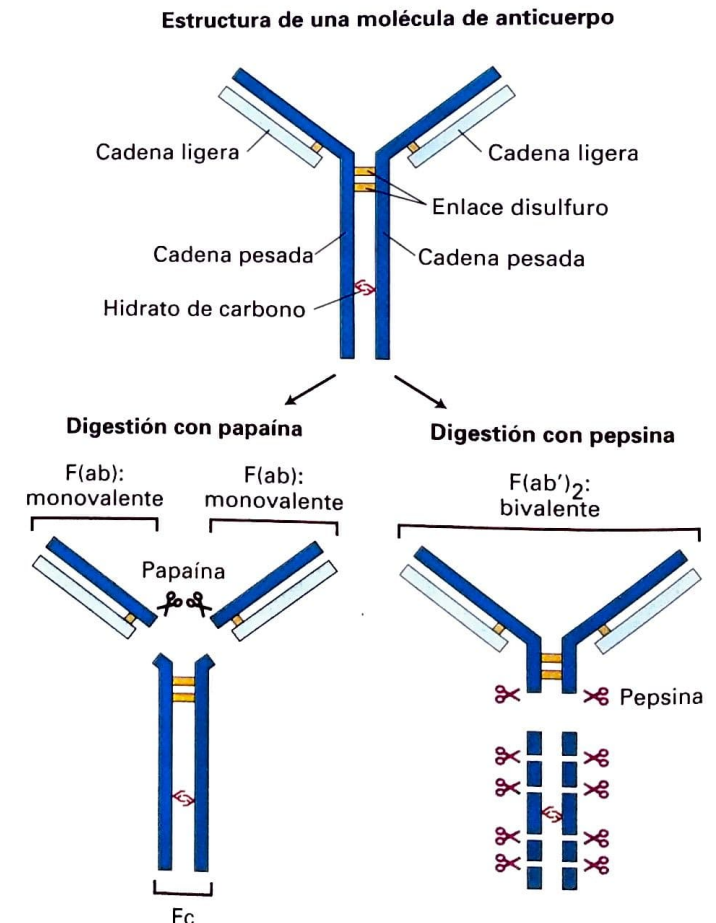
Se utilizó un enfoque bioquímico para responder la pregunta de cómo los anticuerpos logran distinguir entre antígenos afines y relacionados. Se utilizaron enzimas proteolíticas para fragmentar las inmunoglobulinas, que son proteínas relativamente grandes, a fin de identificar las regiones involucradas en la unión con el antígeno (véase Fig. 23-8). La proteasa papaína produce fragmentos monovalentes, denominados $F(ab)$, que pueden unirse a una sola molécula de antígeno, mientras que la proteasa pepsina produce fragmentos bivalentes, denominados $F(ab')_2$ (F = fragmento; ab = anticuerpo, *antibody*). Por lo general, estas enzimas se usan para convertir moléculas intactas de inmunoglobulinas en reactivos mono- o bivalentes. A pesar de que los fragmentos $F(ab)$ son incapaces de entrecruzarse con un antígeno, los $F(ab')_2$ sí pueden hacerlo, y esto es una propiedad frecuentemente utilizada para realizar entrecruzamiento y así activar receptores de superficie. Muchos receptores, como el EGF, forman dímeros después de la unión a un ligando, un requisito para una activación completa de la cascada de señalización. La porción liberada después de la digestión con papaína es incapaz de unirse a un antígeno y se denomina F_c por su facilidad para cristalizar (F = fragmento; C = cristizable). Después de este enfoque bioquímico que utilizó proteasas, se realizó un mapeo de los péptidos y estrategias de secuenciación para determinar la estructura primaria de las inmunoglobulinas.

FIGURA 23-8 La estructura básica de una molécula de inmunoglobulina. Los anticuerpos son proteínas del suero también conocidas como inmunoglobulinas. Su estructura doble simétrica está compuesta por dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas. La fragmentación de anticuerpos con proteasas produce fragmentos que retienen su capacidad de unión a antígenos. La proteasa papaína produce fragmentos monovalentes $F(ab)$, y la proteasa pepsina produce fragmentos bivalentes $F(ab')_2$. Los fragmentos F_c no pueden unirse al antígeno, pero esta sección de la molécula tiene otras propiedades funcionales.

Existen múltiples isotipos de inmunoglobulinas, cada uno con diferentes funciones

Las inmunoglobulinas se dividen en diferentes clases, o *isotipos*, según sus distintas propiedades bioquímicas. Existen dos isotipos de cadena ligera, κ y λ . Las cadenas pesadas son más variables: en mamíferos, la mayoría de isotipos de cadena pesada son μ , δ , γ , α y ϵ . Estas cadenas pesadas pueden asociarse con las cadenas ligeras κ o λ . Dependiendo de la especie de vertebrado, ocurren más divisiones para las cadenas α y γ , y los peces tienen un isotipo que no se encuentra presente en mamíferos. La inmunoglobulina (Ig) totalmente armada deriva su nombre de su cadena pesada: cadenas μ producen IgM; las cadenas α producen IgA; las γ producen IgG; las δ producen IgD y las cadenas ϵ producen IgE. La estructura general de los isotipos de las Ig está representada en la Figura 23-9. Por medio de características estructurales únicas de sus porciones F_c , cada uno de los distintos isotipos de Ig lleva a cabo funciones especializadas.

La molécula de IgM es secretada como un pentámero y estabilizada por medio de puentes disulfuro y una cadena adicional, la J. En su forma pentamérica, IgM tiene 10 sitios idénticos de unión a antígenos que permiten una interacción altamente ávida con superficies que despliegan el antígeno correspondiente (afín). La avidéz se define como la suma total de la *fuerza* de las interacciones (afinidad) de los sitios individuales de unión disponibles y el *número* de dichos sitios de unión. Después de que IgM se deposita sobre una superficie que lleva el antígeno, la molécula pentamérica de IgM asume una conformación que conduce a la activación de la cascada del complemento, un



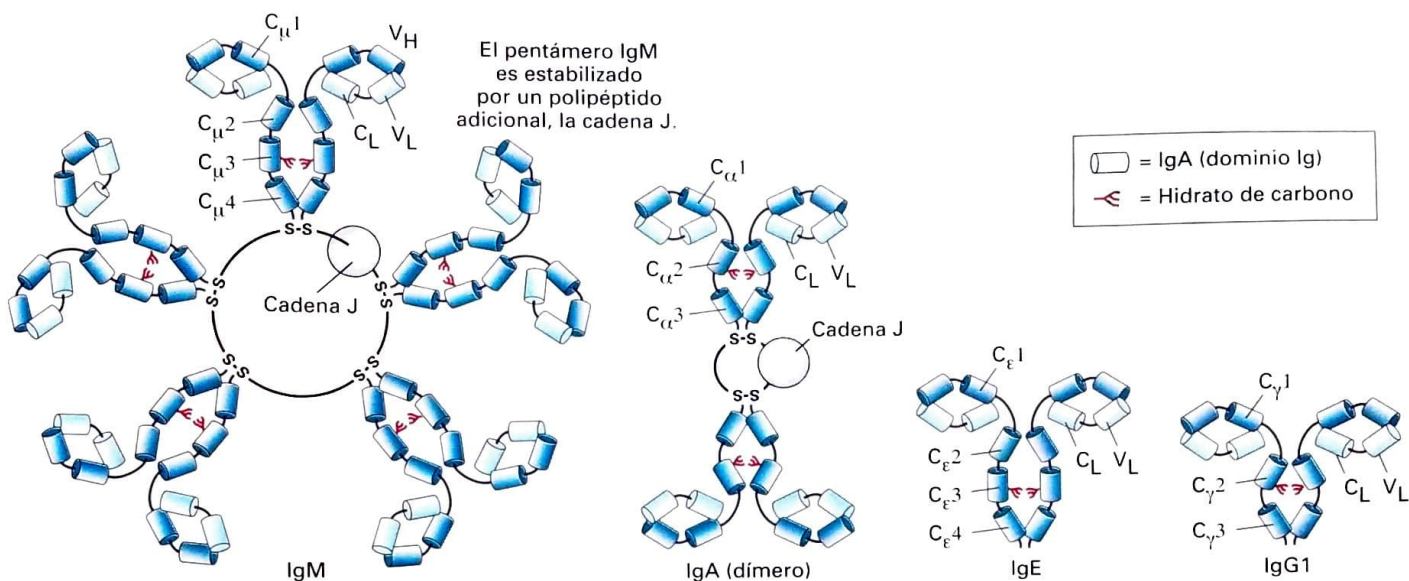


FIGURA 23-9 Isotipos de inmunoglobulinas. Las distintas clases de inmunoglobulinas, denominadas isotipos, pueden ser distinguidas bioquímicamente y por técnicas inmunológicas. En ratones y seres humanos, existen dos tipos de cadenas ligeras (κ y λ) y cinco tipos de cadenas pesadas (μ , δ , γ , α y ϵ). Basado en la identidad de la cadena pesada, cada isotipo define una clase inmunoglobulina. IgG, IgE e IgD (no se muestran) son monómeros con una estructura general similar. IgM e IgA son inusuales, ya

que pueden existir en el suero como pentámeros y dímeros, respectivamente, acompañadas por una unidad accesoria, la cadena J, en una unión covalente disulfúrica. La representación de volumen de las inmunoglobulinas resalta su diseño modular, cada barril representa un dominio individual Ig. Los diferentes isotipos tienen distintas funciones. Véase la Figura 23-12 para definiciones de las abreviaturas.

modo efectivo de dañar la membrana sobre la cual IgM se encuentra adsorbida y sobre la cual, en consecuencia, se depositarán proteínas del complemento.

La molécula IgA también interactúa con la cadena J, formando una estructura dímica. El dímero IgA puede unirse al receptor polimérico IgA que se encuentra en el lado basolateral de las células epiteliales, donde su unión resultará en una endocitosis mediada por receptor. Luego, el receptor IgA se rompe y el dímero IgA unido a un fragmento del receptor proteolítico (pieza secretora) es liberado desde el sitio apical de la célula epitelial. Este proceso, denominado **transcitosis**, es un modo efectivo para transportar inmunoglobulinas desde el lado basolateral de un epitelio hacia el lado apical (Fig. 23-10a). El líquido lagrimal y otras secreciones son ricas en IgA y así proporcionan protección contra patógenos del ambiente.

El isotipo IgG es importante para la neutralización de partículas virales. Este isotipo también ayuda a preparar partículas de antígeno para que sean adquiridas por células equipadas con receptores específicos para la porción Fc de moléculas IgG (véase luego).

El sistema inmunitario de los recién nacidos es inmaduro, y los mamíferos transfieren anticuerpos protectores de la madre al feto a través de la leche materna. El receptor responsable de capturar los IgG maternos es el receptor Fc neonatal (FcRn), que se encuentra presente en las células del epitelio intestinal en roedores. Por transcitosis, los IgG capturados en el lado luminal del tracto intestinal son transportados a través del epitelio intestinal para que estos anticuerpos de la leche se encuentren disponibles a fin de brindar protección pasiva al roedor lactante (Fig. 23-10b). En los seres humanos, el FcRn se halla en las células fetales en contacto con la circulación materna en la placenta. La transcitosis de anticuerpos IgG de la circulación materna a través de la placenta transporta los anticuerpos maternos

al feto. Estos anticuerpos maternos protegerán al recién nacido hasta que su sistema inmunitario sea lo suficientemente maduro para producir sus propios anticuerpos. En adultos, el FcRn se encuentra expresado también en células endoteliales y ayuda a controlar la cantidad de IgG resultante en la circulación.

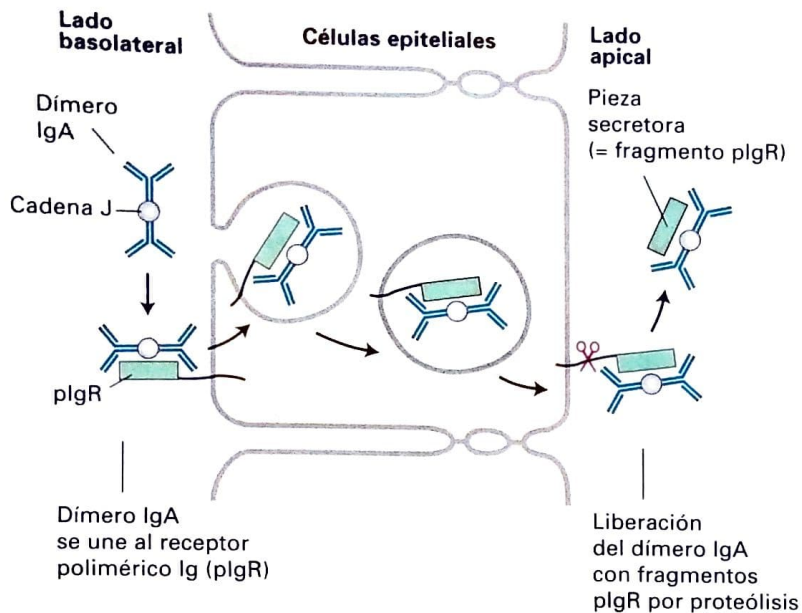
Como veremos en la Sección 23.3, los isotipos IgM e IgD son expresados como receptores unidos a la membrana de linfocitos B, en linfocitos B recién generados. Allí, las cadenas μ tienen un papel importante en el desarrollo y activación de los linfocitos B.

Cada linfocito B produce una única inmunoglobulina, generada clonalmente

La *teoría de selección clonal* postula que cada linfocito tiene un receptor de unión a antígeno con especificidad única. Cuando un linfocito se encuentra con el antígeno para el cual es específico, ocurre expansión clonal (división celular rápida) que permite una amplificación de la respuesta, lo que culmina en la eliminación del antígeno (Fig. 23-11). En una respuesta inmunitaria típica, el antígeno que genera la respuesta tiene una composición compleja: incluso el virus más simple contiene varias proteínas distintas. Varios linfocitos individuales responderán a un antígeno dado y expandirán su respuesta, y cada uno producirá su propio receptor de antígeno con su estructura única y generará así características de unión únicas (afinidad). Debido a que cada linfocito se encuentra dotado de un único receptor y la clonación se genera en respuesta al antígeno, esta respuesta se denomina *policlonal*.

Los tumores de linfocitos B, que representan expansiones clonales malignas de linfocitos individuales, permitieron el primer análisis molecular de los procesos que se encuentran detrás de la generación

(a)



Activación de linfocito B

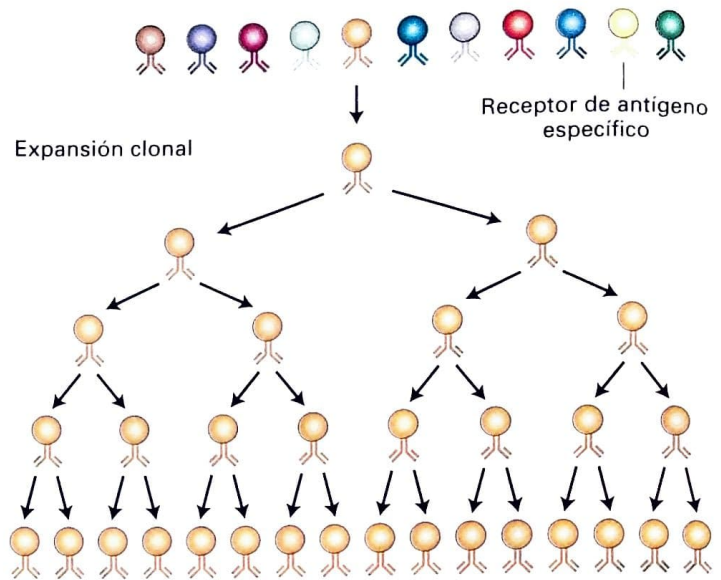


FIGURA 23-11 Selección clonal. La teoría de selección clonal propone la existencia de una gran cantidad de linfocitos, cada uno equipado con un único receptor de antígeno específico (indicado por los diferentes colores). El antígeno que se une con el receptor de un linfocito en particular permitirá que ese linfocito se expanda clonalmente. A partir de un modesto número de células específicas de un antígeno, puede generarse un gran número de células de la especificidad deseada (y grandes cantidades de sus secreciones).

(b)

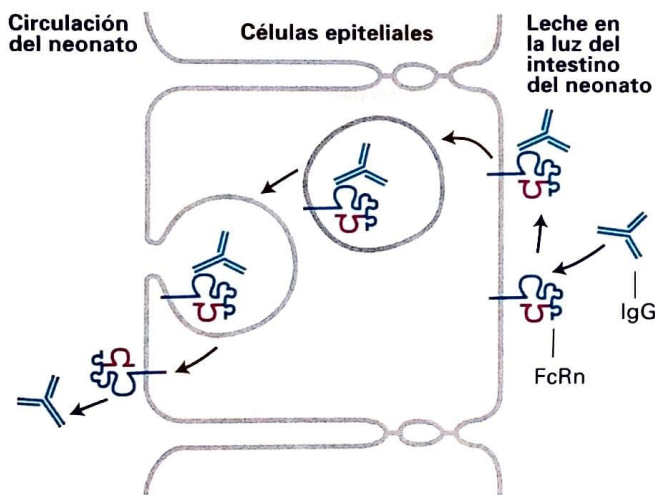


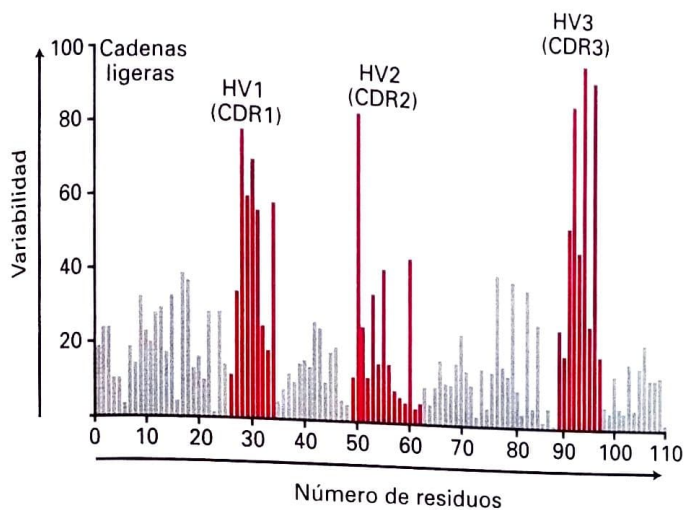
FIGURA 23-10 Transcitosis de IgA e IgG. (a) IgA, hallada en las secreciones de distintas mucosas, requiere del transporte a través del epitelio. IgA se une al receptor IgA polimérico y es endocitada. Después de ser transportada a través de una capa de epitelio, una porción del receptor se parte y se libera IgA del lado apical junto con una porción del receptor, la pieza secretora. (b) Los roedores que se alimentan de leche materna adquieren Ig a partir de ella. Los recién nacidos tienen receptores F_c (FcRn) en la superficie apical del epitelio intestinal, cuya estructura se parece a la de las moléculas MHC clase I (véase Fig. 23-21). Después de que este receptor se une a la porción F_c de IgG, la transcitosis mueve el IgG adquirido al lado basolateral del epitelio. En seres humanos, el sincitiotrofoblasto en la placenta expresa FcRn y media así la adquisición de IgG de la circulación materna y la transporta al feto (transporte transplacentario).

de diversidad de anticuerpos. Una observación clave fue que los tumores derivados de los linfocitos producían grandes cantidades de inmunoglobulinas secretadas. Algunas de las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas son secretadas en la orina de los pacientes portadores de tumores. Estas cadenas ligeras, denominadas *proteínas Bence-Jones* por sus descubridores, ya han sido purificadas y son el primer objetivo del análisis químico proteico.

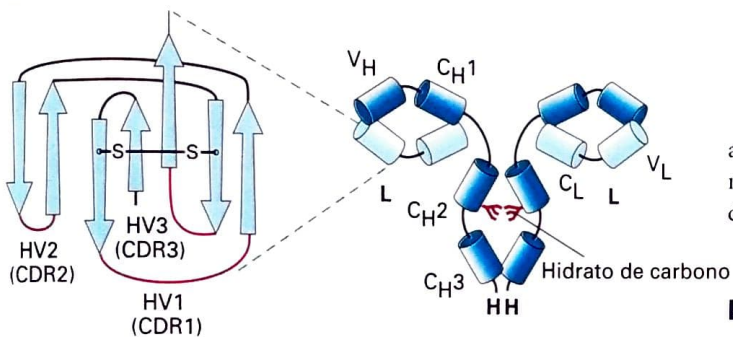
De este trabajo resultaron dos observaciones fundamentales: (1) no hubo dos tumores que produjeran cadenas ligeras con iguales propiedades bioquímicas, lo cual sugirió que todas eran únicas en su secuencia; (2) las diferencias en la secuencia de aminoácidos que distinguía una cadena ligera de otra no se encontraban distribuidas al azar, sino juntas dentro de un dominio denominado *región variable de la cadena ligera*, o V_L . Este dominio incluye la terminal N ≈ 110 aminoácidos. El remanente de la secuencia es idéntico para las diferentes cadenas ligeras (siempre que deriven de un isotipo idéntico, κ o λ) y se denomina *región constante*, o C_L . A partir del suero de individuos portadores de tumores, se purificaron inmunoglobulinas únicas de cada paciente individual. La secuenciación de las cadenas pesadas de estas preparaciones reveló que la variable residual que distingue una cadena pesada de otra se encontraba también concentrada en un dominio específico, conocido como la *región variable de la cadena pesada*, o V_H .

Un alineamiento de secuencias obtenidas de distintas preparaciones homólogas de cadena ligera demostró un patrón no aleatorio de regiones de variabilidad, y reveló tres *regiones hipervariables* (HV1, HV2 y HV3), las cuales se encuentran rodeadas por lo que

(a)



(b)



se denominan regiones marco (Fig. 23-12a) (Alineamientos similares de secuencias de cadena pesadas de inmunoglobulinas también producen regiones hipervariables). En la estructura tridimensional plegada de las inmunoglobulinas, estas regiones hipervariables se encuentran muy próximas entre sí (Figs. 23-12b y 23-13) y realizan contacto con el antígeno. Entonces, la porción de una molécula de Ig que contiene las regiones hipervariables constituye el sitio de unión al antígeno. Es por ello que las regiones hipervariables son conocidas también como *región determinante de la complementariedad* (CDR, *complementarity-determining regions*).

La dificultad de codificar en la línea germinal toda la información necesaria para generar esta enorme diversidad de anticuerpos sugirió la posible existencia de mecanismos genéticos únicos que explicaran esta diversidad. Tal vez se requieran tanto como un millón de anticuerpos diferentes de especificidad única para tener una protección suficiente contra la multitud de patógenos que enfrentamos durante nuestra vida, aunque dicha estimación es solo una conjetura. Dado el tamaño de una cadena pesada y una ligera de un anticuerpo típico (cada combinación de cadena pesada y cadena ligera, si es codificada como tal, requeriría $\approx 2,5\text{-}3,5$ kb, dependiendo del isotipo), es obvio que un organismo agotaría la capacidad de codificación del DNA para codificar un conjunto de anticuerpos lo suficientemente variable para proporcionar una protección adecuada contra una amplia gama de patógenos y otras sustancias extrañas

FIGURA 23-12 Regiones hipervariables y el plegamiento de la inmunoglobulina. (a) Variación en la variabilidad de aminoácidos con posición residual en la cadena ligera de Ig. Se representa el porcentaje de secuencias de región variable con aminoácidos variables para cada posición de la secuencia. A las posiciones para las cuales se encuentran presentes muchos aminoácidos diferentes se les asignan índices de variabilidad altos; a aquellas que no varían entre distintas secuencias comparadas se les asigna un valor de 0. Este análisis revela tres regiones de alta variabilidad, las regiones hipervariables (HV) 1, 2 y 3, denominadas también regiones determinantes de la complementariedad (CDR). (b) Representación tridimensional de un fragmento $F(ab')_2$ (derecha) y un diagrama de cinta de un dominio de cadena ligera variable de un Ig típico (V_L) con las posiciones de las regiones hipervariables indicadas en rojo (izquierda). Las regiones hipervariables se encuentran en los bucles que conectan las hebras β y realizan contacto con el antígeno. Las hebras β (reproducidas con flechas) conforman dos láminas β y constituyen la región marco. Nótese que cada variable y dominio constante tiene una estructura tridimensional característica, denominada plegamiento de la inmunoglobulina. L = cadena ligera; H = cadena pesada; V_H = dominio variable de la cadena pesada; V_L = dominio variable de la cadena ligera; C_H1 , C_H2 , C_H3 = dominios constantes de la cadena pesada; C_L = dominio constante de la cadena ligera.

a las que el organismo se expondrá. Veremos que, en efecto, existen mecanismos únicos para crear un conjunto adecuadamente variado de anticuerpos.

Los dominios de las inmunoglobulinas tienen pliegues característicos compuestos por dos láminas β estabilizadas por un puente (enlace) disulfuro

Ambos dominios de las inmunoglobulinas, variable y constante, se pliegan en una estructura tridimensional compacta compuesta exclusivamente por láminas β (véase la Fig. 23-12b). Un dominio de Ig típico contiene dos láminas β (una con tres hebras y otra con cuatro) unidas por un puente disulfuro. Los residuos orientados hacia adentro son los más hidrófobos y ayudan a estabilizar esta estructura tipo "sándwich". Los residuos expuestos a solventes muestran una mayor frecuencia de polaridad y lados de cadena cargados. El espaciamiento de los residuos de cisteína que conforman el puente disulfuro y un pequeño número de residuos muy conservados caracterizan esta disposición estructural evolutivamente antigua, denominada **plegamiento de inmunoglobulinas**. El plegamiento básico de inmunoglobulinas se encuentra en un número de proteínas eucariotas que no están involucradas directamente en el reconocimiento de antígenos específicos, incluyendo la superfamilia Ig de moléculas de adhesión celular o IgCAM (*cell-adhesion molecules*, Cap. 20).

La región del antígeno que realiza contacto con el anticuerpo correspondiente se denomina **epítipo**. Un antígeno proteico contiene usualmente múltiples epítipos, los cuales por lo general se encuentran en bucles o superficies de la proteína y son así accesibles a las moléculas de anticuerpos. Cada preparación de anticuerpos homogéneos, derivados de una población clonada de linfocitos B, reconoce un único epítipo definido molecularmente sobre el antígeno correspondiente.

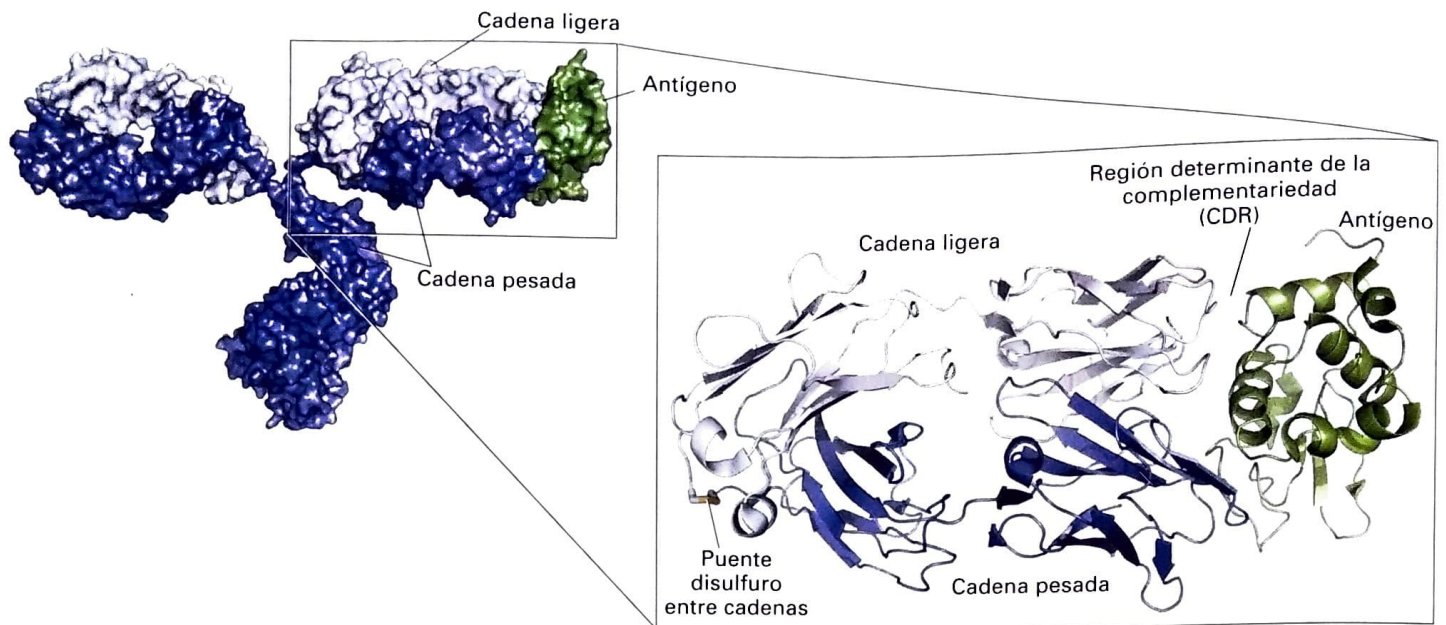


FIGURA 23-13 Estructura de la inmunoglobulina. Este modelo muestra la estructura tridimensional de una inmunoglobulina que forma un complejo con

lisozima de huevo blanco de gallina (un antígeno proteico) determinado por cristalografía de rayos X. (Basado en E.A. Padlan y cols., 1989 *Proc. Natl Acad. Sci USA* **86**:5938)

Para resolver la estructura de un complejo de anticuerpo y su epítipo afín sobre el antígeno, es importante tener una fuente de inmunoglobulinas homogéneas y el antígeno en su forma pura. Las inmunoglobulinas homogéneas pueden obtenerse de tumores de linfocitos B (expansiones monoclonales malignas de linfocitos B que secretan inmunoglobulinas), pero en este caso no se conoce el antígeno para el cual el anticuerpo es específico. El descubrimiento esencial para generar preparados de anticuerpos homogéneos adecuados a fin de realizar un análisis estructural fue el desarrollo de técnicas para obtener **anticuerpos monoclonales** producidos por **hibridomas** en un medio de selección especial (véase Cap. 9, pp. 402-404). La creación de líneas celulares inmortales que producen anticuerpos de una especificidad definida (anticuerpos monoclonales) ha brindado herramientas esenciales para los biólogos moleculares: los anticuerpos monoclonales son ampliamente utilizados para la detección específica de macromoléculas y sus modificaciones. Los anticuerpos monoclonales pueden detectar proteínas y sus modificaciones (fosforilación, nitrosilación, metilación, acetilación, etc.), complejos de hidratos de carbono (gluco), lípidos, ácidos nucleicos y sus modificaciones, y se han convertido así de gran utilización en laboratorios y también para propósitos de diagnóstico.

Ahora tenemos un conocimiento detallado de la estructura de un gran número de anticuerpos monoclonales en complejo junto al antígeno para el cual son específicos. No existen reglas cortas y simples que describan estas interacciones, además de las reglas comunes que se aplican a la interacción entre proteínas y otras (macro) moléculas (véase Cap. 3). Las CDR realizan las contribuciones más importantes a la interfase antígeno-anticuerpo, con un papel particularmente predominante de CDR3 en la cadena pesada de Ig, seguido por CDR3 en la cadena ligera de Ig. Se describirá luego cómo se establece la diversidad en CDR.

La región constante de una inmunoglobulina determina sus propiedades funcionales

Los anticuerpos reconocen a los antígenos a través de sus regiones variables, pero sus regiones constantes determinan gran cantidad de propiedades funcionales. Una propiedad funcional importante de los anticuerpos es la capacidad neutralizadora. Al unirse a los epítopos en la superficie de partículas de virus o bacterias, los anticuerpos pueden bloquear una interacción productiva entre el patógeno y la célula huésped, y así inhibir (neutralizar) la infección.

Los anticuerpos unidos a un virus o a una superficie microbiana pueden ser reconocidos directamente por células que expresan receptores específicos para las porciones Fc de las inmunoglobulinas. Estos **receptores Fc** (FcR), específicos para clases individuales o subclases de inmunoglobulinas, exhiben una heterogeneidad estructural y funcional considerable. Por medio de eventos dependientes de FcR, células fagocíticas especializadas como células dendríticas y macrófagos pueden unirse a partículas marcadas por anticuerpos, y luego ingerirlas y destruirlas en el proceso de opsonización. Los eventos dependientes de FcR también permiten que algunas células del sistema inmunitario (p. ej., monocitos y células NK) puedan unirse directamente a células específicas que exhiban partículas virales u otros antígenos a los cuales se hayan unidos los anticuerpos. Esta unión puede inducir a las células del sistema inmunitario a liberar pequeñas moléculas tóxicas (p. ej., radicales de oxígeno) o los contenidos de gránulos citotóxicos, incluyendo perforinas y granzimas. Estas proteínas pueden unirse a la superficie de la célula diana, infligir daño en la membrana y así matarla (véase la Fig. 23-5). Este proceso, denominado *citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos*, ilustra cómo las células del sistema inmunitario innato interactúan con, y se benefician de, los productos del sistema inmunitario adaptativo.

Según del isotipo de la inmunoglobulina, el complejo antígeno-anticuerpo puede iniciar la vía clásica de activación del complemento (véase Fig. 23-4). IgM e IgG3 son particularmente eficaces en la activación del complemento, pero todas las clases de IgG pueden en principio activar el complemento, mientras que IgA e IgE no pueden.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 23.2

Inmunoglobulinas: estructura y función

- La mayoría de las inmunoglobulinas (anticuerpos) están compuestas por dos cadenas pesadas (H) idénticas y dos cadenas ligeras (L) idénticas, cada una con una región variable (V) y otra constante (C). La fragmentación proteolítica produce fragmentos monovalentes F(ab) y fragmentos bivalentes F(ab)₂, que contienen un dominio de región variable y retienen la capacidad de unirse al antígeno (véase Fig. 23-8). La porción Fc contiene el dominio de región constante y determina las funciones efectoras.

- Las inmunoglobulinas se dividen en clases según las regiones constantes de las cadenas pesadas que tengan (véase Fig. 23-9). En mamíferos existen 5 grandes clases: IgM, IgD, IgG, IgA e IgE; las cadenas pesadas correspondientes son μ , δ , γ , α y ϵ . Existen dos clases grandes de cadenas ligeras, κ y λ , también caracterizadas por los atributos de sus regiones constantes.

- Cada secuencia individual de linfocito B expresa una secuencia única de inmunoglobulina y es entonces específico para una única partícula de antígeno. Después del reconocimiento del antígeno, solo un linfocito B que lleve un receptor específico para este será activado y se extenderá clonalmente (selección clonal) (véase la Fig. 23-11).

- La especificidad para antígenos en los anticuerpos es conferida por los dominios variables, que contienen regiones de hipervariabilidad, llamadas regiones hipervariables o determinantes de la complementariedad (véase la Fig. 23-12a). Estas regiones hipervariables se localizan en los extremos del dominio variable, donde pueden realizar contactos específicos con los antígenos para los cuales el anticuerpo es específico.

- Los dominios repetitivos que forman la molécula de inmunoglobulina tienen estructura tridimensional, el plegamiento de la inmunoglobulina consiste en dos láminas β plegadas unidas por un puente disulfuro (véase Fig. 23-12b). El plegamiento de la inmunoglobulina está ampliamente distribuido en la evolución y se encuentra en muchas otras proteínas además de los anticuerpos, incluyendo una clase importante de moléculas de adhesión celular.

- Las regiones constantes dotan a los anticuerpos de propiedades funcionales únicas o funciones efectoras, como la capacidad de unirse al complemento, la habilidad de ser transportados a través del epitelio, o de interactuar con receptores específicos para la porción Fc de las inmunoglobulinas.

23.3 Generación de diversidad de anticuerpos y desarrollo de linfocitos B

Los patógenos tienen tiempos de replicación cortos, son relativamente diversos en su composición genética, evolucionan con rapidez y generan aún más variación antigénica. Una defensa adecuada debe ser capaz de montar una respuesta igualmente diversa. Los anticuerpos cumplen dicha función. Los tiempos para la respuesta de los anticuerpos y los ajustes necesarios a cambios en la composición de los patógenos en cuestión imponen demandas únicas en la regulación y organización del sistema inmunitario adaptativo. La capacidad de codificación del genoma de un vertebrado típico no podría codificar el gran número de anticuerpos necesarios para una protección adecuada contra la diversidad de microbios a los que el huésped se expone. Un mecanismo único evolucionó para permitir no solo una variabilidad ilimitada en el repertorio de anticuerpos, sino también a fin de posibilitar un ajuste rápido de la calidad de los anticuerpos que se producen para satisfacer las demandas de un despliegue de virus o infección de bacterias. Debido a que una producción óptima de anticuerpos requiere de la asistencia de linfocitos T, veremos que los mecanismos moleculares subyacentes a la diversidad de receptores son fundamentalmente similares para linfocitos B y T.

Los linfocitos B, responsables de la producción de anticuerpos, utilizan un mecanismo único por el cual la información genética requerida para la síntesis de las cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulinas es combinada con elementos de una secuencia de DNA separada, o segmentos de gen Ig, para crear una unidad transcripcional funcional. El acto de recombinación que combina segmentos genéticos de Ig expande de forma dramática la variabilidad de la secuencia precisamente donde estos elementos genéticos son unidos. Este mecanismo de generación de una gama diversa de anticuerpos es en esencia diferente de una recombinación meiótica, que ocurre solamente en las células germinales, y del empalme alternativo (*alternative splicing* en inglés) de exones (Cap. 8). Como este mecanismo de recombinación ocurre en células somáticas pero no en las germinales, es conocido como *nueva ordenación genética somática* o *recombinación somática*. Este mecanismo de recombinación poco usual, único a los receptores de antígeno en los linfocitos B y T, hace posible especificar un conjunto enormemente diverso de receptores con un gasto mínimo de espacio de codificación en el DNA. La habilidad de combinar a voluntad elementos genéticos discretos (diversidad de combinación), en adición a la generación de más diversidad de secuencias codificadas por receptores por el mecanismo de recombinación de ellos mismos, permite una respuesta inmunitaria adaptativa contra un número virtualmente ilimitado de antígenos, incluyendo moléculas codificadas por el huésped.

Entonces, existen en funcionamiento mecanismos que no solo crean esta enorme diversidad, sino también procesos que imponen tolerancia para disminuir una reactividad no deseada contra componentes “propios”; el resultado de dicha reactividad es la autoinmunidad. Ningún mecanismo es perfecto: el sistema inmunitario no puede generar receptores para detectar *todas* las sustancias extrañas. Además, el inevitable precio que pagamos por *cómo* generamos los receptores de linfocitos B y T es la probabilidad de que los receptores sean autorreactivos (autoinmunidad).

Un gen de cadena ligera funcional requiere el ensamblaje de segmentos genéticos V y J

No existen genes de inmunoglobulinas que codifiquen inmunoglobulinas intactas ya ensamblados. En cambio, los segmentos genéticos requeridos son reunidos y ensamblados en el curso del desarrollo de los linfocitos B (Fig. 23-14). A pesar de que el nuevo orden de genes de las cadenas pesadas precede al de los genes de cadenas ligeras, analizaremos los genes de cadena ligera primero porque su organización es menos compleja.

Las cadenas ligeras de inmunoglobulinas están codificadas por grupos de segmentos genéticos V, seguido a cierta distancia corriente abajo por un único segmento C. Cada segmento genético V porta su propia secuencia de promotor y codifica la mayoría de la región variable de la cadena ligera, aunque una pequeña secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera falta en el segmento V. Esta porción ausente es proporcionada por uno de los múltiples segmentos J localizados entre los segmentos V y el único segmento C en el loci reordenado de cadena ligera κ (véase Fig. 23-14a). Este segmento J es un elemento genético que no debe confundirse con la cadena J, una subunidad polipeptídica de la molécula pentamérica IgM y que se encuentra también asociada con IgA (véase Fig. 23-9). En el curso del desarrollo de las linfocitos B, el compromiso con un segmento genético V en particular, un proceso aleatorio, resulta en su yuxtaposición con uno de los segmentos J, también por elección al azar, y se forma un exón que codifica toda la región variable de la cadena ligera (V_L). El acto de la recombinación no solo genera un gen intacto y funcional de cadena ligera, sino que también coloca la secuencia promotora del gen reordenado dentro de una distancia que puede ser controlada por elementos

potenciadores, localizados corriente abajo del exón de región constante de cadena ligera, requerido para su transcripción. Se transcribe solo un gen reordenado de cadena ligera.

Secuencias señal de recombinación El análisis detallado de la secuencia de loci de cadena ligera y cadena pesada reveló un elemento de secuencia conservado al final 3' de cada segmento V. Este elemento conservado, denominado secuencia señal de recombinación (RRS, recombination signal sequence), está compuesto por secuencias heptaméricas y nonaméricas separadas por un espaciador de modo conservado. Al final 5' de cada elemento J, hay un RRS conservado (Fig. 23-15a). Los espaciadores de 12 y 23 pares de bases separan las secuencias heptaméricas y nonaméricas conservadas por uno y dos giros de la hélice de DNA, respectivamente.

La recombinación somática está catalizada por las recombinasas RAG1 y RAG2, que se expresan solamente en linfocitos. La yuxtaposición de dos segmentos genéticos para ser unidos es estabilizada por el complejo RAG1/RAG2 (Fig. 23-15b). Luego, las recombinasas realizan un corte en cada cadena en el límite exacto de cada secuencia de codificación y su RSS adyacente. Solo los segmentos genómicos que posean RSS heptaméricas y nonaméricas con espaciadores de distintas longitudes pueden participar en este tipo de reorganización (la denominada regla 12/23 de la recombinación). Cada grupo -OH nuevo, que es creado en el sitio de escisión ejecuta luego un ataque nucleofílico a la hebra complementaria, y crea así una horquilla cerrada covalentemente para cada uno de los dos finales codificadores, y la doble hebra se corta al final de la RRS. Los complejos proteicos que incluyen a las proteínas Ku70 y Ku80

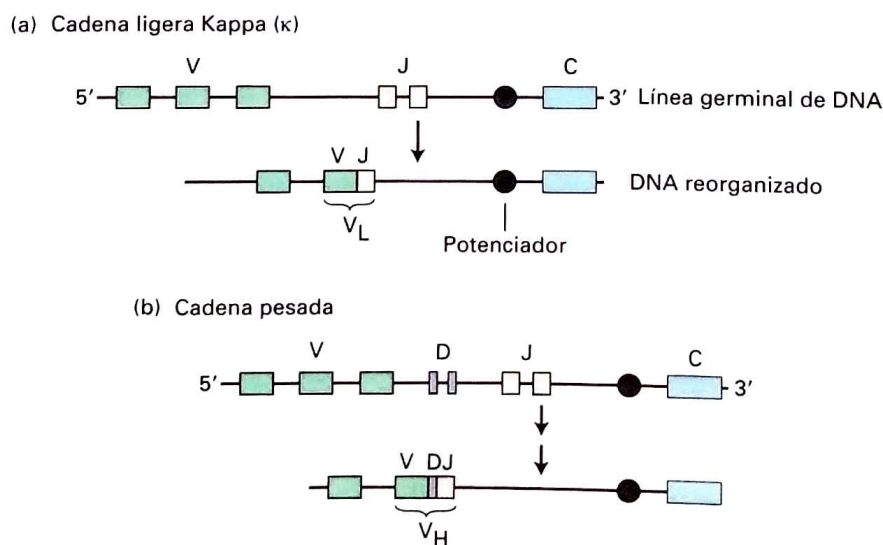


FIGURA 23-14 Visión general de la reorganización genética de DNA de inmunoglobulina. Las células madre que dan origen a los linfocitos B contienen múltiples segmentos genéticos que codifican porciones de las cadenas ligeras y pesadas de las inmunoglobulinas. Durante el desarrollo de un linfocito B, la recombinación somática de estos segmentos genéticos produce genes funcionales de cadena ligera (a) y de cadena pesada (b). Cada segmento genético V porta su propio promotor. El reordenamiento trae un potenciador lo suficientemente cerca para ser combinado con la secuencia y

activar la transcripción. La región variable de la cadena ligera (V_L) es codificada por dos segmentos genéticos unidos, y la región variable de la cadena pesada (V_H) es codificada por tres segmentos unidos. Obsérvese que las regiones cromosómicas que codifican inmunoglobulinas pueden contener muchos más segmentos V, D y J que los que se muestran. Además, el loci de cadena ligera κ contiene varios segmentos C distintos (no se muestran) que corresponden a los isotipos de inmunoglobulinas.

mantienen este complejo junto, de modo tal que los extremos finales por ser unidos permanezcan cerca: los roturas de la doble cadena en cromosomas deben ser reparados, y es por ello que los extremos deben permanecer cercanos para resolución y reparación de estos rompimientos. Luego, los extremos de las RRS son unidos covalentemente sin la pérdida ni el agregado de nucleótidos, lo que crea un producto de reacción circular (círculo de eliminación) que contiene el DNA interpuesto, el cual se pierde por completo del loci. Finalmente, los extremos de la horquilla de los segmentos codificadores bajo recombinación son abiertos y se unen, como se representa en la Figura 23-15c, y se completa así el proceso de recombinación.

El mecanismo de recombinación recién descrito, denominado *unión por delección*, ocurre cuando un segmento genético V involucrado tiene la misma orientación transcripcional que otro segmento genético en el loci de cadena ligera. Sin embargo, algunos otros segmentos V tienen una orientación transcripcional opuesta. Estos son unidos a segmentos J a través de un mecanismo, denominado *unión inversional*, en el cual el segmento V es invertido, y el DNA que interviene y las RSS no se pierden del loci.

Defectos en la síntesis de proteínas RAG eliminan la posibilidad de ordenamientos nuevos en genes somáticos. Como se describe debajo, la generación de nuevos órdenes es esencial para el desarrollo de linfocitos B; en consecuencia, deficiencias en RAG conducen a la ausencia completa de linfocitos B. Las personas con defectos en la funcionalidad de los genes RAG sufren de inmunodeficiencia grave. De modo similar, la delección selectiva de genes RAG en ratones conduce a una falla completa en el reordenamiento de genes de inmunoglobulinas (y receptores de linfocitos T), que resulta en un bloqueo de la generación de linfocitos B y T.

Imprecisión en la unión Además de la variabilidad en la secuencia creada por la selección al azar de los segmentos genéticos V y J por unir, el procesamiento de los intermediarios originados en el curso de la recombinación proporciona medios adicionales para expandir la variabilidad en las secuencias de inmunoglobulinas. Esta variabilidad adicional es creada en la unión de los segmentos por empalmar. La apertura de las horquillas en los extremos finales de codificación es el paso clave en este proceso: la apertura puede ser simétrica o asimétrica (véase Fig. 23-15c, 4 y 5). La proteína Artemis, cuya función requiere de la subunidad catalítica de la proteinasa dependiente de DNA, realiza la apertura de las horquillas.

Si la apertura de la horquilla es asimétrica, se genera una única secuencia palindrómica corta. La DNA polimerasa completa la proyección adhiriendo varios nucleótidos P que no eran parte de la región codificadora original del segmento genético en cuestión. Alternativamente, la proyección puede ser eliminada por un ataque exonucleolítico, que resulta en la eliminación de nucleótidos de la región codificadora original. Estas posibilidades se aplican del mismo modo a las regiones codificadoras V y J. La apertura simétrica de la horquilla retiene toda la información codificadora original. Sin embargo, incluso si la horquilla es abierta simétricamente, los extremos de la molécula de DNA tienden a adoptar nuevas conformaciones distintas de la conformación más estable, lo que crea secuencias cortas de cadena simple que también pueden ser atacadas exonucleóticamente, y esto resulta en la eliminación de nucleótidos.

Una vez que la horquilla ha sido abierta y los extremos codificadores han sido procesados, los extremos son unidos por la DNA

ligasa IV y XRCC4, con generación de un gen funcional de cadena ligera. Inherente al proceso de reorganización, existe imprecisión en la unión que resulta en parte de la adición y pérdida de nucleótidos en las uniones codificadoras. Cuando un segmento V y uno J se recombinan, la secuencia y el marco de lectura del producto VJ no puede predecirse. Solamente uno de cada tres reacciones de recombinación resulta en el marco de lectura que es compatible con la síntesis de cadena ligera.

La diversidad de cadenas ligeras surge entonces no solo de la combinación de segmentos genéticos V y J, sino también de la imprecisión en la unión. Al inspeccionar la estructura tridimensional de la cadena ligera, se ha demostrado una gran diversidad en la unión, generada como consecuencia de la imprecisión en la unión y que forma parte de un bucle, la región hipervariable 3 (HV3), que proyecta al sitio de unión el antígeno y realiza el contacto con este (véase Fig. 23-12b).

El reordenamiento del loci de cadena pesada involucra segmentos genéticos V, D y J

La organización del loci de cadena pesada es más compleja que la del loci de cadena ligera κ . El loci de cadena pesada contiene un ordenamiento largo en tándem de segmentos genéticos V (cada uno equipado con su propio promotor) y múltiples elementos J, pero también múltiples segmentos D (diversidad) (véase Fig. 23-14b). La recombinación somática de los segmentos V, D y J genera una secuencia reordenada de la región variable de la cadena pesada (V_H).

En el extremo final 3' de cada segmento genético en el DNA de cadena pesada, existen secuencias heptaméricas y nonaméricas conservadas y separadas por espaciadores de DNA, similares a los de las secuencias señal de recombinación (RSS) en el DNA de cadena ligera. Estas RSS se encuentran también en una configuración complementaria y antiparalela en los extremos 5' y 3' de cada segmento D (véase Fig. 23-15a). Los segmentos J están igualmente equipados en su extremo final 5' con la RSS requerida. La longitud de los espaciadores en estas RSS es tal que le permite a los segmentos D unirse a los segmentos J, y a los segmentos V unirse a los segmentos DJ reordenados. Sin embargo, no puede ocurrir una unión directa V a J ni D a D, en cumplimiento con la regla 12/23 heptámero-nonámero. Los reordenamientos de la cadena pesada proceden a través de los mismos mecanismos descritos anteriormente para los reordenamientos de la cadena ligera.

En el curso del desarrollo de un linfocito B, el loci de cadena pesada siempre se reordena primero, comenzando por el reordenamiento D-J. El nuevo orden DJ es seguido por el reordenamiento V-DJ. En el curso del reordenamiento D-J y V-DJ, la desoxinucleotidil-transferasa terminal (TdT) puede agregar nucleótidos a extremos 3' OH libres de DNA de forma independiente del molde. Hasta una docena de nucleótidos, denominados *región N*, pueden ser agregados y generar así una diversidad secuencial adicional a la unión cuando ocurren los reordenamientos D-J y V-DJ (véase Fig. 23-15, paso 7). Solo uno de cada tres reordenamientos produce un marco de lectura apropiado para la secuencia reorganizada VDJ. Si el nuevo ordenamiento produce una secuencia que codifica una proteína funcional, se denomina *productivo*. A pesar de que el loci de cadena pesada se encuentra presente en los dos cromosomas homólogos, solo uno de los reordenamientos productivos es permitido, como se discutirá más abajo.

FIGURA 23-15 Mecanismo de reorganización de segmentos genéticos de inmunoglobulinas a través de la unión por delección.

Este ejemplo ilustra la unión de un segmento V y un segmento J, como ocurre en el loci de cadena ligera (véase Fig. 23-14a). (a) Ubicación de los segmentos de DNA involucrados en la recombinación somática de segmentos genéticos de inmunoglobulinas en el loci de cadena ligera (arriba) y loci de cadena pesada (abajo). Los segmentos D están presentes en el loci de cadena pesada, pero no en el de la cadena ligera. En el extremo 3' de todos los segmentos genéticos V existe una secuencia señal de recombinación (RSS) conservada, compuesta por un heptámero, un espaciador de 12 pares de bases y un nonámero. Cada segmento J o D con el cual se puede recombinar un segmento V tiene en su extremo 5' una RSS similar con un espaciador de 23 pares de bases. Las secuencias nonaméricas y heptaméricas al extremo 5' de J o D son complementarias y antiparalelas a aquellas que se encuentran en el extremo 3' de cada V cuando se leen en la misma hebra (arriba). Un ordenamiento similar existe para la RSS en el extremo 3' de la D y al extremo 5' de la J en el loci de la cadena pesada. (b) Modelo hipotético de cómo dos regiones codificadoras a ser unidas pueden ser ordenadas espacialmente, estabilizadas por el complejo de recombinasas RAG1 y RAG2. Se muestran ambas hebras de DNA. (c) Los eventos que ocurren al unir las regiones codificadoras V y J. La línea germinal de DNA es plegada (paso 1), trayendo a los segmentos a ser unidos cercanos entre sí, y el complejo RAG1/RAG2 realiza cortes en una única hebra en los límites entre la región codificadora y las RSS (paso 2). El grupo -OH libre del extremo 3' ataca la hebra complementaria y crea una horquilla cerrada covalentemente en cada extremo codificador y un corte de doble cadena (doble hebra) en cada límite con una RSS (paso 3). Las horquillas se abren de modo simétrico (paso 4), como se muestra para el segmento J, o de modo asimétrico (paso 5), como se muestra para el segmento V. La desoxinucleotidil-transferasa terminal agrega nucleótidos para abrir de modo simétrico las horquillas (paso 6, derecha), lo que genera una proyección (amarillo) de nucleótidos no apareados de secuencia al azar. Por otra parte, la abertura asimétrica crea automáticamente una proyección palindrómica (paso 6, izquierda). Las proyecciones no apareadas en los extremos de las regiones codificadoras V y D son rellenadas por la DNA polimerasa (paso 7) o pueden ser quitadas por una exonucleasa. La DNA ligasa IV une los dos segmentos generados a partir de las regiones codificadoras V y J (paso 8). Las reorganizaciones de los segmentos D y J de cadena pesada, y segmentos V y DJ, ocurren por el mismo mecanismo, a excepción de la adición de la región N, la cual no tiene lugar. Véase el texto para mayor detalle.

Un potenciador localizado corriente abajo del grupo de segmentos J y corriente arriba del segmento de la región constante μ activa la transcripción desde el promotor en el extremo 5' de la secuencia reordenada VDJ (véase Fig. 23-14). El empalme del transcrito primario producido por el reordenamiento de genes de cadena pesada genera un mRNA funcional que codifica la cadena pesada μ . Tanto para los genes de cadena pesada de inmunoglobulinas como para los de cadena ligera, la recombinación somática localiza a los promotores corriente arriba de los segmentos V al alcance de los potenciadores necesarios para permitir la transcripción, de modo tal que solamente las secuencias recombinadas VJ y VDJ sean transcriptas, y no los segmentos V que permanecen en la configuración de la línea germinal.

La hiperpermutación somática permite la generación y la selección de anticuerpos con mejoras en las afinidades

En adición a la diversidad creada por la recombinación somática y la imprecisión de unión, los linfocitos B activados por antígenos pueden sufrir *hiperpermutación somática*. Después de recibir las señales ade-

cuadas, la mayoría proveniente de linfocitos T, se activa la expresión de la desaminasa inducida por activación (AID, *activation-induced deaminase*). Esta enzima desamina los residuos de citosina y los convierte en uracilo. Cuando un linfocito B que lleva esta lesión se replica, puede colocar una adenina en la hebra complementaria y generar así una transición G a A (véase Fig. 4-35). Alternativamente, el uracilo puede ser eliminado por la DNA glucosilasa para producir un sitio sin base. Estos sitios sin bases, cuando son copiados, permiten tanto transiciones como transversiones, a menos que se elija el nucleótido opuesto como el G original apareado con la citosina. Así, las mutaciones se acumulan con cada división sucesiva de linfocitos B, y esto genera numerosas mutaciones en los segmentos reordenados VJ y VDJ. Muchas de estas mutaciones son deletéreas y reducen la afinidad del anticuerpo codificado por el antígeno, pero algunas mejoran la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Los linfocitos B que llevan mutaciones que incrementan la afinidad tienen una ventaja selectiva cuando compiten por la cantidad limitada de antígeno que evoca la selección clonal (véase Fig. 23-11). El resultado final es la generación de una población de linfocitos B cuyos anticuerpos, como regla, posean mayor afinidad por el antígeno.

En el curso de la respuesta inmunitaria o después de una inmunización repetida, la respuesta de los anticuerpos muestra *maduración de la afinidad*, un incremento en la afinidad promedio de los anticuerpos por el antígeno, como resultado de la hipermutación somática. Los anticuerpos producidos durante esta fase de la respuesta inmunitaria presentan afinidad por antígenos a una escala nanomolar (o incluso mejor). Por razones que aún se desconocen, la actividad de la desaminasa inducida por activación se centraliza primordialmente en los segmentos reordenados VJ y VDJ, y esto debería requerir entonces de transcripción activa. El proceso entero de hipermutación somática es estrictamente dependiente de antígeno y demuestra un requerimiento absoluto de interacciones entre linfocitos B y ciertos linfocitos T.

El desarrollo del linfocito B requiere el aporte de un receptor del linfocito pre-B

Como ya hemos visto, los linfocitos B destinados a producir inmunoglobulinas deben reorganizar los segmentos genéticos necesarios para ensamblar los genes funcionales de cadenas pesadas y ligeras. Estos reordenamientos deben ocurrir en una secuencia cuidadosamente ordenada durante el desarrollo del linfocito B, comenzando con la reorganización de la cadena pesada. Además, la cadena pesada reorganizada se utiliza primero para construir un receptor unido a membrana que ejecuta las decisiones de destino celular necesarias para conducir a las siguientes etapas del desarrollo del linfocito B (y la síntesis de anticuerpos). Solo una reorganización productiva que produzca una combinación VDJ dentro del marco puede generar una cadena pesada μ completa. La producción de estas cadenas μ sirve como señal para indicarle al linfocito B que ha logrado una reorganización satisfactoria y que no se necesitan nuevos ordenamientos del loci de cadena pesada en los alelos remanentes. Recuérdese que cada precursor de linfocito comienza con uno o dos cromosomas portadores de loci de inmunoglobulinas en la configuración de línea germinal. En concordancia con la teoría de selección clonal, que estipula que cada linfocito debe estar equipado con un único receptor específico para un antígeno, continuar con la reorganización conllevaría el riesgo de

producir linfocitos B con dos cadenas pesadas diferentes, cada una con distinta especificidad, lo cual sería un resultado indeseable.

Una reorganización exitosa de segmentos V, D y J en el loci de cadena pesada permite así la síntesis de una cadena μ completa. En esta etapa, los linfocitos B son denominados células o linfocitos pre-B, ya que no han completado aún el ensamble de un gen funcional de cadena ligera y entonces no pueden realizar reconocimiento de antígenos. El nuevo gen de cadena pesada reordenado codifica el polipéptido μ , que forma parte de un receptor de señalización cuya expresión es esencial para un correcto desarrollo del linfocito B. La cadena μ producida en esta etapa del desarrollo del linfocito B es una versión unida a la membrana.

En los linfocitos pre-B, las cadenas μ recientemente armadas forman un complejo con las denominadas cadenas ligeras sustitutas, $\lambda 5$ y VpreB (Fig. 23-16). La cadena μ no tiene una cola citoplasmática y por ello es incapaz de reclutar componentes citoplasmáticos con el propósito de realizar transducción de señales. En cambio, los linfocitos pre-B expresan dos proteínas transmembranales auxiliares, denominadas $Ig\alpha$ e $Ig\beta$, cada una portando en su cola citoplasmática un motivo de activación del inmunorreceptor basado en

tirosina (ITAM, *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*). Todo el complejo, incluyendo a la cadena μ , $\lambda 5$, VpreB, $Ig\alpha$ e $Ig\beta$, constituye el *receptor de célula o linfocito pre-B* (pre-BCR, *pre-B-cell receptor*). La unión de este receptor con las señales adecuadas (que son aún desconocidas) resulta en el reclutamiento y la activación de la familia Src de tirosincinasas, que fosforilan los residuos de tirosina en el ITAM. En su forma fosforilada, los ITAM reclutan otras moléculas esenciales para la señalización de la traducción (véase luego). Debido a que todavía no hay cadenas ligeras funcionales en este receptor, se presume que es incapaz de realizar el reconocimiento del antígeno.

El receptor del linfocito pre-B tiene varias funciones importantes. Primero, inhibe la expresión de las recombinasas RAG, de modo tal que los reordenamientos del loci de cadena pesada de otro alelo no puedan proceder. Este fenómeno, denominado *exclusión alélica*, asegura que solo ocurra reordenamiento de una de las copias de loci de cadena pesada y se exprese como una cadena μ completa. En segundo lugar, debido a la asociación del receptor de linfocito pre-B con $Ig\alpha$ e $Ig\beta$, el receptor se convierte en una unidad funcional de transducción de señales. Las señales que emanan del pre-BCR inician la prolifera-

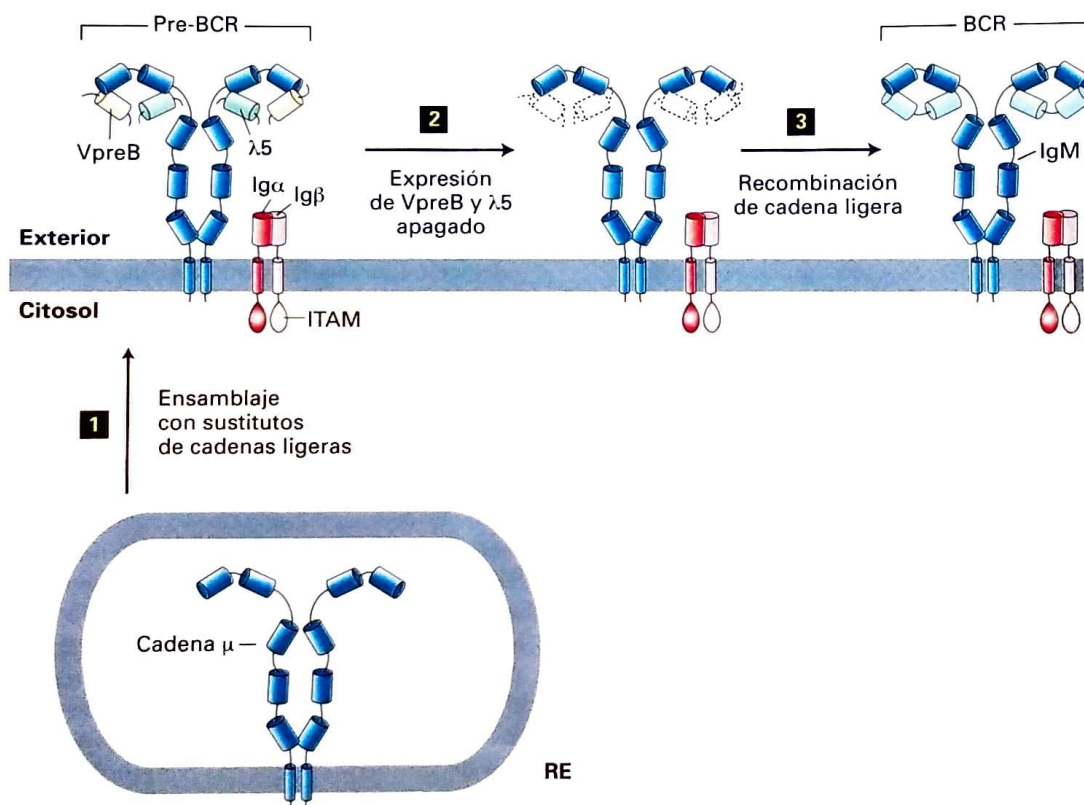


FIGURA 23-16 Estructura del receptor de linfocito pre-B y su función en el desarrollo del linfocito B. El reordenamiento exitoso de los segmentos genéticos de cadena pesada V, D y J permite la síntesis de cadenas pesadas μ unidas a membranas en el retículo endoplasmático del linfocito pre-B. En esta etapa todavía no ha ocurrido reordenamiento de genes de cadena ligera. Las cadenas μ formadas recientemente se ensamblan con cadenas ligeras sustitutas, compuestas de $\lambda 5$ y VpreB, para producir el receptor de linfocito pre-B, o pre-BCR (paso 1). Este receptor conduce a la proliferación a aquellas células que lo tengan. También suprime el reordenamiento de loci de cadena

pesada en el otro cromosoma y así media la exclusión alélica. En el curso de la proliferación, se detiene la síntesis de $\lambda 5$ y VpreB (paso 2), lo cual resulta en una "dilución" de los sustitutos de cadena ligera disponibles y reduce la expresión de pre-BCR. En consecuencia, los reordenamientos de loci de cadena ligera pueden proceder (paso 3). Si este reordenamiento es productivo, el linfocito B puede sintetizar cadenas ligeras y completar el ensamble del receptor de linfocito B (BCR), que incluye un IgM unido a membrana y también $Ig\alpha$ e $Ig\beta$ asociados. El linfocito B puede responder ahora a la estimulación por un antígeno específico.

ción del linfocito pre-B para expandir el número de linfocitos B que hayan tenido una recombinación productiva de D-J y V-DJ.

En el curso de esta expansión, disminuye la expresión de subunidades de cadena ligera sustitutas, $\lambda 5$ y VpreB. La progresiva dilución de $\lambda 5$ y VpreB en cada división celular sucesiva permite que se reinicie la expresión de las enzimas RAG, que ahora tienen como objetivo la recombinación del loci de cadena ligera λ o κ . Una recombinación productiva de la cadena ligera V-J también termina con la recombinación de los loci alélicos (exclusión alélica). Después de una recombinación exitosa de la cadena ligera V-J, el linfocito B puede hacer cadenas pesadas μ y cadenas ligeras λ o κ , y ensamblarlas en un receptor funcional de linfocito B (BCR) que pueda reconocer al antígeno (véase Fig. 23-16).

Una vez que un linfocito B expresa un BCR completo en su superficie celular, puede reconocer al antígeno, y todos los pasos subsiguientes en la activación del linfocito B y diferenciación involucran a su unión con el antígeno para el cual el BCR es específico. El BCR no solo tiene un papel en conducir al linfocito B a la proliferación después de un encuentro exitoso con un antígeno, sino que también funciona como un dispositivo para la captura y la ingestión del antígeno, un paso esencial que le permite al linfocito B procesar el antígeno adquirido y convertirlo a una señal que le pida ayuda a los linfocitos T. Esta función de los linfocitos B de presentar el antígeno será descrita en las siguientes secciones.

Durante una respuesta adaptativa, los linfocitos B dejan de producir Ig ligados a membranas y comienzan a secretar Ig

Como fue recientemente descrito, los **receptores de linfocitos B (BCR, B-cell receptor)**, un IgM unido a membrana, le confieren a los linfocitos B la habilidad de reconocer un antígeno en particular, un evento que

provoca la selección clonal y la proliferación de ese linfocito B, y aumenta así el número de linfocitos B específicos para ese antígeno (véase Fig. 23-11). Sin embargo, las funciones centrales de las inmunoglobulinas, como la neutralización del antígeno o la eliminación de las bacterias, requieren que estos productos sean liberados por los linfocitos B, de modo tal que se acumulen en el ambiente extracelular y puedan actuar a una cierta distancia del sitio donde fueron producidos.

La elección entre sintetizar inmunoglobulinas unidas a la membrana o inmunoglobulinas secretadas se realiza durante el procesamiento del transcripto primario de cadena pesada. Como se muestra en la Figura 23-17, el loci μ contiene dos exones (TM1 y TM2) que, juntos, codifican el dominio terminal C que ancla IgM en la membrana plasmática. Corriente arriba de este exón, se encuentra un sitio poliadenílico, y otro sitio poliadenílico corriente abajo. Si este último es elegido, el procesamiento posterior produce un mRNA que codifica la forma de μ unido a membrana. (Como se describe arriba, esta elección es necesaria para la formación del receptor de linfocito B, que incluye el IgM unido a membrana). Si el sitio poliadenílico que se encuentra corriente arriba es elegido, el procesamiento conduce a la versión secretada de la cadena μ . Ocurren ordenamientos similares en otros segmentos genéticos de regiones constantes de Ig, cada uno de los cuales puede especificar una cadena pesada unida a membrana o secretada. La habilidad para cambiar entre la forma de cadena pesada de inmunoglobulina anclada a la membrana o secretada por medio de alternar el uso de los sitios poliadenílicos (*no* por corte y empalme alternativo) es única para esta familia de productos genéticos.

La capacidad de cambiar de la síntesis exclusiva de inmunoglobulinas de membranas a la síntesis de inmunoglobulinas secretadas es adquirida por los linfocitos B en el curso de su diferenciación. Los linfocitos B totalmente diferenciados, denominados *células plasmáticas*, se dedican casi exclusivamente a la síntesis de anticuerpos secretados (véase Fig. 23-6). Las células plasmáticas sintetizan y secre-

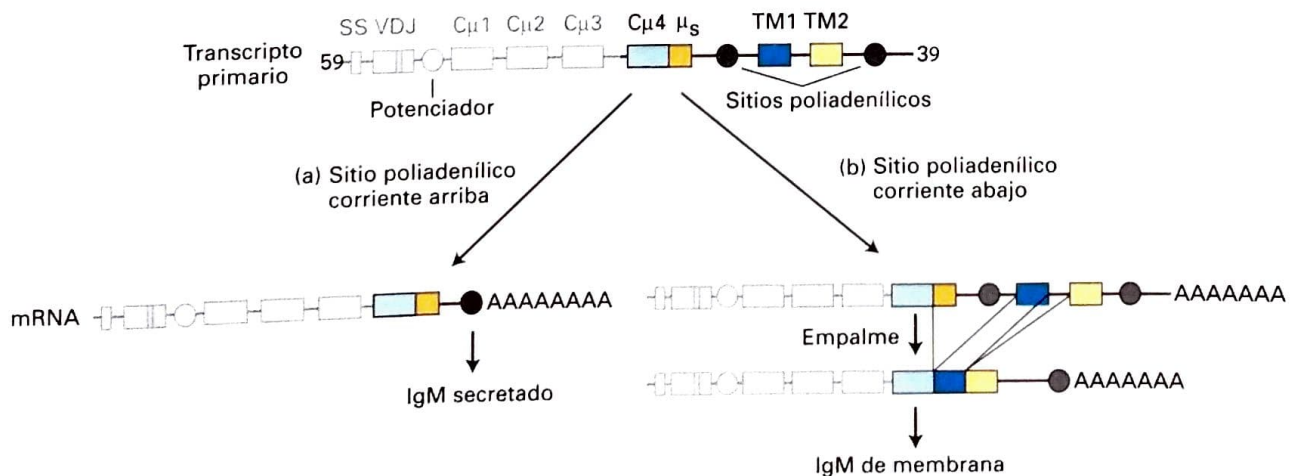


FIGURA 23-17 Síntesis de IgM de membrana y secretado. Se muestra arriba la organización del transcripto primario de cadena pesada μ . C μ 4 es el exón que codifica el cuarto dominio de región constante μ ; μ_s es una secuencia codificadora única para IgM secretados; TM1 y TM2 son exones que especifican el dominio transmembrana de la cadena μ . La síntesis de IgM de membrana o IgM secretado depende de qué sitio poliadenílico sea seleccionado durante el procesamiento del transcripto primario. (a) Si se utiliza el sitio poliadenílico

corriente arriba, el mRNA resultante incluye el exón C μ 4 entero y especifica la forma de cadena μ secretada. (b) Si se utiliza el sitio poliadenílico corriente abajo, un sitio en el exón C μ 4 permite el empalme de exones transmembrana y se produce un mRNA que codifica la forma de cadena μ unida a membrana. Existen mecanismos similares que generan las formas secretadas y unidas a membrana de otros isotipos de Ig. SS = secuencia señal.

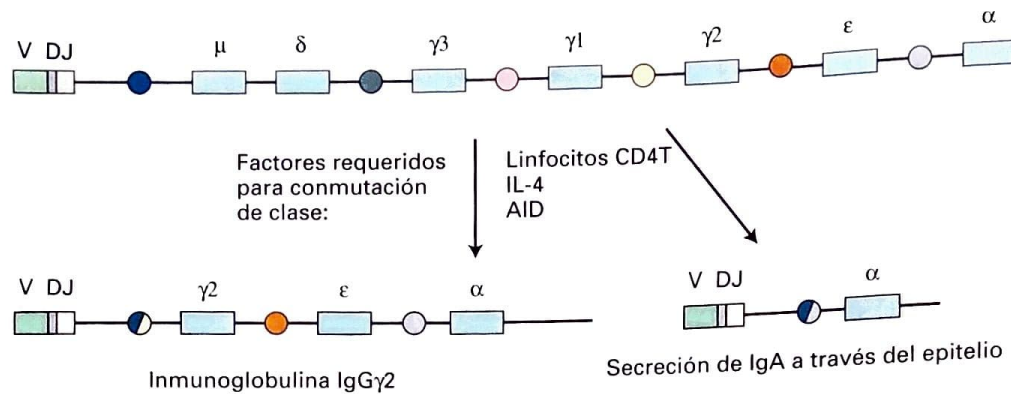


FIGURA 23-18 Recombinación en la conmutación de clase en loci de cadena pesada de inmunoglobulina. La recombinación en la conmutación de clase involucra conmutación de sitios, que son secuencias repetitivas (círculos coloreados) que se encuentran corriente arriba de los genes de región constante de cadena pesada. La recombinación requiere de la activación de desaminasas (AID, *activation induced deaminase*), de asistencia de los linfocitos T y de citocinas (p. ej., IL-4) producidas por ciertos linfocitos T. La recombinación

elimina el segmento de DNA entre el sitio de conmutación corriente arriba de los exones μ y de la región constante hacia la cual va a ocurrir la conmutación. La conmutación de clase genera moléculas de anticuerpos con la misma especificidad para el antígeno que la célula B que lleva el IgM y que montó la respuesta inicial, pero con diferentes regiones constantes de cadena pesada y, en consecuencia, distintas funciones efectoras.

tan varias miles de moléculas de anticuerpos por segundo. En esta producción creciente de anticuerpos secretados reside la efectividad del sistema inmunitario adaptativo de eliminar los patógenos. El valor de protección de los anticuerpos es proporcional a la concentración en las cuales se encuentren presentes en la circulación. En efecto, los niveles de anticuerpos en circulación son utilizados como un parámetro para determinar si la vacunación contra un patógeno determinado ha sido efectiva. La habilidad de las células plasmáticas de establecer niveles de anticuerpos adecuados es una función de su habilidad de secretar grandes cantidades de inmunoglobulinas, y entonces requiere de una expansión masiva del retículo endoplasmático, una característica distintiva de las células plasmáticas. La respuesta a proteínas desplegadas (UPR, *unfolded protein response*) (Capítulo 13) es iniciada en los linfocitos B como un mecanismo fisiológico esencial para expandir el RE y preparar al linfocito B en diferenciación para su futura tarea como célula secretora altamente activa. La interferencia con la UPR, por ejemplo por delección del gen XBP1, impide que los linfocitos B puedan convertirse en células plasmáticas.

Los linfocitos B pueden cambiar el isotipo de inmunoglobulina que sintetizan

En el loci de cadena pesada de inmunoglobulinas, los exones que codifican la cadena μ residen inmediatamente corriente abajo del exón VDJ reordenado (Fig. 23-18, *arriba*). Este es seguido por el exón que especifica la cadena δ . La transcripción de un loci reordenado de cadena pesada de inmunoglobulina produce un único transcripto primario que incluye las regiones constantes μ y δ . El empalme de este largo transcripto determina si una cadena μ o una cadena δ será producida. Corriente abajo de la combinación μ/δ , se encuentran los exones que codifican todos los otros isotipos de cadena pesada. Corriente arriba de cada grupo de exones (con excepción del loci δ), se hallan distintas secuencias repetitivas que codifican los diferentes isotipos y que son propensas a la recombinación, presumiblemente debido a su naturaleza repetitiva. Dado a que cada linfocito B comienza necesariamente

con IgM su en superficie, la recombinación que involucre estos sitios, si ocurre, resulta en una *conmutación de clase* de IgM a alguno de los otros isotipos localizados corriente abajo del ordenamiento de genes de región constante (véase Fig. 23-18). El DNA interpuesto es eliminado.

En el curso de su diferenciación, un linfocito B puede cambiar secuencialmente. Es importante resaltar que la cadena ligera no es afectada por este proceso, ni tampoco el segmento VDJ reordenado con el cual el linfocito B inició este proceso. La recombinación de conmutación de clase genera entonces anticuerpos con regiones constantes diferentes pero igual especificidad de antígeno. Cada isotipo de inmunoglobulina es caracterizado por su región constante única. Como se ha discutido previamente, estas regiones constantes determinan las propiedades funcionales de varios isotipos. La recombinación en la conmutación de clase depende por completo de la actividad de la desaminasa inducida por activación (AID, *activation-induced deaminase*) y de la presencia del antígeno y linfocitos T. La hipermutación somática y la recombinación de conmutación de clase ocurren al mismo tiempo, y su efecto combinado permite un ajuste fino de la respuesta inmunitaria adaptativa respecto de la afinidad de los anticuerpos producidos y las funciones efectoras que se requieran.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 23.3

Generación de diversidad de anticuerpos y desarrollo de linfocitos B

- Los genes funcionales que codifican anticuerpos son generados por reordenamiento somático de múltiples segmentos de DNA de los loci de cadena pesada y cadena ligera. Este arreglo involucra segmentos V y J para cadenas ligeras de inmunoglobulinas, y segmentos V, D y J para cadenas pesadas de inmunoglobulinas (véase Fig. 23-14).
- Los reordenamientos de los segmentos V y J, como también de los segmentos V, D y J, son controlados por secuencias señales de recom-

binación (RSS) conservadas, compuestas por heptámeros y nonámeros separados por espaciadores de 12 o 23 pares de bases (véase Fig. 23-15). Solo aquellos segmentos que posean espaciadores de longitudes diferentes podrán reordenarse exitosamente.

- La maquinaria molecular que lleva a cabo el proceso de reordenamiento incluye recombinasas (RAG1 y RAG2) producidas únicamente por linfocitos y un gran número de proteínas que participan en la unión de extremos no homólogos de moléculas de DNA en otros tipos celulares.
- La diversidad de anticuerpos es creada por la selección al azar de los segmentos genéticos de Ig que serán recombinados (unión combinatoria) y por la habilidad de las cadenas pesadas y ligeras producidas de genes Ig reordenados de asociarse con muchas cadenas pesadas y ligeras distintas, respectivamente (asociación combinatoria).
- La imprecisión en la unión genera mayor diversidad de anticuerpos en las uniones de segmentos genéticos durante la recombinación somática.
- Se crea mayor diversidad de anticuerpos después que las células B encuentran un antígeno como consecuencia de la hipermutación somática, que puede conducir a la selección y proliferación de linfocitos B productores de anticuerpos de alta afinidad, un proceso denominado maduración de la afinidad.
- Durante el desarrollo de los linfocitos B, los genes de cadena pesada son reordenados primero, lo que conduce a la expresión del receptor de linfocito pre-B. Los reordenamientos subsecuentes de los genes de cadena ligera resultan en el ensamble de un receptor de linfocito B unido a membrana (véase Fig. 23-16).
- Solo se reordena una de las copias alélicas de loci de cadena pesada y loci de cadena ligera (exclusión alélica), lo que asegura que un linfocito B exprese Ig con una única especificidad antigénica.
- La poliadenilación de diferentes sitios poliadenílicos en un transcrito primario Ig determina si se producirá la versión de anticuerpo unido a membrana o el anticuerpo secretado (véase Fig. 23-17).
- Durante la respuesta inmunitaria, la conmutación de clase le permite a los linfocitos B ajustar las funciones efectoras de las inmunoglobulinas que producen, pero retienen la especificidad antigénica (Fig. 23-18).

23.4 El MHC y la presentación del antígeno

Los anticuerpos pueden reconocer antígenos sin la ayuda de ninguna otra molécula externa; la presencia del antígeno y del anticuerpo es suficiente para su interacción. En el transcurso de su diferenciación, los linfocitos B reciben ayuda de los linfocitos T, en un proceso que será descrito en detalle más adelante. Esta ayuda es específica para cada antígeno, y los linfocitos T responsables de proporcionarla son los *linfocitos T helper*. Aunque los anticuerpos contribuyen a la eliminación de patógenos bacterianos y virales, muchas veces es necesario destruir, además, las células infectadas que sirven como fuente para nuevas partículas virales. Esta tarea es llevada a cabo por linfocitos T con actividad citotóxica. Estos *linfocitos T citotóxicos* y los linfocitos T helper utilizan receptores específicos para cada antígeno cuyos genes

son generados por mecanismos análogos a aquellos usados por los linfocitos B para generar genes de inmunoglobulina. Sin embargo, los linfocitos T reconocen antígenos de una forma muy distinta de como lo hacen los linfocitos B. Los receptores específicos para cada antígeno en los linfocitos T reconocen pequeños recortes de antígenos proteicos al ser estos presentados a ellos mediante glucoproteínas en la membrana codificadas de acuerdo con el **complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, *major histocompatibility complex*)**. En el transcurso normal de sus actividades, varias células presentadoras de antígenos digieren proteínas derivadas de patógenos (y de sí mismas) y luego exponen estos recortes proteicos (péptidos) en su superficie celular en un complejo físico con una proteína MHC. Los linfocitos T pueden inspeccionar estos complejos, y si detectan un péptido derivado de un patógeno actúan apropiadamente, lo cual puede incluir eliminar a la célula que lleva el complejo MHC-péptido. En esta sección, describiremos el MHC y las proteínas que codifica, y luego examinaremos cómo estas moléculas MHC se involucran en el reconocimiento de antígenos.

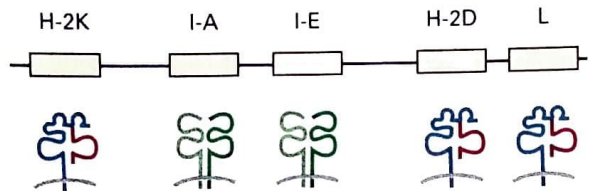
El MHC determina la habilidad de dos individuos no emparentados de la misma especie de aceptar o rechazar injertos

El complejo mayor de histocompatibilidad fue descubierto, tal lo implica su nombre, como el loci genético que controla la aceptación o rechazo de injertos. En una época en la cual los cultivos de tejidos no habían sido aún desarrollados hasta el punto de poder propagar células derivadas de un tumor en un laboratorio, los investigadores debían hacer pasos en serie in vivo de tejidos tumorosos (trasplantar un tumor de un ratón a otro). Rápidamente, se observó que un tumor que surgía de manera espontánea en una cepa endogámica de ratones podía ser propagado con éxito en la cepa donde había surgido, pero no en una línea genéticamente distinta de ratones. El análisis genético mostró que un único loci principal era responsable de este comportamiento. De modo similar, el trasplante de piel saludable era posible entre ratones de la misma cepa, pero no cuando el receptor tenía una base genética distinta. El análisis genético del rechazo de trasplantes identificó un único loci principal que controla la aceptación o el rechazo, el cual es una reacción inmunológica. Como sabemos en la actualidad, todos los vertebrados que tienen un sistema inmunitario adaptativo tienen una región genética que corresponde al complejo mayor de histocompatibilidad tal como se definió originalmente en el ratón.

En este animal, la región genética que codifica los antígenos responsables de un fuerte rechazo a injertos se llama *complejo H-2* (Fig. 13-19a). La caracterización inicial del MHC fue seguida por una apreciación de la complejidad genética de esta región. Después de un largo mapeo por medios genéticos estándares (recombinación dentro del MHC), se determinó la secuencia de nucleótidos completa de todo el MHC. El MHC de un mamífero típico contiene docenas de genes, muchos de los cuales codifican proteínas de relevancia inmunológica.

En los seres humanos, el descubrimiento del MHC dependía de la caracterización de antisueros producidos en pacientes que habían tenido múltiples transfusiones de sangre. Los antígenos expresados en la superficie de las células del donante genéticamente distinto provocaban una respuesta inmunológica en el receptor. Los antígenos diáfanos predominantes reconocidos por estos antisueros están codificados

(a) MHC de ratón (complejo H-2)



(b) MHC de ser humano (complejo HLA)

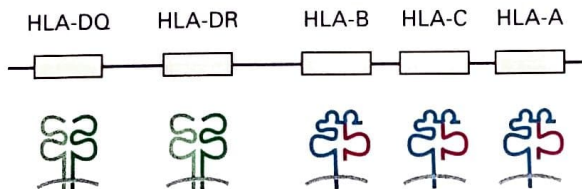


FIGURA 23-19 Organización del complejo mayor de histocompatibilidad en ratones y seres humanos. Los loci principales están representados con diagramas esquemáticos de sus proteínas codificadas. Las proteínas MHC clase I están compuestas por una glucoproteína transmembrana codificada por el MHC en unión no covalente con una pequeña subunidad, llamada $\beta 2$ -microglobulina, que no se encuentra codificada en el MHC y no está unida a la membrana. Las proteínas MHC clase II consisten de dos glucoproteínas transmembrana no idénticas, ambas codificadas por el MHC.

por el MHC, una región también conocida como *complejo HLA* (Fig. 23-19b). Todos los MHC de los vertebrados codifican un conjunto homólogo de proteínas, aunque los detalles de la organización y el contenido de los genes varían considerablemente entre especies.

El feto humano también podría considerarse un injerto: los fetos comparten solo la mitad de su material genético con su madre, pues la otra mitad proviene del padre. Los antígenos codificados por esta contribución paterna podrían diferir lo suficiente con los de su contraparte materna para causar una respuesta inmunológica en la madre. Una respuesta de este tipo puede ocurrir pues, en el transcurso del embarazo, las células fetales que se descartan en el sistema circulatorio materno pueden estimular el sistema inmunitario para que lleve a cabo una respuesta inmunitaria en contra de estos antígenos paternos. Sabemos que estos anticuerpos reconocen estructuras codificadas por el MHC humano. El feto en sí está a salvo de ser rechazado debido a la organización especializada de la placenta, que previene el inicio de una respuesta inmunitaria de la madre en contra del tejido fetal.

La actividad de matar de los linfocitos T citotóxicos está restringida por antígenos específicos y el MHC

Claramente, la función de las moléculas MHC no es evitar el intercambio de injertos quirúrgicos. Estas moléculas tienen un papel esencial en el reconocimiento de células infectadas por virus me-

d mediante linfocitos T citotóxicos (CTL, *cytotoxic T lymphocytes*). En c-
diante linfocitos T citotóxicos (CTL, *cytotoxic T lymphocytes*). En c-
glulas infectadas por virus, las moléculas MHC interactúan con frag-
mentos proteicos derivados de patógenos virales y los presentan en
la superficie celular, donde los linfocitos T citotóxicos encargados de
eliminar la infección pueden reconocerlos. Se describirá más adelan-
te cómo estos fragmentos de antígeno son generados y presentados
para que los reconozcan los linfocitos T citotóxicos. Los linfocitos T
que tienen receptores de especificidad apropiados liberan una carga
de moléculas letales sobre las células diana infectadas, destruyen sus
membranas celulares y, así, matan el objetivo infectado. La destruc-
ción de estas células diana puede ser fácilmente medida de acuerdo
con la liberación del contenido citoplasmático cuando dichas células
se desintegran físicamente.

Ratones que se han recuperado de una infección viral particular son una buena fuente de linfocitos T citotóxicos que pueden reconocer y matar células diana infectadas con el mismo virus. Si los linfocitos T son obtenidos de un ratón que eliminó una infección viral de la gripe exitosamente, se observa actividad citotóxica en contra de células diana infectadas con gripe, pero no en contra de células control sin infectar (Fig. 23-20). Más aún, los linfocitos T citotóxicos específicos para la gripe no matarán células infectadas con un virus diferente, como el virus de estomatitis vesicular. Los linfocitos T citotóxicos pueden incluso discernir entre cepas de gripe muy emparentadas, y pueden hacer esto con precisión: diferencias en tan solo un aminoácido en el antígeno viral podrían ser suficiente para evitar el reconocimiento y la eliminación por medio de linfocitos T citotóxicos. Estos experimentos muestran que los linfocitos T citotóxicos son verdaderamente específicos para cada antígeno y no reconocen simplemente un atributo que es compartido por todas las células infectadas por un virus, sin importar la identidad de dicho virus.

En este ejemplo, se asume que los linfocitos T recolectados de un ratón inmune a la gripe son probados en células diana infectadas por gripe derivados de una cepa idéntica de ratón (cepa a). Sin embargo, si las células diana de una cepa sin ningún parentesco (cepa b) son infectadas con la misma cepa de gripe y son usadas como diana, los linfocitos T de la cepa a no pueden matar las células diana infectadas de la cepa b (véanse Figs. 23-20b, **1** vs. **4**). Por ende, no es suficiente que el antígeno (una proteína derivada de la gripe) esté presente; el reconocimiento por linfocitos T citotóxicos está *restringido* por elementos que son específicos de cada cepa de ratón. El mapeo genético mostró que estos elementos restrictivos están codificados (por genes) en el MHC. Por eso, los linfocitos T citotóxicos de una cepa de ratón inmune a la gripe matarán células diana infectadas por gripe de otra cepa de ratón solo si estas dos cepas son iguales en el MHC en ciertas moléculas relevantes. Este fenómeno se conoce entonces como *restricción MHC*.

Los linfocitos T con diferentes propiedades funcionales son guiados por dos clases distintivas de moléculas MHC

El MHC codifica dos tipos de glucoproteínas esenciales para el reconocimiento inmunitario, comúnmente llamadas *moléculas MHC clase I y clase II*. Los productos MHC clase I y clase II están relacionados con la presentación del antígeno a los linfocitos T, pero cada uno sirve para una función muy distinta del otro. Los productos MHC clase I sirven principalmente para alertar a los linfocitos T ci-

y como una inmediata necesidad de una repuesta inmunitaria adaptativa que requiere la participación de los linfocitos B, producción de citocina y, además, ayuda de los linfocitos T citotóxicos. Nuevamente, la biología celular subyacente que describe la expresión, el ensamble y el modo de presentación del antígeno por las moléculas MHC clase II encaja en esta especialización funcional de forma prolija, como veremos más adelante.

La comparación de los mapas genéticos del MHC de ratones y seres humanos muestra la presencia de varios genes MHC clase I y II, aun cuando sus ordenaciones muestran variaciones entre la diferentes especies (véase Fig. 23-19). Además de las moléculas MHC clase I y II, el MHC codifica componentes clave para el procesamiento y presentación de antígenos. Por último, el MHC del vertebrado típico también codifica componentes clave en la cascada del complemento. Las moléculas MHC clase I y II son reconocidas por diferentes poblaciones de células del sistema inmunitario y, por ende, sirven para diferentes funciones.

Como se demuestra con claridad en los experimentos de la Figura 23-20, los linfocitos T citotóxicos son guiados en el reconocimiento de sus objetivos por moléculas MHC. Principalmente, estos linfocitos T usan moléculas MHC clase I como sus elementos de restricción, y también están caracterizados por la presencia del marcador de glucoproteína CD8 en su superficie. Todas, o casi todas, las células con núcleo expresan constitutivamente las moléculas MHC clase I y pueden soportar la replicación de virus. Los linfocitos T citotóxicos reconocen y matan los objetivos infectados a través de las moléculas MHC clase I expresadas que muestren un antígeno derivado del virus.

Como fue mencionado previamente, los linfocitos B no pasan por una etapa de diferenciación final a células plasmáticas que secretan anticuerpos sin la ayuda de otro subconjunto de linfocitos T, los *linfocitos T helper*, que expresan en su superficie el marcador de glucoproteína CD4 y utilizan moléculas MHC clase II. La expresión constitutiva de las moléculas MHC clase II está confinada a las llamadas células *profesionales* presentadoras de antígeno, incluidos linfocitos B, células dendríticas y macrófagos. (Varios otros tipos de células, algunas epiteliales, pueden ser inducidas a producir moléculas MHC clase II, pero este tema no se analizará aquí).

Los dos mayores grupos funcionalmente distintivos de linfocitos T (linfocitos T citotóxicos y linfocitos T helper) pueden entonces distinguirse de acuerdo con el perfil singular de proteínas que presenten en su superficie celular y por las moléculas MHC que utilicen como elementos de restricción:

- Linfocitos T citotóxicos: marcadores CD8; restringidos por MHC clase I
- Linfocitos T helper: marcadores CD4; restringidos por MHC clase II

Tanto los CD4 como los CD8 pertenecen a la superfamilia de proteínas inmunoglobulina (Ig), que incluye uno o más dominios Ig. Los receptores de linfocitos B y receptores T, el receptor polimérico IgA y varias moléculas de adhesión celular (Cap. 19) también pertenecen a la superfamilia Ig. La base molecular para la correlación estricta entre la expresión del CD8 y la utilización de moléculas MHC clase I o entre la expresión del CD4 y la utilización de moléculas MHC clase II como elementos de restricción será evidente una vez que se haya descrito la estructura y el modo de acción de las moléculas MHC.

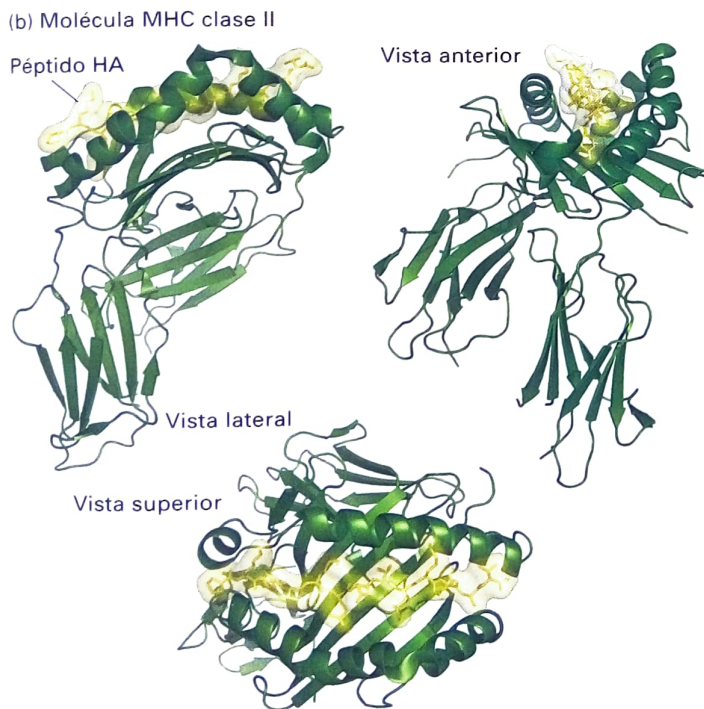
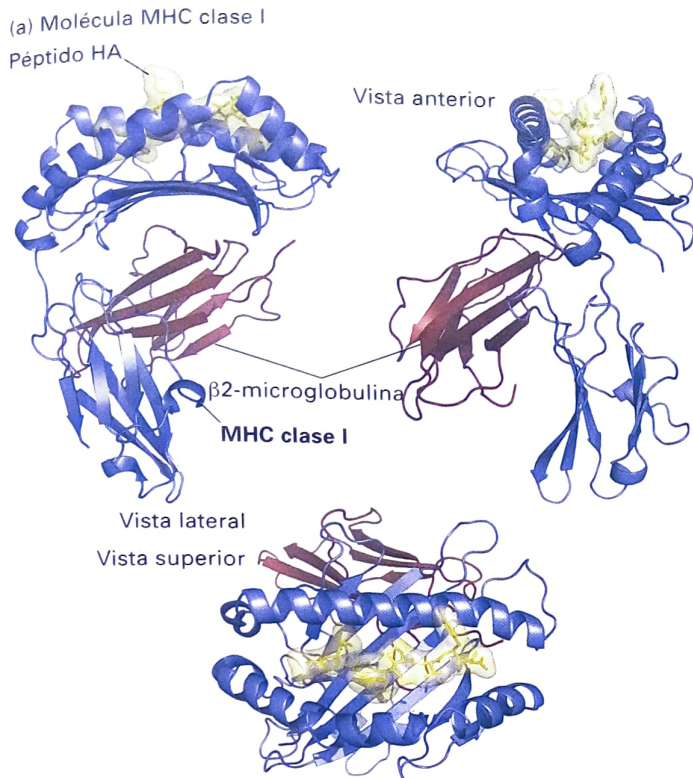
Las moléculas MHC se unen a antígenos peptídicos e interactúan con los receptores de linfocito T

Tanto las moléculas MHC clase I como las clase II son altamente *polimórficas*; esto significa que existen muchas variantes alélicas entre individuos de la misma especie. El sistema inmunitario de un vertebrado puede responder a estas diferencias alélicas, y esta habilidad para reconocer variantes alélicas en el MHC es la causa inmunológica subyacente al rechazo de trasplantes que involucren a individuos genéticamente distintos, sin parentesco. Aun así, ambas clases de moléculas MHC son estructuralmente similares en varios aspectos, y también lo son sus interacciones con péptidos y los receptores de linfocito T (Fig. 23-21).

Moléculas MHC Clase I Las moléculas MHC clase I pertenecen a la superfamilia Ig y consisten en dos polipéptidos. La subunidad más grande es una membrana de glucoproteína tipo I (véase Fig. 13-10) codificada por el MHC y su estructura corresponde a una $\alpha\beta$ no es codificada por el MHC y su estructura corresponde a un dominio libre Ig. Originalmente, se purificaban de leucocitos humanos mediante digestión con papaína, que libera las porciones extracelulares de moléculas MHC clase I y las deja intactas. Ahora, estas proteínas se producen con procedimientos y tecnología de DNA recombinante y se han vuelto herramientas importantes en la detección de linfocitos T antígeno específicos.

Está implícito, dentro de la noción de que las moléculas MHC son las causas del rechazo de injertos, su variación estructural, atribuible a la variante heredada (polimorfismo genético): Si un receptor recibe un injerto, el sistema inmunitario del receptor debe ser capaz de distinguir cualidades únicas de las moléculas MHC del donante presentes en el injerto. De hecho, los genes codificados por el MHC son los más polimórficos conocidos hasta ahora, con más de 2 000 productos alélicos identificados en seres humanos. Las moléculas MHC clase I en seres humanos son codificadas por los loci HLA-A, HLA-B y HLA-C (Fig. 23-19), y cada uno muestra extensas variaciones alélicas. En el ratón, las moléculas MHC clase I son codificadas por los loci H-2K y H-2D, que también presentan extensas variaciones alélicas. La estructura tridimensional de las moléculas MHC clase I revelan dos dominios similares a Ig cerca de la membrana. Estos dominios sostienen una lámina β plegada de ocho hebras con dos hélices α encima y cerradas en ambos extremos, donde se une el péptido (véase Fig. 23-21a). El tipo de unión peptídica por una molécula MHC clase I requiere un péptido de longitud fija, usualmente entre 8 y 10 aminoácidos, para que los extremos del péptido puedan encajar en los bolsillos que guardan los grupos amino y carboxilos cargados en los extremos. Más aún, el péptido está anclado en la hendidura por medio de un pequeño número de cadena de aminoácidos, cada una de las cuales es sostenida por un bolsillo en la molécula MHC que encaja ajustadamente ese residuo particular de aminoácido (Fig. 23-22a). En promedio, dos de estos “bolsillos específicos” deben ser llenados correctamente para posibilitar una unión peptídica estable. De esta forma, una molécula cualquiera MHC puede acomodar grandes números de péptidos de diversas secuencias, siempre y cuando los requerimientos de “anclaje” sean cumplidos.

Los residuos polimórficos que distinguen una molécula MHC de otra están ubicados principalmente dentro y alrededor de estas hendiduras que se unen a péptidos. Por lo tanto, estos residuos determinan la arquitectura del bolsillo y de allí se obtiene la especifici-



idad para unirse a péptidos. Estos residuos polimórficos afectan la superficie de la molécula MHC y, por ende, los puntos de contacto con los receptores de linfocitos T. Por ende, un receptor de linfocito T diseñado para interactuar con una clase particular de alelo MHC clase I no va a interactuar con moléculas MHC no relacionadas debido a su arquitectura superficial diferente (Fig. 23-22b); esta es la

FIGURA 23-21 Estructura tridimensional de moléculas MHC clase I y II. (a) Aquí se muestra la estructura de una molécula MHC clase I con un péptido unido, determinado por cristalografía de rayos X. La porción de una molécula MHC clase I que se une a un péptido consiste de una lámina β compuesta de ocho hebras β acompañadas de dos hélices α . La hendidura que se une a péptidos es formada en su totalidad desde la gran subunidad codificada por el MHC, que se asocia de modo no covalente con la subunidad pequeña (β 2-microglobulina) codificada en otra parte. (b) Las moléculas MHC clase II son estructuralmente similares a las moléculas MHC clase I, pero con algunas diferencias importantes. Tanto las subunidades α y β de las moléculas MHC clase II están codificadas en el MHC y contribuyen a la formación de hendiduras que se unen a péptidos. La hendidura que se une a péptidos de las moléculas MHC clase II puede unirse a un rango mayor de tamaños de péptidos que el de las moléculas clase I. (Parte [a] basada en D.N. Garboczi, 1996, *Nature* 384:134. Parte [b] basada en J. Hennecke y cols., 2000, *EMBO J.* 19:5611.)

base molecular de las restricciones MHC. El marcador CD8 funciona como un correceptor, uniendo las porciones conservadas de las moléculas MHC clase I. Por consiguiente, la presencia de CD8 “determina” la especificidad de la restricción de cualquier linfocito T maduro que lo porte.

Moléculas MHC clase II Las dos subunidades (α y β) de las moléculas MHC clase II son glucoproteínas de membrana y pertenecen a la superfamilia Ig. El MHC de un mamífero típico contiene varios loci que codifican moléculas MHC clase II (véase Fig. 23-19). Como la gran subunidad de moléculas MHC clase I, tanto las subunidades α como las β de las moléculas MHC clase II muestran polimorfismo genético.

El diseño básico tridimensional de las moléculas MHC clase II se asemeja al de las moléculas MHC clase I: dos dominios Ig cercanos a la membrana soportan una porción que se vincula a péptidos y está compuesta por una lámina β plegada de ocho hebras y dos hélices α (véase Fig. 23-21b). Para moléculas MHC clase II, las subunidades α y β contribuyen de igual manera para la construcción de hendiduras que se unen a péptidos. Esta hendidura está abierta en ambos extremos y, por ende, permite la unión de péptidos más grandes que los que sobresalen de ella. La forma de unirse a péptidos involucra bolsillos donde encajan ciertas cadenas laterales específicas de la molécula MHC con átomos de la cadena principal del péptido unido. Al igual que en moléculas MHC clase I, el polimorfismo MHC clase II afecta principalmente los residuos dentro y alrededor de la hendidura que se une a péptidos, de modo que la especificidad con la que se une a péptidos difiere entre los diversos productos alélicos.

Un receptor de linfocito T que interactúa con una molécula MHC clase II particular no lo hará con una molécula alélica diferente, no solo por las diferencias en la especificidad con la que se unen a péptidos las moléculas alélicas, sino también por el polimorfismo que afecta los contactos residuales con el receptor de linfocito T; al igual que para el MHC clase I, esta es la base para el reconocimiento restringido de antígenos en el MHC clase II. Como se discute más adelante, las moléculas MHC clase II evolucionaron para presentar péptidos generados predominantemente en endosomas y lisosomas. Las interacciones entre un péptido y una molécula MHC clase II ocurren en estos orgánulos, y las moléculas MHC clase II son dirigidas específicamente a estos lugares después de su síntesis en el retículo endoplasmático.

MHC, y (6) presentación de la molécula MHC cargada con el péptido en la superficie celular. En las próximas dos secciones, describiremos los detalles moleculares de cada vía.

La vía MHC clase I presenta antígenos citosólicos

La Figura 23-23 resume los seis pasos de la vía MHC clase I y utiliza como ejemplo una célula infectada por un virus. La siguiente discusión describe los eventos que ocurren durante cada paso:

1 Adquisición del antígeno: en el caso de una infección viral, la adquisición del antígeno es sinónimo, usualmente, del estado infectado de la célula. Los virus dependen de la síntesis de proteínas de

su célula huésped para generar los bloques constitutivos de nuevos viriones. Esto incluye la síntesis de proteínas citosólicas virales y también de proteínas de membrana. La síntesis de proteínas, a diferencia de la replicación de DNA, no es un proceso libre de errores, ya que se toma solo una fracción de las nuevas cadenas polipeptídicas al ser estas terminadas prematuramente, además de otros errores (incorporación errónea de aminoácidos, plegamiento erróneo o retrasado, mutación con desplazamiento de lectura). Estos errores en la síntesis de proteínas afectan a las proteínas de la célula huésped y también a aquellas especificadas por genomas virales. Las proteínas que contengan errores deben ser rápidamente eliminadas para que no ocupen espacio en el citoplasma, no causen interacciones no productivas con proteínas asociadas, o que incluso actúen

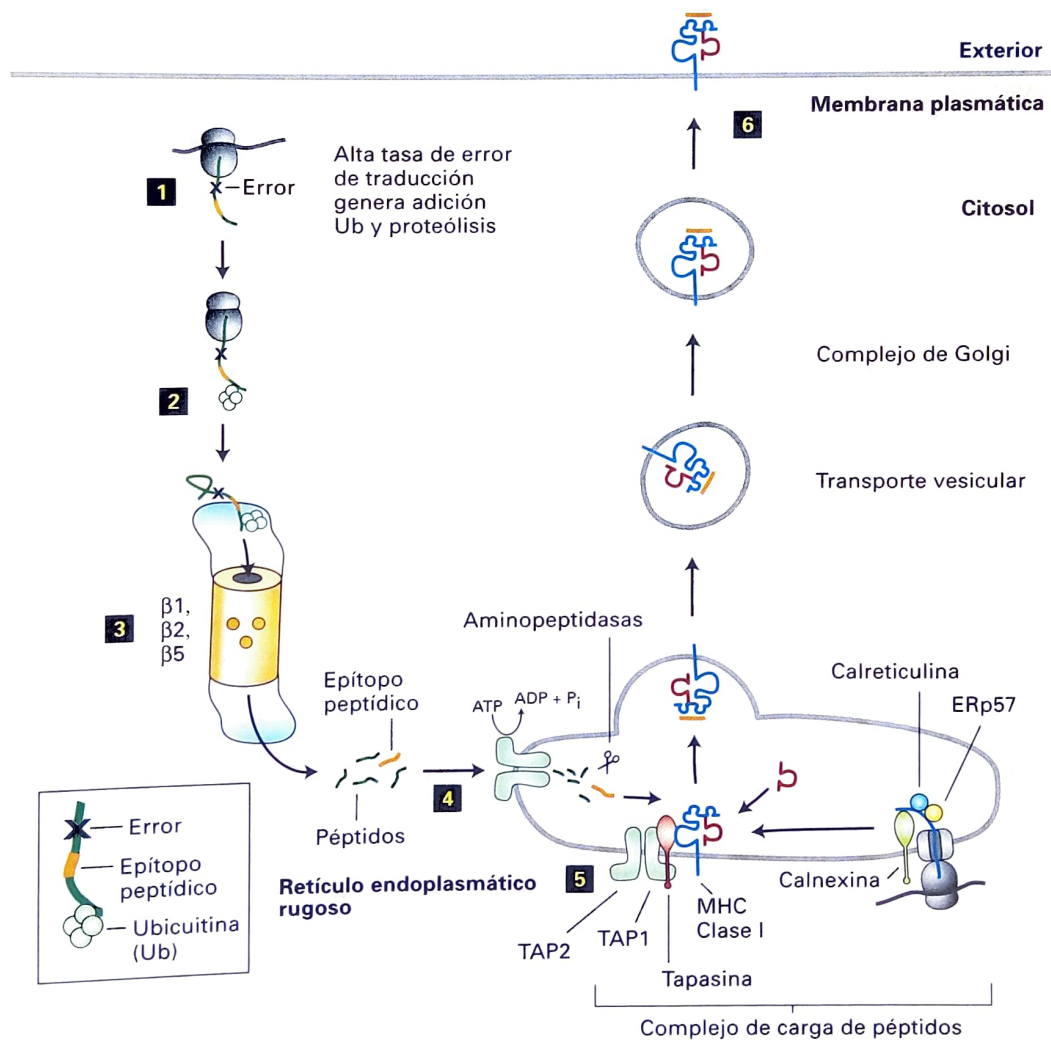


FIGURA 23-23 Vía MHC clase I de procesamiento y presentación

de antígenos. Paso **1**, la adquisición del antígeno es compatible con la producción de proteínas con errores (terminación prematura, mala incorporación). Paso **2**, las proteínas erróneamente plegadas son conjugadas con ubiquitina para ser diana de la degradación. Paso **3**, la proteólisis es llevada a cabo por el proteasoma. En las células expuestas al interferón γ , las subunidades catalíticas activas β del proteasoma son reemplazadas por

subunidades β con inmunidad específica inducida por interferón. Paso **4**, los péptidos son transportados al interior del retículo endoplasmático a través del transportador de péptidos TAP dimérico. Paso **5**, el péptido es cargado en la nueva molécula MHC clase I, dentro del complejo de carga de péptidos. Paso **6**, el complejo terminado péptido-MHC clase I es transportado a la superficie celular a través de la vía secretora. Véase el texto para más detalles.

como versiones negativas dominantes de otra proteína. La tasa de proteólisis citosólica debe coincidir con la tasa con la que se cometen errores en la síntesis y plegamiento de proteínas. Estas proteínas son una fuente importante de antígenos peptídicos para ser presentados por moléculas MHC clase I. Exceptuando la presentación cruzada (se analiza luego), la vía MHC clase I resulta en la formación de complejos péptido-MHC en el cual los péptidos son derivados de proteínas sintetizadas por la célula misma que porta el MHC clase I.

2 *Marcaje del antígeno para su destrucción:* el sistema de conjugación de ubiquitina es responsable principalmente de marcar una proteína para ser destruida (véase Cap. 3, p. 87). La conjugación de ubiquitina es una modificación covalente rigurosamente regulada.

3 *Proteólisis:* las proteínas conjugadas con ubiquitina son destruidas por proteólisis proteasómica. El proteasoma es una proteasa altamente procesadora que se une a sus sustratos y, sin liberar productos intermedios, da origen a productos de digestión final, péptidos cuyo tamaño va de 3 a 20 aminoácidos (véase Fig. 3-29). Durante el transcurso de una respuesta inflamatoria y en respuesta al interferón γ , las tres subunidades catalíticas β ($\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 5$) del proteasoma pueden ser remplazadas por tres subunidades inmunoespecíficas: $\beta 1i$, $\beta 2i$ y $\beta 5i$. Las subunidades $\beta 1i$, $\beta 2i$ y $\beta 5i$ están codificadas en el loci MHC. Los resultados netos de este reemplazo es la generación del *inmunoproteasoma*, cuyo producto cumple los requerimientos para poder unirse a antígenos mediante moléculas MHC clase I. El inmunoproteasoma ajusta la longitud promedio de los péptidos producidos y también los sitios donde ocurre la escisión. Dado el papel central del proteasoma en la generación de péptidos presentados por moléculas MHC clase I, los inhibidores de proteasoma interfieren potentemente con el procesamiento de antígenos a través de la vía MHC clase I.

4 *Entrega de péptidos a las moléculas MHC clase I:* la síntesis de proteínas, la conjugación de ubiquitina y la proteólisis proteasómica ocurren todas en el citoplasma, mientras que la unión de péptidos a moléculas MHC clase I ocurre en el lumen del retículo endoplasmático (RE). Por ende, los péptidos deben cruzar la membrana del retículo endoplasmático para tener acceso a las moléculas MHC clase I, un proceso mediado por el complejo TAP heterodimérico, un miembro de la **superfamilia ABC** de bombas impulsadas por ATP (véase Fig. 11-15). El complejo TAP une péptidos en la cara citoplasmática y, en un ciclo que incluye unión con ATP e hidrólisis, los péptidos son trasladados dentro del retículo endoplasmático. La especificidad del complejo TAP es de tal forma que solo puede transportar un subconjunto de todos los péptidos citosólicos, principalmente aquellos en el rango de 5 a 10 aminoácidos. El complejo TAP del ratón muestra una preferencia pronunciada por péptidos que terminan en leucina, valina, isoleucina o residuos de metionina, que concuerdan con la preferencia para unirse con las moléculas MHC clase I provenientes del complejo TAP. Los genes que codifican las subunidades TAP1 y TAP2 que componen el complejo TAP están ubicados en el loci MHC.

5 *Unión de péptidos a moléculas MHC clase I:* dentro del retículo endoplasmático, las moléculas MHC clase I recientemente sintetizadas son parte de un complejo multiproteína llamado complejo de carga de péptidos. Este complejo incluye dos chaperones (calnexina y

calreticulina) y la oxidorreductasa Erp75. Otra chaperona (tapasina) interactúa con el complejo TAP y la molécula MHC clase I que va a recibir el péptido. La proximidad física del TAP y la molécula MHC clase I se mantiene mediante tapasina. Una vez que el péptido ha sido cargado, un cambio conformacional libera la molécula MHC clase I del complejo de carga del péptido. Esta disposición asegura efectivamente que solo las moléculas cargadas con péptidos se muestren en la superficie celular.

6 *Presentación del complejo péptido-MHC clase I en la superficie celular:* una vez que el péptido ha sido cargado, el complejo péptido-MHC clase I es liberado del complejo de carga del péptido y entra en la vía secretora constitutiva (véase Fig. 14-1). La transferencia desde el Golgi hacia la superficie celular es rápida y completa la vía biosintética de un complejo péptido-MHC clase I.

La secuencia completa de eventos en la vía clase I ocurre constitutivamente en todas las células nucleadas que expresan moléculas MHC clase I y las demás proteínas requeridas o pueden ser inducidas a hacerlo. En ausencia de una infección viral, la síntesis de proteínas y la proteólisis generan continuamente un flujo de péptidos que son cargados en las moléculas MHC clase I. Por ende, células normales y saludables muestran en su superficie una selección representativa de péptidos derivados de proteínas propias. Podría haber varias miles de combinaciones MHC-péptidos distintas mostradas en la superficie de una célula nucleada típica. Linfocitos T en desarrollo en el timo calibran sus receptores específicos para cada antígeno en estos conjuntos de complejos péptido-MHC y aprenden a reconocer los productos MHC propios como el elemento de restricción del cual deben depender para reconocer antígenos. Al mismo tiempo, la muestra de péptidos propios por moléculas MHC propias en el timo permite que el linfocito T en desarrollo aprenda cuáles combinaciones MHC-péptido son derivadas de sí misma y deben ser ignoradas para evitar una reacción autoinmunitaria autodestructiva. El desarrollo del linfocito T es, entonces, guiado por moléculas MHC propias cargadas con péptidos propios, una plantilla sobre la cual un repertorio de linfocitos T puede ser moldeado. En términos simples, cualquier linfocito T que lleve un receptor que reaccione con mucha fuerza con complejos MHC-péptido propios es potencialmente peligroso cuando escapa del timo, y debe ser eliminado. Este es un aspecto del desarrollo de linfocitos T que será analizado más adelante.

Solo cuando aparece un virus los péptidos derivados de virus hacen una contribución para la muestra de complejos péptido-MHC. La eficiencia general de esta vía es tal que aproximadamente 4 000 moléculas de una proteína dada deben ser destruidas para generar un único complejo péptido-MHC que porte un péptido de ese polipéptido particular.

Un modo inusual de presentación del antígeno que es igualmente crucial en el desarrollo de linfocitos T citotóxicos es la *presentación cruzada*. Este término se refiere a la adquisición mediante células dendríticas de remanentes de apoptosis celular, complejos inmunitarios y, posiblemente, otras formas de antígenos por fagocitosis. A través de una vía que aún no se comprende en su totalidad, estos materiales escapan de los compartimentos fagosómicos/endosómicos hacia el citosol, donde son procesados de acuerdo con los pasos descritos anteriormente. Solo las células dendríticas son capaces de realizar presentación cruzada y permitir así la carga de moléculas MHC clase I unidas a péptidos que se derivan de células que no son la célula

misma que presenta el antígeno. La autofagia (véase Cap. 14) probablemente tenga un papel en este proceso.

La vía MHC clase II presenta antígenos entregados a la vía endocítica

Aunque las moléculas MHC clase I y clase II muestran un parecido estructural impactante, la forma en la que estas dos clases adquieren péptidos y su función en el reconocimiento inmunitario difiere en gran medida. Mientras que la función primaria de las moléculas MHC clase I es guiar los linfocitos T citotóxicos con receptores CD8 a las células diana, las moléculas MHC clase II sirven para guiar los linfocitos T *helper* con receptores CD4 a las células con las cuales interactúan, principalmente células profesionales de presentación de antígenos. Los linfocitos T CD4 activados proporcionan protección no solo a través de la asistencia a los linfocitos B para producir anticuerpos, sino también por los conjuntos complejos de citocinas que producen, que activan las células fagocíticas para que eliminen patógenos o ayudan a disparar una respuesta inflamatoria.

Como se remarcó previamente, las moléculas MHC clase II son expresadas sobre todo por células profesionales de presentación de antígenos: células dendríticas y macrófagos, que son fagocíticas, y linfocitos B, que no lo son. Por lo tanto, la vía MHC clase II de procesamiento y presentación de antígenos generalmente ocurre solo en estas células. Los pasos en esta vía se muestran en la Figura 23-24 y son descritos a continuación.

1 Adquisición del antígeno: en la vía MHC clase II, el antígeno es adquirido por pinocitosis, fagocitosis o endocitosis mediada por receptores. La pinocitosis, que es poco específica, involucra la entrega de un volumen de líquido extracelular, y las moléculas disueltas en él, a través de un proceso de fisión e invaginación de la membrana. La **fagocitosis**, ingestión de materiales particulares como bacterias, virus y los restos de células muertas, involucra una remodelación extensa del citoesqueleto basado en actina para poder incorporar la partícula entrante. Aunque la fagocitosis pueda ser iniciada por interacciones específicas entre receptor y ligando, estas no siempre son requeridas: incluso partículas de látex pueden ser ingeridas eficientemente por macrófagos. En el proceso de opsonización, los patógenos marcados con anticuerpos y ciertos componentes complementarios se convierten en el objetivo de macrófagos y células dendríticas al ser reconocidos por receptores para componentes complementarios en la superficie celular o receptores para la porción Fc de inmunoglobulinas, y luego son fagocitados (Fig. 23-25). Los macrófagos y las células dendríticas también expresan varios tipos de receptores menos selectivos (p. ej., lectinas tipo C, receptores tipo Toll, receptores carroñeros) que reconocen patrones moleculares en antígenos no particulares; el antígeno unido es internalizado por **endocitosis mediada por receptores**. Los linfocitos B, que no son fagocíticos, también pueden adquirir antígenos por endocitosis mediada por receptores utilizando sus receptores específicos para antígenos (inmunoglobulina superficial) (Fig. 23-26). Finalmente, antígenos citosólicos podrían entrar en la vía MHC clase II a través de autofagia (véase Fig. 14-35). Después de la formación de la copa autofágica, se forma una vesícula autofágica. Estas vesículas son de un tamaño que puede contener orgánulos dañados, y cantidades altas de citoplasma podrían ser encapsuladas en el proceso. Los autofagosomas resultantes están destinados a fusionarse con lisosomas,

donde los contenidos del autofagosoma quedan disponibles para la digestión por proteasas lisosómicas.

2 Marcaje del antígeno para su destrucción: la proteólisis se requiere para convertir el antígeno proteico intacto en péptidos de un tamaño adecuado para que se una a moléculas MHC clase II. Los antígenos proteicos se vuelven el objetivo para la degradación mediante desplegamiento progresivo, que ocurre por la caída en el pH cuando las proteínas avanzan a lo largo de la vía endocítica. El pH cuando las proteínas avanzan a lo largo de la vía endocítica. El pH del entorno extracelular se encuentra en alrededor de 7,2 y en endosomas tempranos está entre 6,5 y 5,5; en endosomas tardíos y lisosomas, el pH puede caer hasta 4,5. Bombas de protones clase V impulsadas por ATP en membranas endosómicas y lisosómicas son responsables de esta acidificación (véase Fig. 11-9). Las proteínas que se encuentran estables en un pH neutro tienden a desplegarse cuando son expuestas a pH extremos mediante la rotura de uniones de hidrógeno y desestabilización de los puentes salinos. Además, el entorno en los compartimientos endosómicos/lisosómicos se reduce, y los lisosomas alcanzan una concentración de equivalentes de reducción en el rango de los milimoles. La reducción de uniones bisulfuro que estabilizan muchas proteínas extracelulares es la contraparte de una modificación covalente, catalizada también por una tioreductasa inducible por exposición a IFN- γ . La acción combinada de pH bajo y entorno de reducción prepara al antígeno para la proteólisis.

3 Proteólisis: la degradación de proteínas en la vía MHC clase II es llevada a cabo por un gran conjunto de proteasas lisosómicas, colectivamente llamados catépsinas, que son proteasas aspartilas o cisteínas. Otras proteasas, como la endoproteasa específica de asparagina, podrían contribuir también a la proteólisis. Un rango amplio de fragmentos de péptidos son producidos, incluyendo algunos que pueden unirse a moléculas MHC clase II. Las proteasas lisosómicas operan de forma óptima a pH ácido dentro de los lisosomas. Consecuentemente, los agentes que inhiben la actividad de bombas de protones clase V interfieren con el procesamiento de antígenos, como también lo hacen los inhibidores de proteasas lisosómicas.

4 Encuentro de péptidos con moléculas MHC clase II: recuerde que la mayoría de las moléculas MHC clase II sintetizadas en el retículo endoplasmático son dirigidas a endosomas tardíos. Debido a que los péptidos generados por proteólisis residen en el mismo espacio topológico que las moléculas MHC clase II, la entrega de un péptido a una molécula MHC clase II no requiere el paso a través de una membrana. Por ende, el único requerimiento es permitir que los péptidos y las moléculas MHC clase II se encuentren. Esto se logra en el curso de la biosíntesis por un paso de ordenamiento que depende de la cadena invariante (Ii) y asegura la entrega del complejo clase II ($\alpha\beta\text{Ii}$)₃ a los compartimientos endosómicos.

5 Unión de péptidos a moléculas MHC clase II: el complejo ($\alpha\beta\text{Ii}$)₃ entregado a los compartimientos endosómicos es incapaz de unirse a un péptido porque las hendiduras específicas para cada péptido en las moléculas MHC clase II están ocupadas por la Ii. Por la misma razón, complejos ($\alpha\beta\text{Ii}$)₃ recientemente ensamblados no compiten por péptidos destinados al MHC clase I entregados por el retículo endoplasmático a través del TAP: su sitio de unión a péptidos ya se encuentra ocupado por la Ii. Recuérdese que el retículo endo-

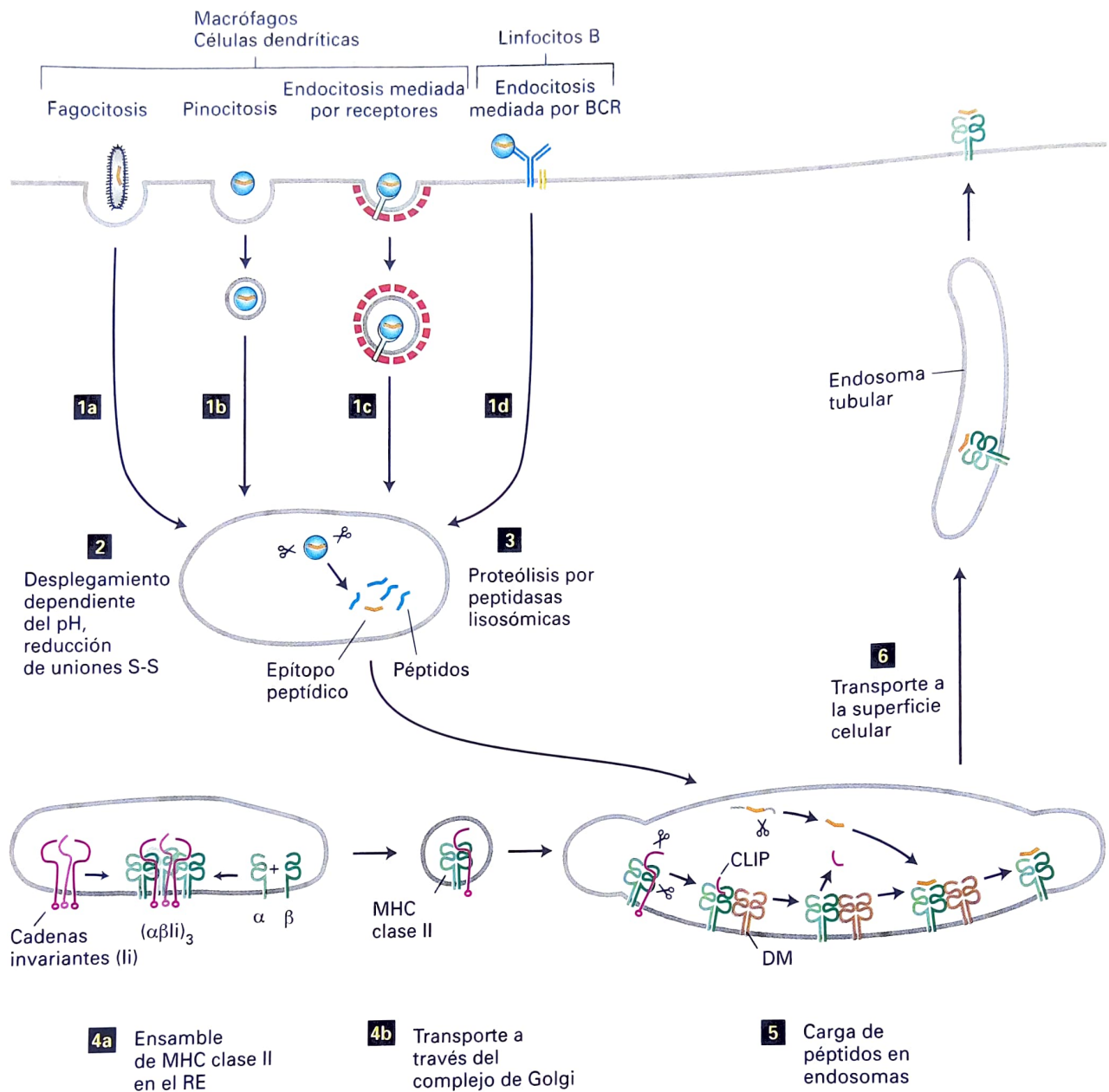


FIGURA 23-24 Vía MHC clase II de procesamiento y presentación de antígenos.

Paso **1**: los antígenos particulares son obtenidos mediante fagocitosis, y los antígenos no particulares, mediante pinocitosis. Paso **2**: la exposición del antígeno al bajo pH y el entorno de reducción de endosomas y lisosomas preparan al antígeno para la proteólisis. Paso **3**: el antígeno es desintegrado por varias proteasas en los compartimentos endosómicos y lisosómicos. Paso **4**: las moléculas MHC clase II, ensambladas en sus subunidades en el retículo endoplasmático, son entregadas a los

compartimentos endosómicos/lisosómicos por medio de señales contenidas en la cadena invariante (Ii) asociada. Esta entrega toma como diana endosomas tardíos, lisosomas y endosomas precoces, asegurándose que las moléculas MHC clase II estén expuestas a los productos de la desintegración proteolítica del antígeno a lo largo de todo el camino endocítico. Paso **5**: la carga del péptido se logra con la ayuda de la DM, una proteína chaperona semejante al MHC clase II. Paso **6**: presentación de moléculas MHC clase II cargadas con péptidos en la superficie celular. Véase el texto para más detalles.

plasmático es el sitio donde las moléculas MHC clase I y clase II se reúnen. La presencia de Ii en los complejos MHC clase II nacientes asegura que solo moléculas MHC clase I se unan a péptidos en el retículo endoplasmático. Las mismas proteasas que actúan sobre antígenos internalizados y los degradan en péptidos también actúan sobre los complejos $(\alpha\beta Ii)_3$, lo que resulta en una eliminación del Ii, excepto una porción pequeña denominada segmento CLIP. Debido a que se encuentra unido firmemente a la hendidura para unión de

péptidos MHC clase II, el CLIP es resistente al ataque proteolítico. Las moléculas MHC clase II son también resistentes al desplegamiento y al ataque proteolítico en las condiciones que prevalecen en la vía endocítica. El segmento CLIP es eliminado a través de la interacción del complejo $\alpha\beta$ CLIP con una chaperona, DM. La nueva hendidura vaciada de la moléculas MHC clase II puede ahora unirse a péptidos que son abundantes en la vía endocítica. Aunque la proteína DM está codificada por el MHC y estructuralmente es

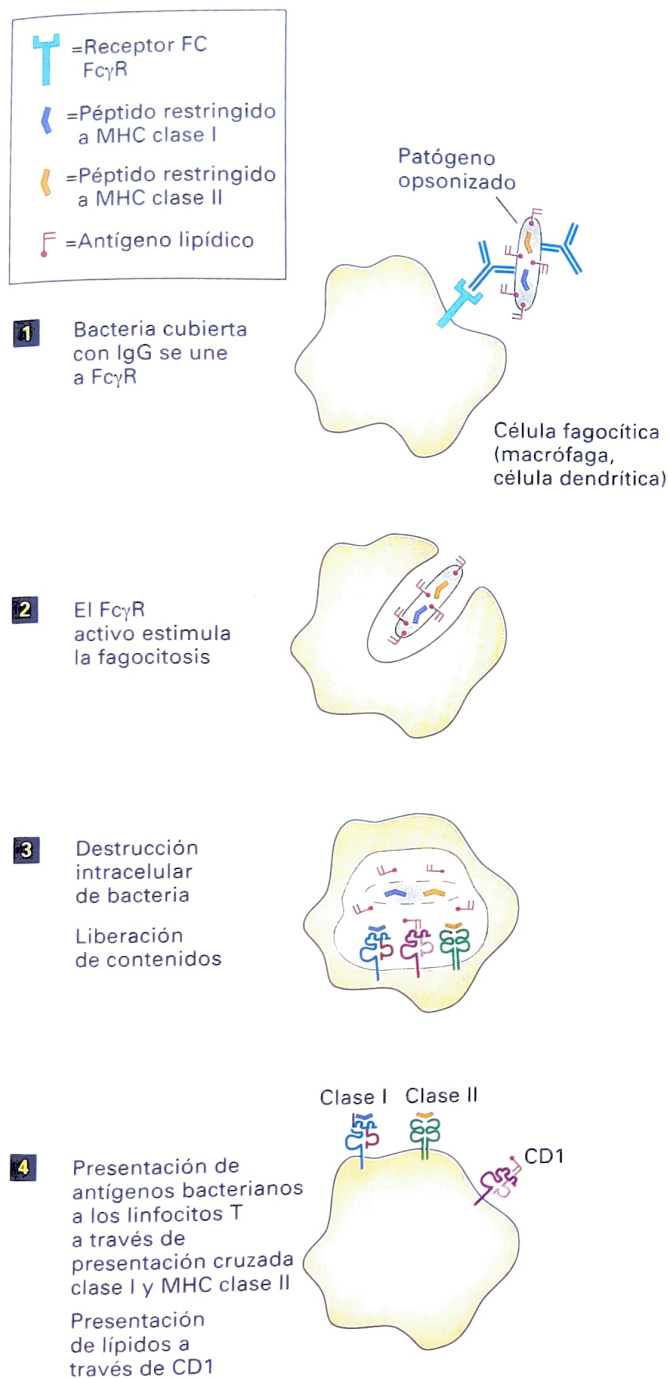


FIGURA 23-25 Presentación del antígeno opsonizado mediante células fagocíticas. Por medio de receptores Fc (como FcγR) presentados en la superficie celular, las células fagocíticas especializadas como macrófagos o células dendríticas pueden atrapar e ingerir patógenos que han sido cubiertos con anticuerpos (opsonización). Después de la digestión de la partícula fagocitada (p. ej., virus, bacterias o complejos inmunitarios), algunos de los péptidos producidos, incluyendo fragmentos del patógeno (naranja), son cargados en moléculas MHC clase II (verde). Los complejos péptido-MHC clase II presentados en la superficie permiten la activación de linfocitos T específicos para estas combinaciones MHC-péptido. Los antígenos lipídicos son entregados a la molécula CD1 (semejante al MHC Clase I), cuyo sitio de unión está especializado para alojar lípidos. Ciertos péptidos derivados de patógenos (púrpura) podrían ser entregados a productos MHC clase I (azul) por medio de presentación cruzada. El mecanismo detrás de la presentación cruzada todavía no ha sido clarificado.

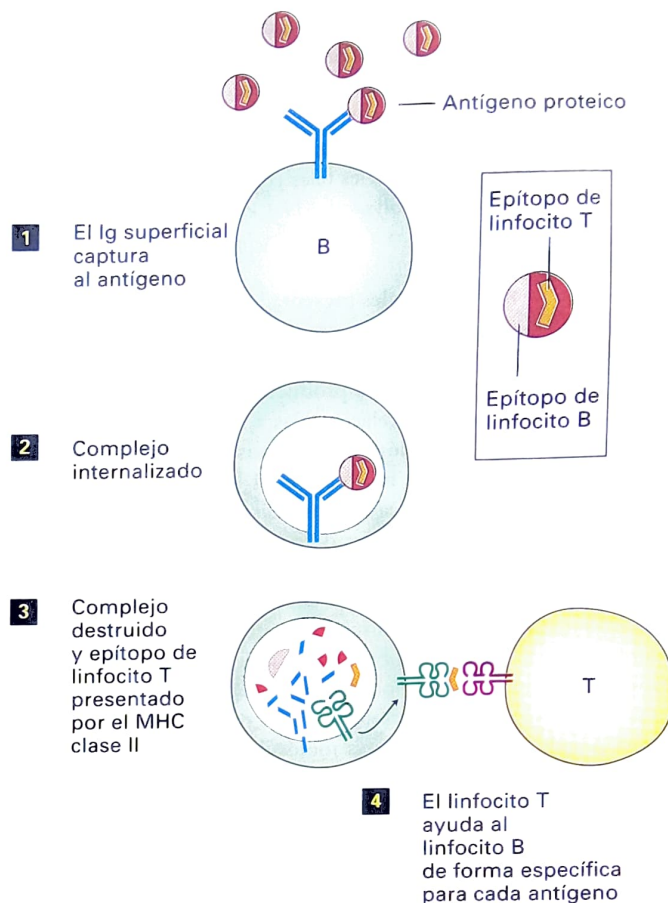


FIGURA 23-26 Presentación de antígenos por células B. Los linfocitos B se unen a antígenos, incluso si están presentes en bajas concentraciones, a sus receptores o a la Ig de superficie. El complejo inmunitario que resulta de esto es internalizado y luego entregado a los compartimentos endosómicos/lisosómicos, donde es destruido. Los péptidos liberados del complejo inmunitario, incluyendo fragmentos del antígeno proteico, son presentados como complejos péptido-MHC clase II en la superficie celular. Los linfocitos T CD4 específicos para el complejo presentado pueden ahora ayudar al linfocito B. Esta ayuda es específica para cada antígeno y restringida por el MHC.

muy similar a las moléculas clase II, no puede unirse ella misma a péptidos. Sin embargo, los complejos MHC clase II-péptidos recientemente formados son ellos mismos susceptibles a “ediciones” por el DM al eliminar estos el péptido unido, hasta que la molécula MHC clase II adquiera un péptido que se una tan fuertemente que no pueda ser eliminado por interacciones del complejo con DM. Los complejos MHC clase II-péptido resultantes son extremadamente estables, con una semivida estimada de más de 24 horas.

6 *Presentación del complejo péptido-MHC clase II en la superficie celular:* los nuevos complejos péptido-MHC clase II se localizan principalmente en compartimentos de endosomas tardíos, que incluyen endosomas multivesiculares (o cuerpos) (véase Fig. 14-33). El reclutamiento de vesículas internas de los cuerpos multivesiculares a la membrana delimitante expande su área superficial: mediante un proceso de tu-

bulación a lo largo de tramos de microtúbulos, estos compartimientos se alargan y finalmente entregan complejos péptido-MHC clase II a la superficie por fusión de membranas. Estos eventos están fuertemente regulados: la tubulación y la entrega de moléculas MHC clase II a la superficie es favorecida en células dendríticas y macrófagos que siguen su activación en respuesta a señales tales como lipopolisacáridos bacterianos (LPS, *bacterial lipopolysaccharide*), de detectados por sus receptores tipo Toll.

Para las células profesionales presentadoras de antígenos, los pasos descritos son constitutivos: ocurren todo el tiempo, pero pueden ser modulados por la exposición a agentes microbianos y citocinas. Además de las vías descritas para productos MHC clase I y II, existe una categoría de moléculas relacionadas a las MHC clase I que se especializan en la presentación de antígenos lipídicos, las proteínas CD1. La estructura de una molécula CD1 se asemeja a la de una molécula MHC clase I: una cadena pesada en un complejo con $\beta 2$ -microglobulina. Muchas especies de bacterias producen lípidos de una estructura química que no se encuentra en sus huéspedes mamíferos. Estos lípidos pueden servir como antígenos reconocidos en la defensa del huésped cuando son presentados por moléculas CD1, durante la cual se unen a un bolsillo de unión a lípidos que es conceptualmente similar a los bolsillos que se unen a péptidos de una molécula MHC regular. Las señales en la cola citoplasmática de la cadena pesada CD1 dirigen estas moléculas a los compartimientos endolisosómicos, donde la carga con lípido ocurre. El complejo CD1-lípido se une a una clase prominente de linfocitos T, llamadas células NKT, basándose en sus características superficiales, y también se unen a linfocitos T $\gamma\delta$, descritas más adelante. Las células NKT cumplen un papel importante en la producción de citocina y ayudan a iniciar y orquestar respuestas inmunes adaptativas mediante citocina.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 23.4

El MHC y la presentación del antígeno

- El MHC, la región genética responsable por la aceptación o el rechazo de injertos, codifica dos clases mayores de glucoproteínas tipo I, moléculas MHC clase I y II. Estas proteínas son altamente polimórficas, al ocurrir en diferentes variaciones alélicas en una población exogámica (véase Fig. 23-19).
- La función de los productos MHC es unirse a péptidos y presentarlos a los receptores específicos para cada antígeno en los linfocitos T. Las moléculas MHC clase I se encuentran en la mayoría de las células nucleadas, mientras que la expresión de moléculas MHC clase II está confinada principalmente a células presentadoras de antígenos profesionales como células dendríticas, macrófagos y linfocitos B.
- La organización y la estructura de moléculas MHC clase I y II es similar e incluye una región especializada para la unión de una gran variedad de péptidos (véase Fig. 23-21).
- Distintas variaciones alélicas de moléculas MHC se unen a diferentes conjuntos de péptidos, debido a que las diferencias que distinguen un alelo de otro incluyen residuos que definen la arquitectura de la

hendidura de unión a péptidos (véase Fig. 23-22). Los residuos alélicos también incluyen residuos contactados por el receptor de antígenos también incluyen residuos diferentes variantes alélicas de un gen en el linfocito T. Por eso, diferentes variantes alélicas de una molécula MHC, incluso si fueran a unirse a péptidos idénticos, no reaccionarán con un receptor de linfocito T diseñado para interactuar con solo una de las moléculas alélicas MHC. Este fenómeno se llama restricción MHC.

- Las moléculas MHC clase I y clase II toman muestras de compartimientos intracelulares diferentes: las moléculas clase I toman muestras de materiales predominantemente citosólicos, mientras que las moléculas clase II lo hacen de materiales extracelulares adquiridos por fagocitosis, pinocitosis o endocitosis mediada por receptores.
- El proceso mediante el cual antígenos proteicos son adquiridos, procesados en péptidos y convertidos en complejos péptido-MHC presentados en la superficie se conoce como procesamiento y presentación de antígenos. Este proceso opera continuamente en células que expresan sus moléculas MHC relevantes, aunque puede ser modulado en el transcurso de una respuesta inmunitaria.
- El procesamiento y presentación de antígenos puede ser dividido en seis pasos discretos: (1) adquisición del antígeno, (2) marcaje del antígeno para su destrucción, (3) proteólisis, (4) entrega del péptido a las moléculas MHC, (5) unión del péptido a la molécula MHC, y (6) presentación de la molécula MHC cargada con el péptido en la superficie celular (véanse Figs. 23-25 y 23-26).

23.5 Linfocitos T: receptores y desarrollo

Los linfocitos T reconocen el antígeno a través de las moléculas del MHC. Los receptores a los que se ha confiado esta tarea se encuentran relacionados estructuralmente con las inmunoglobulinas. Para generar estos receptores específicos de antígenos, los linfocitos T reorganizan y recombinan los genes que codifican las subunidades del receptor de linfocito T (TCR) por medio de mecanismos de recombinación somática idénticos a los utilizados por los linfocitos B para recombinar los genes de inmunoglobulinas. El desarrollo de los linfocitos T es también estrictamente dependiente de que se complete con éxito la reorganización somática genética que produce las subunidades TCR. Describiremos las subunidades que median el reconocimiento de un antígeno específico, cómo se emparejan con las glucoproteínas de membranas esenciales para la transducción de señales y cómo estos complejos reconocen las combinaciones entre MHC y péptidos.

Como se ha señalado en la sección precedente, los linfocitos T reconocen el antígeno solamente con las moléculas polimórficas de MHC que se encuentran presentes en ese huésped. En el curso de su desarrollo, los linfocitos T deben “aprender” a identificar esas moléculas de MHC “propias” y recibir instrucciones acerca de qué combinaciones de péptidos y MHC ignorar, de modo tal de evitar una potencial reactividad catastrófica en tejidos propios del huésped (autoinmunidad). Describiremos cómo se desarrollan los linfocitos T e introduciremos las principales clases de linfocitos T de acuerdo con su función.

La estructura del receptor de linfocito T se asemeja a la porción F(ab) de una inmunoglobulina

De modo similar a como las linfocitos B utilizan sus receptores para reconocer antígenos y luego traducen las señales que conducen a su expansión clonal, los linfocitos T utilizan sus **receptores de linfocito T**. Los linfocitos T que han sido activados a través de sus receptores de antígenos específicos proliferan y adquieren la capacidad de matar células que porten el antígeno o de secretar citocinas que asistirán a las linfocitos B en su diferenciación. El receptor de linfocito T para antígeno reconoce el complejo de moléculas de MHC con los péptidos apropiados.

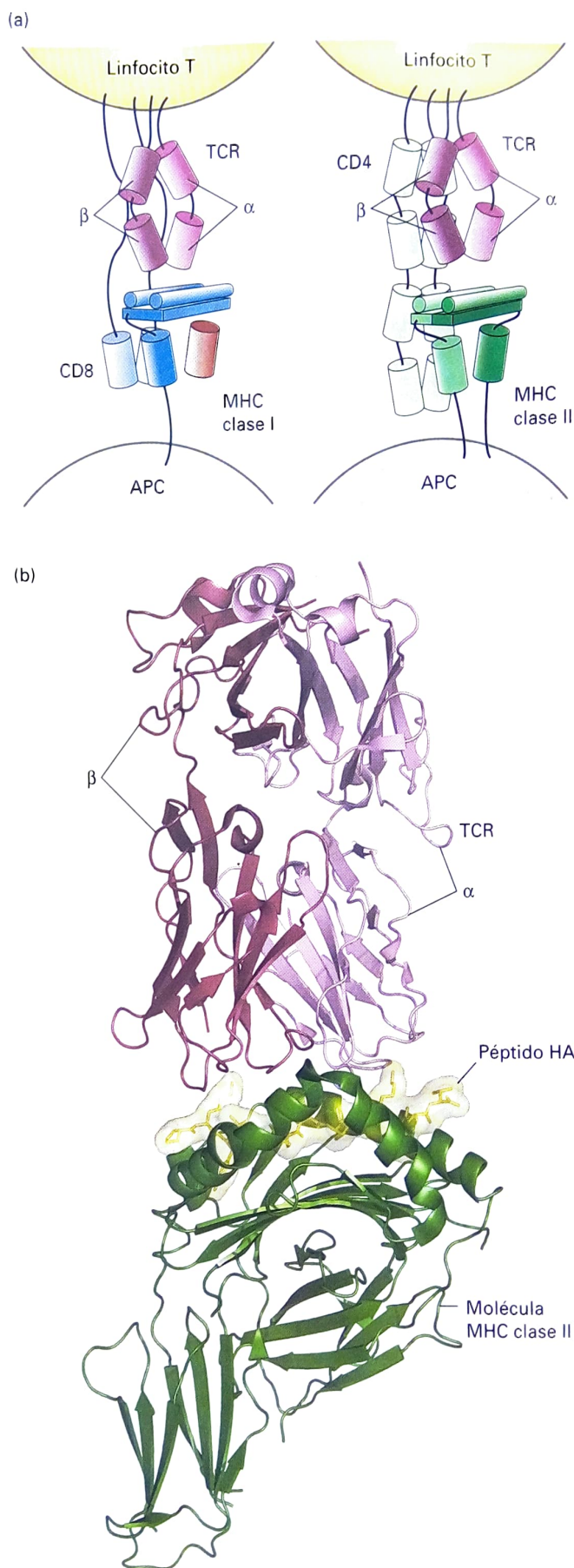
El receptor de linfocito T (Fig. 23-27) se compone de dos subunidades glucoproteicas, y cada una es codificada por una reorganización genética somática. Los receptores están compuestos por un par $\alpha\beta$ o un par $\gamma\delta$. La estructura de estas subunidades tiene similitud estructural con la porción F(ab) de una inmunoglobulina: en el extremo terminal N existe un dominio variable, seguido de un dominio de región constante y un segmento transmembrana. Las colas citoplasmáticas de las subunidades TCR son demasiado cortas para permitir el reclutamiento de factores citosólicos que asistan en la transducción de señales. En cambio, el TCR se asocia con el complejo CD3, un conjunto de proteínas de membrana compuesto por cadenas γ , δ , ϵ y ζ . (Las subunidades γ y δ de TCR no deben ser confundidas con las subunidades del complejo CD3 designadas de modo similar). La cadena ϵ forma un dímero no covalente con la cadena γ o δ para producir los complejos $\epsilon\gamma$ y $\epsilon\delta$. El dominio externo de las subunidades de CD3 es homólogo a los dominios de inmunoglobulinas, y el dominio citoplasmático en cada uno contiene un dominio ITAM a través del cual las moléculas adaptadoras pueden ser reclutadas por fosforilación de residuos de tirosina en las ITAM. La cadena ζ se encuentra integrada dentro del complejo CD3-TCR como un homodímero unido a través de un puente disulfuro, y cada cadena ζ contiene tres motivos ITAM.

Los genes TCR son reordenados de manera similar a los genes de inmunoglobulinas

Virtualmente, todos los receptores de antígeno específico generados por recombinación somática contienen una subunidad que es producto de la recombinación V-D-J (p. ej., la cadena pesada Ig; la cadena β TCR) y de una subunidad producida por la recombinación V-J (p. ej., la cadena ligera de Ig; la cadena α TCR). El mecanismo de recombinación de los loci V-D-J y V-J de TCR es esencialmente

FIGURA 23-27 Estructura del receptor de linfocito T y sus correceptores.

(a) El receptor de linfocito T (TCR) para antígeno está compuesto por dos cadenas, la subunidad α y β , que son producidas por recombinación V-J y V-DJ respectivamente. Las subunidades $\alpha\beta$ deben asociarse con el complejo CD3 (véase Fig. 23-29) para permitir la transducción de señales. Se requiere la formación de un complejo TCR $\alpha\beta$ -CD3 completo para la expresión en superficie. El receptor de linfocito T luego se asocia con los correceptores CD8 (azul claro) o CD4 (verde claro), que permiten la interacción con características conservadas de moléculas de MHC clase I y MHC clase II, respectivamente, en células presentadoras de antígeno. (b) Estructura de receptor de linfocito T unido a un complejo péptido-MHC, determinado por cristalografía. (Parte [b] basado en J. Hennecke, 2000, *EMBO J.* 19:5611.)



idéntico al descrito para genes de inmunoglobulinas y requiere de las proteínas componentes que conforman la maquinaria no homóloga de unión de extremos: RAG-1, RAG-2, Ku70, Ku80, subunidad catalítica DNA-PK, XRCC4, DNA ligasa IV y Artemis. Hay un requerimiento absoluto de secuencias señal de recombinación (RSS, *recombination signal sequences*), y la recombinación obedece la regla de espaciadores 12/23 (Fig. 23-28). Existe un número de características notables en la organización y recombinación de loci de TCR. Primero, la organización de la señal de recombinación es tal

que las recombinaciones D a D son permitidas. Segundo, la enzima desoxinucleotidiltransferasa terminal (TdT) se encuentra activa en el momento que los genes TCR se reorganizan, y así los nucleótidos N pueden estar presentes cuando se reorganizan los genes TCR. Tercero, en el ser humano y en el ratón, el loci TCR δ se encuentra embebido dentro del loci TCR α . Esta organización resulta en una completa escisión del loci δ interpuesto cuando ocurre la reorganización de TCR α ; por lo tanto, una elección del loci TCR α para reorganización imposibilita la utilización del loci δ , que se pierde

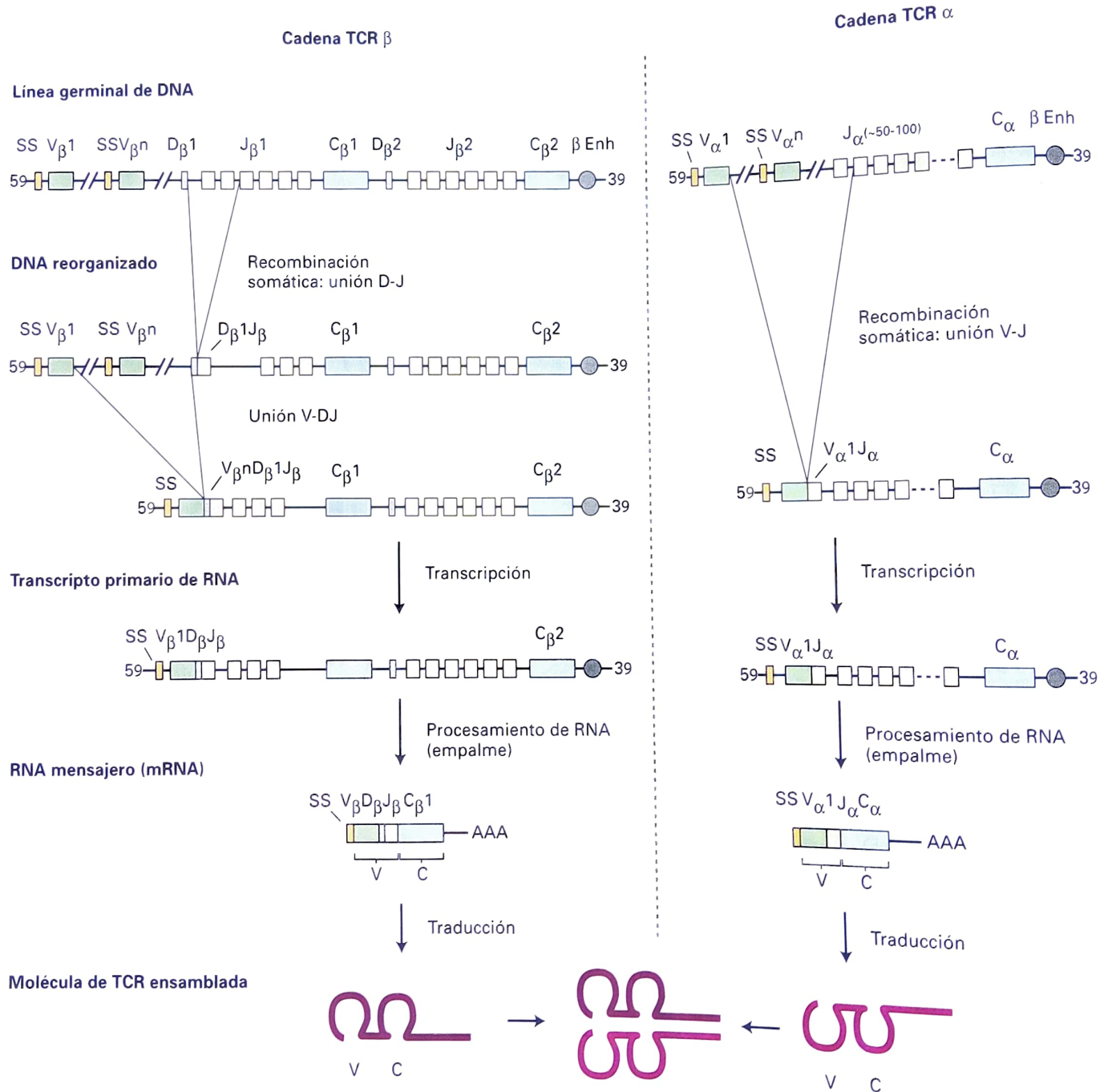


FIGURA 23-28 Organización y recombinación de loci de TCR. La organización de los loci TCR es en principio similar a la de los loci de inmunoglobulina (véase Fig. 23-14). Izquierda: el loci de cadena β de TCR incluye un grupo de segmentos V, un grupo de segmentos D y varios segmentos J corriente abajo de donde hay dos regiones constantes. El

ordenamiento de las señales de recombinación es tal que permite no solamente la unión D-J, sino también la unión V-DJ. No se ha observado unión por un grupo de segmentos V y un gran número de segmentos J. SS = exón codificador de la secuencia señal; Enh = potenciador.

por delección. Los linfocitos T que expresan el receptor $\alpha\beta$ y aquellos que expresan el receptor $\gamma\delta$ son considerados linajes separados con funciones diferentes. Dentro de los linfocitos T que expresan los receptores $\gamma\delta$ existen algunos capaces de conocer la molécula CD1, que se especializa en la presentación de antígenos lipídicos. Los linfocitos T $\gamma\delta$ están programados para residir en distintos sitios anatómicos (p. ej., el epitelio que recubre el aparato genital, la piel) y probablemente cumplan un papel en la defensa del huésped contra patógenos que se hallen comúnmente en estos sitios.

Deficiencias en los componentes clave del aparato de recombinación, como en las recombinasas RAG, excluyen la reorganización de genes TCR. Como hemos visto para los linfocitos B, y como describiremos a continuación para los linfocitos T, el desarrollo de los linfocitos es estrictamente dependiente de la reorganización de genes del receptor de antígeno. Una deficiencia en RAG impide el desarrollo de linfocitos T y linfocitos B.

Los receptores de linfocitos T son muy diversos, con muchos de sus residuos variables codificados en las uniones entre los segmentos genéticos V, D y J

La diversidad creada por la recombinación genética somática es enorme, y se estima que excede los 10^{10} receptores. El uso de combinaciones de distintos segmentos V, D y J realiza una contribución importante, como también lo hacen los mecanismos de imprecisión en la unión y la adición de nucleótidos N, como se ha discutido en las recombinaciones genéticas de inmunoglobulinas. El resultado final es un grado de variabilidad en las regiones V que iguala la de las CDR3 de las inmunoglobulinas (véase Fig. 23-12). En efecto, cada región variable de TCR incluye tres CDR, equivalentes a los de BCR. Pero a diferencia de los genes de inmunoglobulinas, los genes de TCR no sufren hipermutación somática. Es por ello que los receptores de linfocitos T no tienen la madurez en la afinidad que tienen los anticuerpos en el curso de la respuesta inmunitaria, y tampoco tienen conmutación de clase o la opción de utilizar distintos sitios poliadenilicos para crear versiones solubles o unidas a membranas de receptores de antígenos específicos.

Se ha resuelto la estructura cristalina de un número de receptores de linfocito T unidos a los complejos de péptidos-MHC clase I o péptidos-MHC clase II. Estas estructuras presentan variabilidad en el modo que el receptor de linfocito T se acopla al complejo péptido-MHC, pero los contactos más extensos en la región CDR3 somáticamente diversificada se realizan con la porción peptídica central del complejo, con CDR1 codificado en la línea germinal y CDR2 en contacto con las hélices α de las moléculas MHC. Muchos de los receptores de linfocitos T cuya estructura ha sido resuelta se localizan diagonalmente a través de la porción de unión al péptido del complejo péptido-MHC. Como resultado, el receptor de linfocito T realiza contactos extensos con la carga peptídica como también con las hélices α de la molécula de MHC a la que se une. Las posiciones en las que las moléculas MHC alélicas difieren unas de otras involucran residuos que contactan directamente al receptor de linfocito T, lo cual excluye una unión con el alelo “incorrecto”.

Las diferencias en aminoácidos que distinguen un alelo MHC de otro también afectan la arquitectura de la hendidura de unión peptídica. Incluso si los residuos MHC que interactúan directamente con el receptor de linfocito T fueran compartidos por dos moléculas MHC alélicas, su especificidad de unión a péptido probablemente se-

ría distinta debido a diferencias en aminoácidos en la hendidura de unión peptídica. En consecuencia, los residuos de TCR en contacto proporcionados por un péptido unido, y esenciales para una interacción estable con un receptor de linfocito T, estarían ausentes de la combinación péptido-MHC “incorrecta”. Es poco probable que ocurra una interacción productiva con un receptor de linfocito T.

La señalización a través de receptores de antígeno específico provoca la proliferación y diferenciación de linfocitos T y B

Los receptores de linfocitos B y linfocitos T para antígenos traducen señales por medio de proteínas asociadas con porciones del receptor para un antígeno específico (p. ej., la cadena pesada y la ligera de Ig para BCR; las cadenas α y β para TCR). Las porciones citosólicas del receptor antígeno específico son cortas, no sobresalen demasiado en la parte interna de la membrana plasmática y son incapaces de reclutar moléculas de señalización corriente abajo. En cambio, como se discutió previamente, los receptores antígeno específicos en linfocitos T y B se asocian con subunidades auxiliares que contienen ITAM (motivos de activación del inmunoreceptor basado en tirosina, *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*). La unión de receptores antígeno específicos a ligandos inicia una serie de eventos próximos al receptor: activación de cinasas, modificación de ITAM y reclutamiento de moléculas adaptadoras que sirven para reclutar otras moléculas corriente abajo.

Como se muestra en la Figura 23-29, la unión del receptor antígeno específico activa la familia Src de tirosincinasa (p. ej., Lck en linfocitos T CD4; Lyn y Fyn en linfocitos B). Estas cinasas se encuentran muy próximas o físicamente asociadas con el receptor de antígeno. Las cinasas Src fosforilan el ITAM en las subunidades auxiliares del receptor de antígeno. En su forma fosforilada, los ITAM reclutan y activan tirosincinasas de familias que no sean Src (ZAP-70 en linfocitos T, Syk en linfocitos B), como también otras moléculas adaptadoras. Dicho reclutamiento y activación involucra a la fosfoinositida fosfolipasa C_γ y cinasas PI-3. Los eventos subsecuentes que ocurren corriente abajo son similares a aquellos analizados en el Capítulo 16 para señalización de receptores tirosincinasa. Los receptores antígeno específicos en linfocitos B y T son quizás los receptores “modulares” de tirosincinasa mejor caracterizados, con las unidades reconocedoras de ligandos y los dominios de cinasas realizados por moléculas separadas. En última instancia, la señalización a través de receptores antígeno específicos inicia un programa de transcripción que determina el destino de los linfocitos activados: proliferación y diferenciación.

Los linfocitos T dependen críticamente de la citocina interleucina 2 (IL-2) para su expansión clonal. Después de la estimulación de un linfocito T por antígeno, uno de los primeros genes en ser activados es el de la IL-2. El linfocito T responde a su propio incremento en IL-2 y procede a crear más IL-2, un ejemplo de estimulación autocrina y parte de un circuito positivo de retroalimentación. Un factor de transcripción importante requerido para la inducción de la síntesis de IL-2 es la proteína NF-AT (factor nuclear activado por linfocitos T). Esta proteína se encuentra secuestrada en el citoplasma en la forma fosforilada y no es capaz de ingresar en el núcleo a menos de que antes sea desfosforilada. La fosfatasa responsable es la calcineurina, una enzima activada por Ca^{+2} . El incremento inicial de Ca^{+2} en el citosol conduce a la activación de calcineurina, y resulta

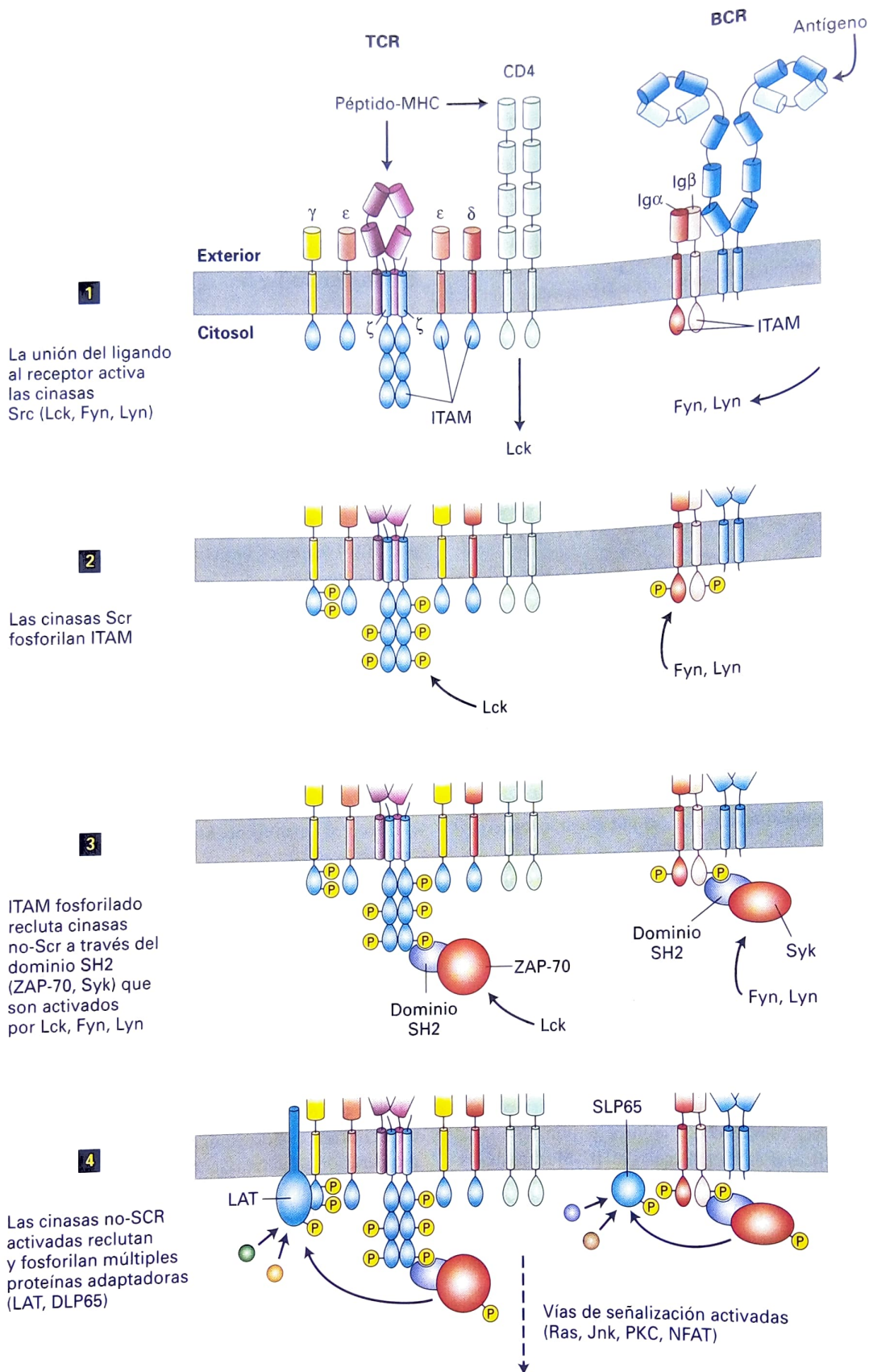


FIGURA 23-29 Transducción de señales desde el receptor de linfocito T (TCR) y el receptor de linfocito B (BCR). Las vías de transducción de señales utilizadas por los receptores de antígeno específico de los linfocitos T (izquierda) y linfocitos B (derecha) son conceptualmente similares. Se

representan en esta figura los eventos de señalización corriente abajo que producen cambios en la expresión de genes que resultan en la proliferación y diferenciación de los linfocitos estimulados por antígeno. Véase el texto para mayor detalle.

en la movilización del Ca^{+2} que reside en el retículo endoplasmático causado por hidrólisis de PIP_2 y la generación concomitante de IP_3 (véase Fig. 15-36, pasos 2-4).



El fármaco inmunosupresor ciclosporina inhibe la actividad de la calcineurina a través de la formación del complejo ciclosporina y ciclofilina, que se une e inhibe la calcineurina. Si se suprime la desfosforilación de NF-AT, este no puede ingresar en el núcleo y participar de la regulación corriente arriba de la transcripción del gen de IL-2. Esto impide la expansión de linfocitos T estimulada por antígeno, y así conduce a la inmunosupresión, y podría decirse que es la intervención más importante que contribuye a un trasplante de órgano exitoso. A pesar de que el trasplante de órganos varía con el órgano utilizado, la disponibilidad de inmunosupresores fuertes como la ciclosporina ha expandido enormemente las posibilidades de trasplantes clínicos. ■

Los linfocitos T capaces de reconocer moléculas de MHC se desarrollan a través de procesos de selección negativa y positiva

El reordenamiento de segmentos genéticos que son ensamblados en un receptor de linfocito T funcional es un evento estocástico que se completa con un linfocito T que no tiene conocimiento previo de las moléculas de MHC con las que estos receptores deberán interactuar. De modo similar a la recombinación somática de loci de cadena pesada de Ig en linfocitos B, los primeros segmentos genéticos TCR en reorganizarse son los elementos β TCR D y J, seguido de la unión de un segmento V a los JD recién reordenados. En este estadio de desarrollo del linfocito T, una reorganización productiva permite la síntesis de la cadena β TCR, que es incorporada al pre-TCR a través de la asociación con su subunidad α . Este pre-TCR cumple una función estrictamente análoga a la de pre-BCR en el desarrollo de linfocitos B: le indica al linfocito T que ha completado exitosamente un reordenamiento productivo, sin necesidad de realizar reordenamientos luego en el alelo opuesto. Permite la expansión de linfocitos T que han realizado exitosamente el reordenamiento e impone exclusión alélica de modo de asegurarse que, por regla, solo sea generada una única subunidad β TCR para un determinado linfocito T y sus descendientes. Luego, comienza la expresión de RAG, y después de que la fase de expansión de células pre-T haya sido completada, se inicia nuevamente la expresión de RAG para permitir el reordenamiento del loci α de TCR, que conducirá luego a la generación de linfocitos T con un receptor $\alpha\beta$ completamente ensamblado. La Figura 23-30 ilustra los pasos análogos en el desarrollo de linfocitos B y T.

¿Cómo se conforma el nuevo repertorio de linfocitos T para que pueda ocurrir una interacción productiva con moléculas MHC propias? La naturaleza aleatoria del proceso de reordenamiento genético y la enorme variabilidad generada en consecuencia producen un grupo de receptores de linfocito T, de los cuales la mayoría no puede interactuar productivamente con los productos MHC del huésped. Recuerdese que el procesamiento del antígeno y la presentación son procesos constitutivos, y que en el timo, donde tiene lugar la selección de eventos, todas las moléculas MHC propias se encuentran necesariamente ocupadas con péptidos derivados de proteínas propias. Estas combinaciones de complejos de péptidos propios con moléculas MHC clase I y

moléculas MHC clase II constituyen el modelo sobre el cual el grupo inicial de receptores de linfocitos T debe ser calibrado.

Los linfocitos T generados con receptores que no pueden unirse a MHC propias son inútiles. Dichos linfocitos T no podrán percibir señales de supervivencia a través de los receptores de linfocito T recientemente generados y morirán. En el otro extremo, se encuentran los linfocitos T dotados de receptores que muestran un ajuste perfecto al complejo MHC propio con un péptido en particular. Estos linfocitos T, si se les permite abandonar el timo y residir en los órganos linfoides periféricos, serán por definición autorreactivos y podrán causar autoinmunidad. Si el número de dichas combinaciones de MHC con péptidos propios sobrepasa un límite suficientemente alto como para activar los receptores T, esos linfocitos T recibirán instrucciones de morir en el timo por apoptosis, el destino final de la gran mayoría de los linfocitos que ingresan y se expanden en el timo. Esto se denomina selección negativa y sirve para limpiar el repertorio de linfocitos T extremadamente autorreactivos. Cualquier linfocito T equipado con un receptor que percibe señales lo suficientemente fuertes como para permitir su supervivencia pero por debajo del límite que le impulsa a realizar apoptosis, recibirá una señal de supervivencia y será seleccionado positivamente. La heterogeneidad de los complejos péptido-MHC presentados en la superficie de los linfocitos T y sometidos a selección, hace que sea altamente probable que el receptor de linfocito T interprete la señal no solo de modo cualitativo (fuerza, duración), sino también aditivo: la suma de energías de unión en las diferentes combinaciones de péptidos propios MHC que se presentan ayuda a determinar el resultado de la selección. Esto se denomina *modelo de avidez de selección de linfocitos T*.

Los linfocitos T son eliminados por apoptosis solo si un antígeno propio y apropiado es presentado adecuadamente en el timo como un complejo péptido-MHC. Las proteínas que son expresadas específicamente en tejidos, como la insulina en las células β del páncreas o los componentes de la vaina de mielina en el sistema nervioso, no entran en esta categoría. Sin embargo, un factor denominado AIRE (regulador autoinmunitario, *autoimmune regulator*) permite la expresión en un subconjunto de células epiteliales de dichos antígenos de órganos específicos. Aún no se sabe cómo el AIRE logra dicha tarea, pero se sospecha que regula directamente la transcripción de genes relevantes en el timo y en sitios selectores de órganos linfoides secundarios. Defectos en el AIRE conducen a una falla en la expresión de estos antígenos de órganos específicos en el timo. En los individuos que no expresan AIRE, el desarrollo de los linfocitos T falla en recibir las instrucciones completas en el timo que conducen a la eliminación de linfocitos T potencialmente autorreactivos. En consecuencia, estos individuos presentan un desconcertante número de respuestas autoinmunitarias, causando daños en los tejidos y enfermedades.

El reordenamiento de TCR ocurre en coincidencia con la adquisición gradual de los correceptores CD4 y CD8. Un intermediario clave en el desarrollo de los linfocitos T es un timocito que expresa CD4 y CD8, como también el complejo funcional TCR-CD3. Estas células se denominan doble positivas (CD4CD8+) y se encuentran solo como intermediarias del desarrollo en el timo. La elección de qué correceptor se expresa (CD4 o CD8) determina si el linfocito T reconocerá las moléculas MHC de clase I o las moléculas de MHC de clase II. Todavía no se ha resuelto por completo cómo una célula CD4CD8+ recibe instrucciones para convertirse

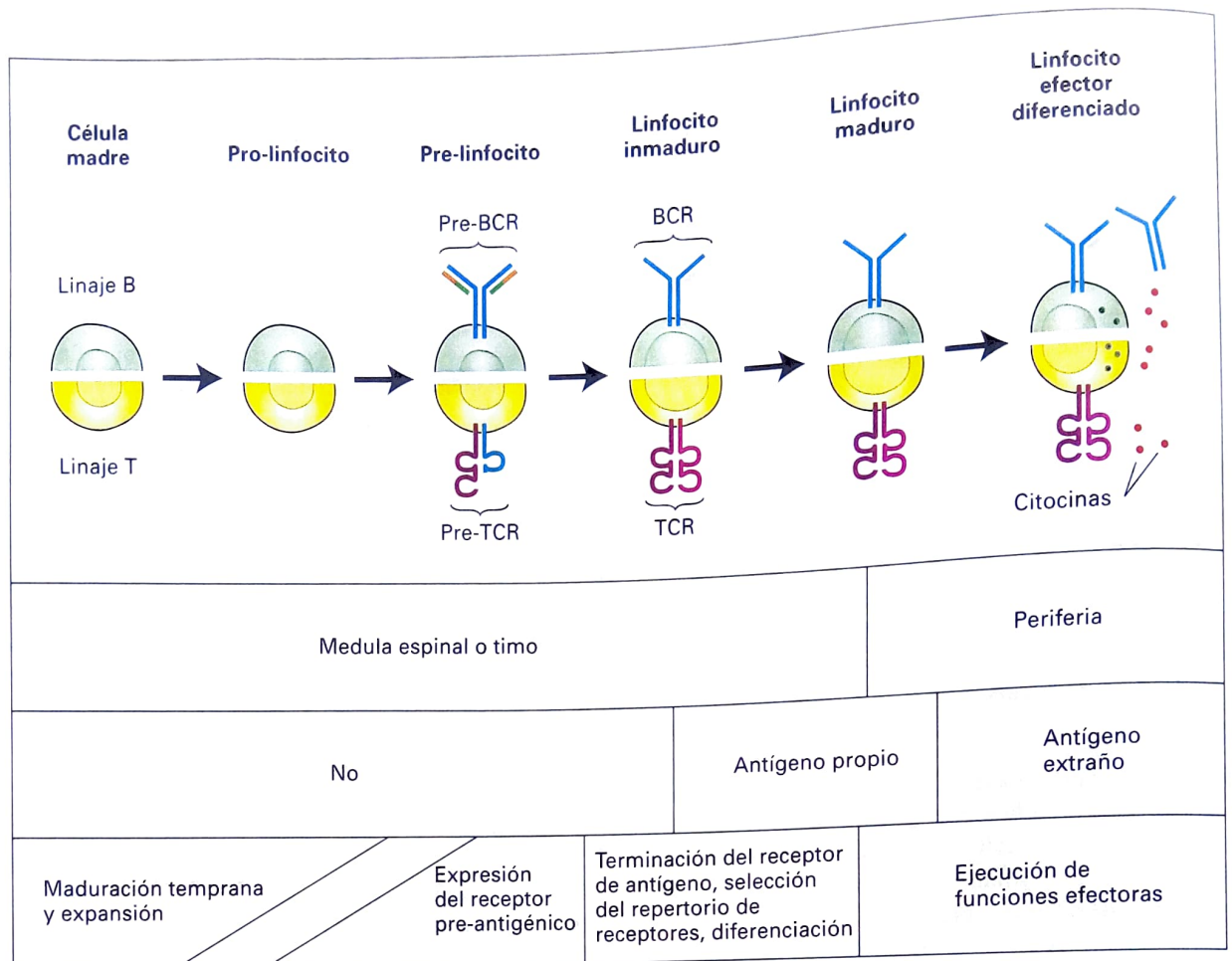


FIGURA 23-30 Comparación del desarrollo de linfocitos B y linfocitos T.

Las decisiones de destino celular son ejecutadas por receptores compuestos de cadenas μ reordenadas (pre-BCR) o de la cadena β reordenada (pre-TCR). Los receptores de células pre-B y de células pre-T cumplen funciones similares: la expansión de las células que hayan sufrido reordenamientos exitosos y exclusión alélica. Esta fase de desarrollo del linfocito no requiere reconocimiento de antígeno específico. Ambos, los pre-BCR y pre-TCR, incluyen subunidades únicas a cada receptor y que se encuentran ausentes en los receptores antígeno específicos en linfocitos maduros: VpreB y $\lambda 5$ (naranja,

verde) en pre-BCR; pre- α (azul) para pre-TCR. Al completarse la fase de expansión, comienza la expresión génica que codifica la subunidad remanente del receptor antígeno específico: la cadena ligera Ig (celeste) para BCR; la cadena TCR α (rojo claro) para TCR. El desarrollo del linfocito y la diferenciación ocurren en sitios anatómicos distintos, y solo los receptores específicos de antígeno completamente ensamblados (BCR, TCR) pueden reconocer antígenos. Los linfocitos maduros dependen estrictamente del reconocimiento de antígeno para su activación.

en un linfocito T CD8 (restringido a MHC clase I) o un linfocito T CD4 (restringido a MHC clase II).

Los linfocitos T requieren dos tipos de señales para una activación completa

Todos los linfocitos T requieren una señal a través de su receptor antígeno específico, el TCR, para su activación, pero esto no es suficiente: el linfocito T también necesita señales coestimuladoras. Para percibir las, los linfocitos T deben llevar en su superficie varios receptores diferentes, de los cuales el de la molécula CD28 es el ejemplo mejor conocido. CD28 interactúa con CD80 y CD86, dos glucoproteínas de superficie en las células presentadoras de antígeno con las cuales interactúan los linfocitos T. La expresión de CD80 y CD86 es regulada corriente arriba cuando estas células presentadoras de antígenos han recibido las señales estimuladoras apropiadas,

por ejemplo, por unión con los receptores tipo Toll (TLR). Las señales entregadas a través de CD28 sinergizan con las emanadas por el receptor de linfocito T, y todas ellas son necesarias para una activación completa (Fig. 23-31).

Una vez que los linfocitos T son activados, expresan también receptores que proporcionan señales atenuadoras o inhibitoras después del reconocimiento de estas moléculas coestimuladoras. La proteína CTLA4, cuya expresión en linfocitos T es inducida a través de la activación, compete con CD28 por la unión con CD80 y CD86. Debido a que la afinidad de CTLA4 por las proteínas CD80 y CD86 es mayor que la de CD28, las señales inhibitoras proporcionadas a través de CTLA4 finalmente podrán dominar las señales estimuladoras que derivan de la unión de CD28. Las moléculas coestimuladoras pueden ser estimuladoras o inhibitoras y proporcionar medios importantes para el estado de activación y la duración de la respuesta de un linfocito T.

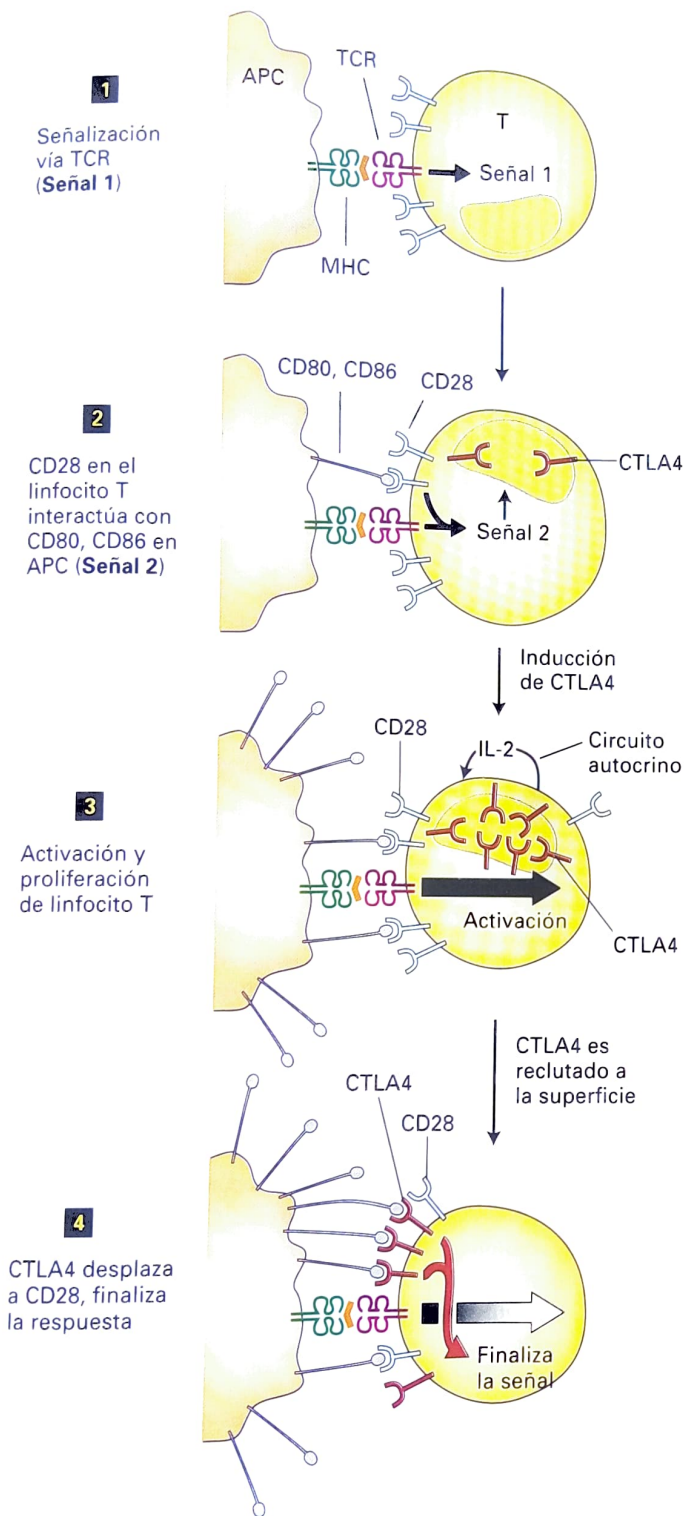


FIGURA 23-31 Las señales involucradas en la activación del linfocito T y la finalización. Los dos modelos de activación de linfocito T involucran el reconocimiento de un complejo MHC-péptido por el receptor de linfocito T, el cual constituye la Señal 1 (paso **1**), junto con el reconocimiento de moléculas coestimuladoras (CD80, CD86) en la superficie de la célula presentadora de antígeno, que constituye la Señal 2 (paso **2**). Si no existe la coestimulación, el linfocito T deja de responder (anergia). La provisión de ambas señales, Señal 1 vía los receptores de linfocito T y Señal 2 vía la unión de CD80 y CD86 por CD28, permite una activación completa. La activación completa conduce a un incremento en la expresión de CTLA4 (paso **3**). Después de moverse hacia la superficie del linfocito T, CTLA4 se une a CD80 y CD86, lo que conduce a una inhibición de la respuesta de linfocito T (paso **4**). Dado que la afinidad de CTLA4 por CD80 y CD86 es mayor que la de CD28, la activación de linfocito T eventualmente finaliza.

El mecanismo de destrucción de los linfocitos T citotóxicos involucra dos clases de proteínas que actúan en sinergia: las *perforinas* y las *granzimas* (Fig. 23-32). Las perforinas, que exhiben homología con los componentes terminales de la cascada del complemento que configuran el complejo de ataque a membrana, forman poros de hasta 20 nm a través de la membrana a la cual atacan. La destrucción de la barrera de permeabilidad, que conduce a la pérdida de electrolitos y otros solutos pequeños, contribuye a la muerte celular. Las granzimas son entregadas y se presume que ingresan en la célula diana, probablemente a través de los poros generados por la perforina. Las granzimas son serina proteasas que activan a las *caspasas* efectoras y así impulsan a la célula diana mediante una vía programada de muerte celular (apoptosis). Las perforinas y las granzimas se encuentran empaquetadas en gránulos citotóxicos, almacenados dentro de linfocitos T citotóxicos. Después de la unión del receptor de linfocito T al antígeno, los gránulos citotóxicos y sus componentes son liberados hacia la hendidura formada entre la linfocito T citotóxico y la célula diana. Todavía se desconoce cómo el linfocito T evita morir durante la liberación de granzimas y perforinas a la hendidura sináptica. Las células NK (*natural killer*) también ejercen actividad citotóxica y, de modo similar, utilizan perforinas y granzimas para eliminar las células diana (véase Fig. 23-5).

Los linfocitos T producen una colección de citocinas que proporcionan señales a otras células del sistema inmunitario

Muchos linfocitos y células no linfoides en tejidos linfáticos producen citocinas. Estas pequeñas proteínas secretadas instruyen a los linfocitos, a través de la unión a receptores específicos en la superficie de estos, e inician un programa de transcripción que permite al linfocito proliferar o, bien, diferenciarse en una célula efectora lista para ejercer actividad citotóxica (linfocito T CD8), actividad helper (linfocito T CD4) o actividad de secreción de anticuerpos (linfocito B). Las citocinas que son producidas por leucocitos o que actúan primariamente en ellos son denominadas *interleucinas* (IL); desde el punto de vista molecular, se han reconocido y caracterizado al menos 32 interleucinas. Aquellas relacionadas estructuralmente son reconocidas por receptores afines con similitudes estructurales; en particular, el receptor de interleucina 2 es un ejemplo bien caracterizado. La interleucina 2 (IL-2) fue identificada como un factor de crecimiento de linfocitos T y es una de las primeras citocinas producidas cuando los linfocitos T son estimulados. La IL-2

Los linfocitos T citotóxicos portan el correceptor CD8 y están especializados en matar

Como hemos visto, los linfocitos T citotóxicos por lo general portan el marcador de la glucoproteína CD8 y se encuentran restringidos en su reconocimiento a las moléculas MHC clase I. Matan células diana que exhiben las combinaciones apropiadas de péptidos-MHC y lo realizan con una sensibilidad exquisita: un único complejo péptido-MHC permite cebar a un linfocito T CD8 para matar a esa célula que lo porte.

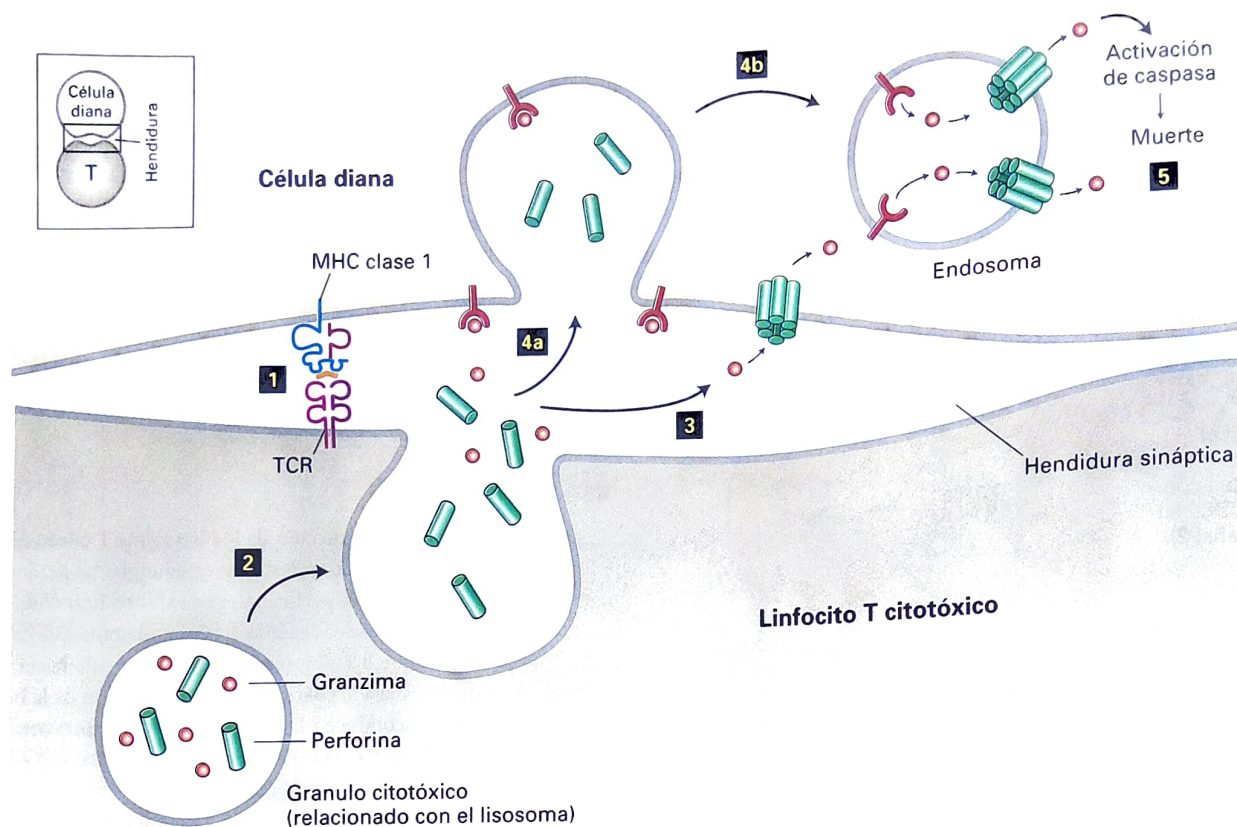


FIGURA 23-32 Los linfocitos T citotóxicos matan utilizando perforinas y granzimas. Después de reconocer la célula diana (paso **1**), los linfocitos T citotóxicos forman un contacto antígeno específico con dicha célula. El contacto estrecho resulta de la formación de una hendidura sináptica, hacia la cual son liberados los contenidos de los gránulos citotóxicos (paso **2**). Los contenidos de estos gránulos incluyen perforinas y granzimas. Las perforinas forman poros en la membrana a la cual se adsorben, y las granzimas son serina-

proteasas que ingresan a través de los poros de perforinas (paso **3**). Se cree que las perforinas no actúan solamente en la superficie de células diana, sino también en la superficie de los componentes endosomáticos de las células diana después de que las moléculas de perforinas han sido internalizadas desde la superficie celular (paso **4**). Una vez en el citoplasma, las granzimas activan las caspasas, que inician la muerte celular programada (paso **5**).

actúa como un factor de crecimiento autocrino y conduce la expansión clonal en los linfocitos T activados.

La interleucina 4 (IL-4), producida por los linfocitos T CD4 especializados en proporcionar ayuda a los linfocitos B (se analiza luego), induce la proliferación de linfocitos B activados y a que estos se sometan a conmutación de clase y a hipermutación somática. La interleucina 7 (IL-7), producida por las células estromáticas en la médula ósea, es esencial para el desarrollo de linfocitos T y B desde sus precursores. Ambas, IL-7 e IL-5, tienen un papel importante en el mantenimiento de linfocitos T en la forma de *células de memoria*, que son aquellas que han experimentado un antígeno y pueden ser convocadas en el caso de que ocurra una nueva exposición al antígeno. Estos linfocitos T de memoria pueden proliferar rápidamente y combatir al intruso. Las interleucinas IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15 tienen una subunidad en común para la transducción de señales, la cadena γ común (γ_c) con subunidades α (IL-2 e IL-15) y subunidades β (interleucinas IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 e IL-15) que proporciona la especificidad al ligando. Los defectos genéticos en γ_c resultan en una falla casi total en el desarrollo de linfocitos; esto ilustra la importancia de dichas citocinas no solo durante la fase efectora de la respuesta inmunitaria, sino también en el curso del desarrollo de linfocitos, donde IL-7 en particular tiene un papel central.

El mecanismo de transducción de señales por el receptor de citocina a través de la vía JAK7STAT se describe en el **Capítulo 16** (véase Fig. 16-1 para una revisión rápida). Entre los múltiples genes que controlan la vía STAT se encuentran los supresores de la señalización de citocina, o las proteínas SOCS. Estas proteínas son inducidas por citocinas, se unen a la forma activada de JAK y e inducen su degradación proteosómica (véase Fig. 16-14b).

Los linfocitos T CD4 se dividen en tres grandes clases según su producción de citocinas y la expresión de marcadores de superficie

La función principal de los linfocitos T CD4 es proporcionar asistencia a los linfocitos B y guiar su diferenciación a células plasmáticas que secreten anticuerpos de alta afinidad. Esta función, llevada a cabo por linfocitos T helper, requiere de la producción y la secreción de citocinas, como también del contacto directo entre el linfocito T CD4 y el linfocito B al que se le proporciona la ayuda.

Un segundo tipo de linfocito T CD4 tiene como función principal la secreción de citocinas que contribuyen a establecer un ambiente inflamatorio. Se han definido múltiples tipos de linfocitos T CD4 basados

en las citocinas que producen y en sus propiedades funcionales. Mientras que todos los linfocitos T activados pueden producir IL-2, otras citocinas solo pueden ser producidas por algunos subconjuntos particulares de linfocitos T CD4. Estos linfocitos T CD4 son clasificados como linfocitos T_H1 , caracterizados por la producción del interferón γ y TNF, y los linfocitos T_H2 , caracterizados por la producción de IL-4 e IL-10. Los linfocitos T_H1 , a través de la producción de IFN_γ , pueden activar macrófagos y estimular la respuesta inflamatoria. Los linfocitos T_H1 , denominados también *linfocitos T inflamatorios*, tienen además un papel importante en la producción de anticuerpos y facilitan notablemente la producción de anticuerpos fijadores de complemento como IgG1 e IgG3. Los linfocitos T_H2 , mediante la producción de IL-4, tienen un papel importante en las respuestas de linfocitos B que involucran conmutación de clase a los isotipos IgG1 e IgE (se analiza luego). La combinación de citocinas producidas por los linfocitos T CD4, y la interacción entre la proteína CD40 inducida por los linfocitos T activados con el ligando CD40 (CD40L) en linfocitos B, es responsable de la actividad de desaminasas inducidas por activación, y así prepara a los linfocitos B para la conmutación de clase y la hipermutación somática.

Subgrupos recientemente descubiertos de linfocitos T CD4 incluyen los *linfocitos T reguladores* y los T_H17 . Los cebadores pueden reducir la respuesta inmunitaria al ejercer un efecto supresor sobre la producción de citocinas de otros linfocitos T. Estos linfocitos T reguladores contienen la actividad de los linfocitos T potencialmente autorreactivos y son importantes en el mantenimiento de la tolerancia (la ausencia de una respuesta inmunitaria a los autoantígenos). Los $Th17$ son importantes en la defensa del huésped contra las bacterias y también juegan un papel en la enfermedad autoinmunitaria.

Los leucocitos se mueven en respuesta a señales quimiotácticas que proporcionan las quimiocinas

Las interleucinas informan a los linfocitos qué hacer a través de un programa transcripcional que les permite adquirir funciones efectoras especializadas. Por otra parte, las quimiocinas informan a los leucocitos hacia dónde deben dirigirse. Muchas células emiten señales quimiotácticas en la forma de quimiocinas. Cuando ocurre daño en algún tejido, los fibroblastos residentes producen una quimiocina, la IL-8, que atrae a los neutrófilos al sitio dañado. La regulación del tráfico de linfocitos dentro de los ganglios linfáticos es esencial para que las células dendríticas puedan atraer linfocitos T y para que estos se encuentren con los linfocitos B. Estos pasos son controlados por quimiocinas.

Existen aproximadamente 40 quimiocinas distintas y más de una docena de receptores de quimiocinas. Una quimiocina puede unirse a más de un receptor, y un receptor puede unirse a varias quimiocinas diferentes. Esto crea la posibilidad de generar un código de combinación de señales quimiotácticas de gran complejidad. Este código se utiliza para permitir la navegación de leucocitos desde el sitio donde son generados, en la médula espinal, hacia el torrente sanguíneo para ser transportados a destino.

Algunas quimiocinas guían a los linfocitos a abandonar la circulación y a residir en los órganos linfoides. Esta migración contribuye a poblar los órganos linfoides con el conjunto necesario de linfocitos. Debido a que todos estos movimientos ocurren con normalidad en el desarrollo linfoide, estas quimiocinas son denominadas *quimiocinas homeostáticas*. Las quimiocinas que tienen como objetivo el

reclutamiento de leucocitos a sitios de inflamación y daño de tejido se denominan *quimiocinas inflamatorias*.

Los receptores de quimiocinas son receptores acoplados a proteínas G que funcionan como un paso esencial en regular de adhesión celular y en la migración celular. Los leucocitos que viajan a través de los vasos sanguíneos lo hacen a altas velocidades y se encuentran expuestos a grandes fuerzas hidrodinámicas. Para que un leucocito pueda atravesar el endotelio y residir en un ganglio linfático o encontrar un sitio de infección en un tejido, primero debe disminuir la velocidad, un proceso que requiere la interacción de receptores de superficie, denominados selectinas, con sus ligandos, que son en su mayoría hidratos de carbono. Si se encuentran quimiocinas en la proximidad, son adsorbidas a la matriz extracelular, y si el leucocito tiene el receptor para esa quimiocina, genera una señal que le permite a la integrina transportada por ese leucocito sufrir un cambio conformacional. Este cambio resulta en un incremento de la afinidad de la integrina por su ligando y genera una firme captura y la detención del leucocito. El leucocito puede entonces salir del vaso sanguíneo a través de un proceso denominado *extravasación* (véase Fig. 20-39).

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 23.5

Células T: receptores y desarrollo

- Los receptores de células T antígeno específicos son proteínas diméricas que consisten de subunidades α y β o subunidades γ y δ . Existen al menos dos clases principales de linfocito T, según la expresión de correceptores glucoproteicos CD4 y CD8 (véase Fig. 23-27).
- Las células que utilizan moléculas MHC clase I como elementos de restricción tienen CD8, aquellas que utilizan las moléculas MHC clase II portan CD4. Estas clases de linfocitos T son funcionalmente distintos: los linfocitos T CD8 son citotóxicos; los linfocitos T CD4 proporcionan ayuda a los linfocitos B y son una fuente importante de citocinas.
- Los genes que codifican las subunidades TCR son generados por recombinación somática de segmentos V y J (cadena α) y de segmentos V, D y J (cadena β); su reordenamiento obedece las mismas reglas que aquellas para los genes Ig en linfocitos B (véase Fig. 23-28). Los reordenamientos de genes TCR ocurren en el timo y solamente en aquellas células destinadas a convertirse en linfocitos T.
- Un receptor de linfocito T completo incluye un complejo accesorio CD3, que se requiere para la transducción de señales. Cada subunidad del complejo CD3 porta en su cola citoplasmática uno de los tres dominios de ITAM; cuando se encuentran fosforilados, estos ITAM reclutan moléculas accesorias involucradas en la transducción de señales (véase Fig. 23-29).
- En el curso del desarrollo del linfocito T, el loci β TCR se reordena primero y codifica una subunidad funcional β que es incorporada al pre-TCR, que también incluye una subunidad pre-TCR especializada y codificada por genes no reordenados (véase Fig. 23-30). Similar al pre-BCR, el pre-TCR media la exclusión alélica y la proliferación de aquellas células que han realizado satisfactoriamente el reordenamiento TCR β .

- Los linfocitos T recibirán instrucciones acerca del lugar hacia dónde dirigirse (migración celular) a través de señales quimiotácticas en forma de quimiocinas. Los receptores para quimiocinas son receptores acoplados a proteínas G que muestran cierta promiscuidad en términos de su unión a quimiocinas. La complejidad de la familia de receptores quimiocina-quimiocina permite una regulación precisa del tráfico de leucocitos, dentro de los órganos linfáticos y también en la periferia.

23.6 La colaboración de las células del sistema inmunitario en la respuesta adaptativa

Una respuesta inmunitaria adaptativa efectiva requiere la presencia de linfocitos B, linfocitos T y células presentadoras de antígeno. Para que los linfocitos B realicen conmutación de clase e hipermutación (los requisitos para la producción de anticuerpos de alta afinidad), requieren ayuda de linfocitos T activados. Estos linfocitos T pueden ser activados solamente por células presentadoras de antígenos profesionales, como lo son las células dendríticas, que detectan invasores utilizando sus receptores tipo Toll (TLR) y otros receptores reconocedores de patrones, como las lectinas tipo C que pueden reconocer determinantes polisacáridos y de hidratos de carbono. La interacción entre los componentes del sistema inmunitario innato y adaptativo es entonces un aspecto muy importante de la respuesta adaptativa. Esta naturaleza de capas entrelazadas de la inmunidad innata y adaptativa asegura una respuesta rápida y temprana con un valor de protección inmediato y también prepara al sistema inmunitario adaptativo para una respuesta específica en caso de que el invasor persista. En esta sección describiremos cómo se activan estos variados elementos y cómo interactúan los tipos celulares más relevantes.

Los receptores tipo Toll distinguen una gran variedad de patrones macromoleculares derivados de patógenos

Una parte importante de las defensas innatas es su habilidad para detectar inmediatamente la presencia de invasores microbianos y responder a ella. Esta respuesta incluye la eliminación directa del invasor, pero también prepara al huésped mamífero para una respuesta inmunitaria adaptativa apropiada, en particular a través de la activación de células profesionales presentadoras de antígenos. Las células presentadoras de antígenos se encuentran a lo largo del epitelio (vías aéreas, tubo digestivo, aparato genital), donde es más

probable que ocurra el contacto con los patógenos. En la piel, una red de células dendríticas denominadas *células Langerhans* hace que sea virtualmente imposible para un patógeno romper esta barrera para evitar el contacto con estas células profesionales presentadoras de antígenos. Las células dendríticas, y otras células profesionales presentadoras de antígenos, detectan la presencia de bacterias y virus a través de su familia de receptores tipo Toll (TLR). Estas proteínas reciben su nombre por la proteína Toll de *Drosophila* debido a la homología funcional y estructural entre ellas. El Toll de *Drosophila* fue descubierto por su importante papel en los patrones dorsoventrales de la mosca de la fruta, pero actualmente se reconoce que existen receptores relacionados capaces de activar una respuesta inmunitaria innata en insectos como también en vertebrados.

Estructura del receptor tipo Toll (TLR) Los receptores Toll y de tipo Toll tienen un dominio extracelular compuesto de una *repetición rica en leucina*. Esta repetición configura un dominio extracelular en forma de hoz y se cree que se encuentra involucrado en el reconocimiento del ligando. La porción citoplasmática de los receptores tipo Toll contiene un dominio responsable del reclutamiento de proteínas adaptadoras que permiten la transducción de señales. Las vías de señalización producidas por los receptores tipo Toll comparten muchos componentes (y resultados) con aquellas utilizadas por las citocinas IL-1 (Fig. 23-33).

La proteína Toll de la *Drosophila* interactúa con su ligando, Spaetzle, que es un producto de la conversión proteolítica iniciada por componentes de la pared celular de los hongos que depredan a la *Drosophila*. En la mosca, la activación de Toll desata una cascada de señalización que, en última instancia, controla la transcripción de genes que codifican péptidos antimicrobianos. Aunque en un principio se consideraba como una cascada que controlaba el desarrollo temprano en la *Drosophila*, se ha vuelto claro que las vías Toll también controlan la inmunidad en insectos. El receptor activado en superficie se comunica con el aparato transcripcional a través de una serie de proteínas adaptadoras que activan cinasas corriente abajo, interpuestas entre el receptor tipo Toll y los factores de transcripción que son activados mediante su señalización. Un paso clave es la degradación proteosómica dependiente de la ubiquitina en la proteína Cactus. Su eliminación permite a la proteína Dif ingresar en el núcleo e iniciar la transcripción. Esta vía es sumamente homóloga en su operación y composición estructural a la vía NF- κ B en mamíferos (véase Fig. 16-34).

Diversidad de los TLR Existen aproximadamente una docena de receptores tipo Toll en mamíferos que pueden ser activados por varios productos microbianos. Estos receptores son expresados por varios tipos celulares, pero su función es crucial para la activación de células dendríticas y macrófagos. Los neutrófilos también expresan receptores tipo Toll. Los productos microbianos que reconocen los receptores tipo Toll incluyen macromoléculas que se encuentran en el envoltorio celular de bacterias, como lipopolisacáridos (LPS), flagelinas (subunidades de flagelos bacterianos) y lipopéptidos bacterianos. Se ha demostrado una unión directa entre algunas de estas macromoléculas con receptores tipo Toll a través de análisis de cristalografía de los complejos relevantes. La presencia de distintas clases de moléculas microbianas es censada por diferentes receptores: por ejemplo, TLR4 para lipopolisacáridos, heterodímeros de TLR1/2 y TLR2/6 para lipopéptidos y TLR5 para flagelinas. El re-

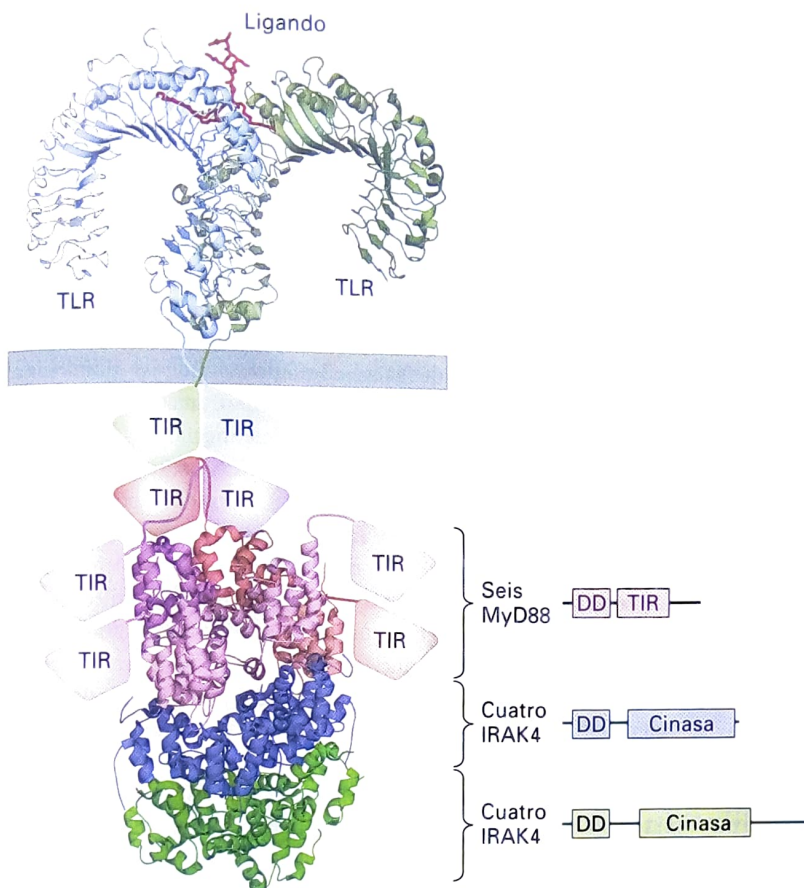


FIGURA 23-33 Activación de los receptores tipo Toll. La porción extracelular de los TLR reconoce ligandos de diversas naturalezas químicas (ácidos nucleicos, lipopolisacáridos). La porción citoplasmática de los TLR se asocia con la molécula adaptadora MyD88, presente en seis copias por complejo, y recluta dos tipos de cinasas, ambas miembros de la familia IRAK. Estas interacciones entre complejos son mediadas por los dominios homólogos al receptor tipo Toll/IL-1 β (TIR) y dominios de muerte (DD), como se indica en la figura. Se refiere al complejo ensamblado en el lado citoplasmático como el Midosoma.

(Adaptado de J. Y. Kang y J.-O. Lee, 2011, *Ann. Rev. Biochem.* **80**:917).

conocimiento de todos los componentes del envoltorio microbiano ocurre en la superficie celular.

Un segundo conjunto de receptores tipo Toll, TLR3, TLR 7 y TLR 9, detecta la presencia de ácidos nucleicos derivados de patógenos. No lo realizan en la superficie celular, sino dentro de los compartimentos endosomales donde se localizan estos receptores. El DNA de mamíferos se encuentra metilado en varios dinucleótidos CpG, mientras que por lo general el DNA microbiano carece de dicha modificación. El TLR9 es activado por DNA microbiano que contiene CpG no metilado. De modo similar, moléculas de RNA de cadena doble que se encuentran presentes en algunas células infectadas por virus producen la activación de TLR3. Finalmente, el TLR7 responde a la presencia de ciertas hebras simples de RNA. Así, el conjunto completo de TLR en mamíferos permite el reconocimiento de una variedad de macromoléculas que son diagnósticas para la presencia de patógenos bacterianos, virales y micóticos.

Recientemente se ha descrito una variedad de receptores intracelulares de RNA y DNA que reconocen RNA viral y son estructuralmente distintos de los TLR. La lista de receptores citoplasmáticos capaces de reconocer DNA, tanto del patógeno como del huésped, continúa creciendo. Muchos de estos receptores participan en el ensamblado de una estructura denominada inflamasoma (Fig. 23-34), cuya función principal es la de convertir la procaspasa-1 para activar la caspasa-1. La caspasa-1 es una proteasa que convierte proIL-1 β en el componente activo IL-1 β , una citocina que genera una fuerte respuesta inflamatoria. Los componentes centrales de los inflasomas

sin proteínas con repeticiones ricas en leucinas, miembros de la familia de proteínas inhibidoras neuronales de la apoptosis (NALP, neuronal inhibitors of apoptosis) y de las proteínas NOD, denominadas así por la presencia de un dominio de oligomerización de unión a nucleótidos. Ipaf-1, una proteína relacionada con la molécula Apaf-1 involucrada en la apoptosis (véase Cap. 21), permite el reclutamiento de un adaptador, ASC, para mediar la formación del complejo con procaspasa-1. Esto posibilita la conversión de proIL-1 β a IL-1 β . Muchas sustancias, aparentemente no relacionados, pueden inducir el ensamblaje y activación del inflamasoma, incluyendo sílice, cristales de ácido úrico y partículas de amianto. En concordancia, la inhibición de la cascada de señalización del inflamasoma, o el bloqueo del receptor IL-1 β , ha demostrado ser una promesa terapéutica para una variedad de enfermedades inflamatorias.

Cascada de señalización de TLR Como se muestra en la Figura 23-33, la unión de receptores tipo Toll en mamíferos conduce al reclutamiento de la proteína adaptadora MyD88, que luego permite la unión y activación de IRAK (cinasa interleucina 1 asociada a receptor). Después que IRAK fosforila el factor 6 TNG asociada a receptor (TRAF6), varias cinasas comienzan su actividad y esto conduce a una liberación de NF- κ B activo, un factor de transcripción, para su translocación desde citoplasma hacia el núcleo, donde NF- κ B activa varios genes diana (véase Fig. 16-35). Estos genes diana incluyen aquellos que codifican IL-1 β e IL-6, que contribuyen a la inflamación, como también los genes para el factor de necrosis tu-

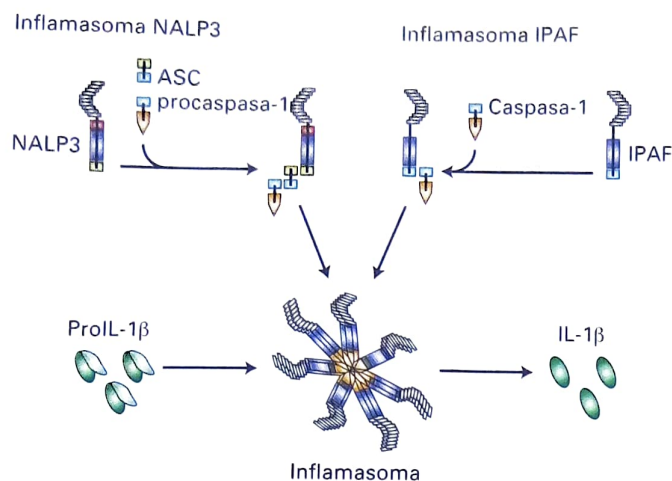


FIGURA 23-34 El inflamasoma. El inflamasoma es una estructura que detecta la presencia de ácidos nucleicos derivados del patógeno en el citoplasma y también puede ser activado por otras señales de peligro, incluyendo materia en partículas como cristales de ácido úrico o incluso amianto. Existen casi dos docenas de proteínas que pueden participar en la formación de estos complejos para producir inflamasomas de diferente composición. Dos de ellas se representan de modo esquemático. En última instancia, el inflamasoma completamente ensamblado activa a la caspasa-1, una enzima que convierte proIL-1 β a su forma activa, IL-1 β . NALP3 = un miembro de la familia de proteínas caracterizada por la presencia de NACHT, LRR y los dominios PYD; ASC = proteína tipo partícula asociada a apoptosis contenedora del dominio de reclutamiento de caspasa. (Adaptado de http://www.unil.ch/webdav/site/tb/shares/Tschopp/Fig_1JT.jpg)

moral (TNF) e IL-12. También se activa la expresión de interferones tipo I, pequeñas proteínas con efectos antivirales, en respuesta a la señalización de TLR.

Las respuestas celulares a la señalización de TLR son diversas. Para las células presentadoras de antígenos, estas respuestas incluyen no solo la producción de citocinas, sino también la regulación corriente arriba de moléculas coestimuladoras, que son proteínas de superficies importantes para la activación completa de linfocitos T sin experiencia previa. Las señalizaciones de TLR permiten a las células dendríticas migrar desde el lugar donde encuentran al patógeno hacia los drenajes del ganglio linfático, donde pueden interactuar con linfocitos sin experiencia previa. No todos los receptores tipo Toll activados evocan una respuesta idéntica. Cada TLR activado controla la producción de un conjunto particular de citocinas por células dendríticas. Por cada TLR activado, la combinación de proteínas de superficie y el perfil de citocinas inducido por dicho TLR crea así un fenotipo único para la célula dendrítica activada. La identidad del microbio encontrado determinará el patrón de los TLR que serán activados. Esto, luego moldeará las vías de diferenciación de las células dendríticas activadas en términos de las citocinas producidas, las moléculas presentadas en superficie y las señales quimiotácticas a las cuales responden las células dendríticas. El modo de activación de una célula dendrítica, y las citocinas que produce en respuesta a ello, crea un microambiente único en el cual los linfocitos T se diferencian. Aquí adquieren las características requeridas para combatir el agente infeccioso que activó TLR en primer lugar.

La activación por unión de los receptores tipo Toll conduce a la activación de células presentadoras de antígeno

Las células profesionales presentadoras de antígeno se acoplan en una endocitosis continua y, en ausencia de patógenos, presentan en sus superficies moléculas MHC clase I y clase II cargadas con péptidos derivados de proteínas propias. En presencia de patógenos, los receptores tipo Toll en estas células son activados, lo que induce a las células presentadoras de antígeno a convertirse en células móviles: se desprenden del sustrato a su alrededor y comienzan a migrar en dirección al drenaje del ganglio linfático, donde las quimiocinas proporcionan claves direccionales. Por ejemplo, una célula dendrítica activada reduce su tasa de adquisición de antígeno, regula corriente arriba la actividad de proteasas enosómicas/lisosómicas e incrementa la transferencia de complejos MHC-péptidos tipo II desde el compartimento de carga hacia la superficie celular. Por último, las células profesionales presentadoras de antígenos que se encuentran activadas regulan corriente arriba la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86, que les permitirán activar linfocitos T de modo más efectivo. Entonces, el contacto inicial entre una célula profesional presentadora de antígeno con un patógeno resulta en su migración desde el drenaje del ganglio linfático en un estado que es totalmente capaz de activar linfocitos T sin experiencia previa. El antígeno es presentado en forma de complejos MHC-péptido, las moléculas coestimuladoras se encuentran abundantemente presentes y las citocinas son producidas para asistir en el programa apropiado de diferenciación para activar los linfocitos T.

Las células dendríticas cargadas de antígeno se unen a linfocitos T antígeno específicos, las cuales responden proliferando y diferenciándose. Las citocinas producidas en el curso de esta reacción determinan si el linfocito T CD4 se polarizará hacia un fenotipo inflamatorio o hacia uno helper. Si la unión ocurre a través de las moléculas MHC clase I, se puede desarrollar un linfocito T CD8 de un precursor de linfocito T citotóxico para activar completamente el linfocito T citotóxico. Los linfocitos T activados son móviles a través del ganglio linfático, preparándose para su encuentro con los linfocitos B, o bien para ingresar a la circulación a través de los vasos, abandonar el ganglio linfático y ejecutar funciones efectoras en algún otro lugar del cuerpo.

La producción de anticuerpos de alta afinidad requiere la colaboración de los linfocitos T y linfocitos B

Para generar anticuerpos de alta afinidad, que son mejores en su unión al antígeno y en la neutralización de patógenos, los linfocitos B requieren asistencia de los linfocitos T. Entonces, la activación de linfocitos B requiere de una fuente de antígenos para activar el receptor de linfocito B y la presencia de linfocitos T activados que sean antígeno específicos. Los antígenos solubles alcanzan el ganglio linfático a través de aferentes linfáticos (véase Fig. 23-6). El crecimiento bacteriano es acompañado por la liberación de productos que sirven como antígenos. Si la infección es acompañada de destrucción local del tejido, la activación de la cascada del complemento resulta en la eliminación de las bacterias y la liberación concomitante de proteínas bacterianas, que también son transportadas hacia los drenajes linfá-

ticos. Los antígenos modificados por el complemento son más efectivos en la activación de linfocitos B a través de la unión con receptores de linfocito B complementarios, que sirven de correceptores para el receptor de linfocito B. Las linfocitos B que adquieren el antígeno mediante sus receptores de linfocito B internalizan el complejo inmunitario y lo procesan para su presentación a través de la vía MHC clase II. Las linfocitos B que han experimentado el antígeno convierten entonces al antígeno adquirido por BCR en un llamado de los linfocitos T helper, en forma de complejo MHC-péptido clase II (Fig. 23-35). Nótese que el epítipo reconocido por el receptor del linfocito B puede ser bastante distinto del péptido que luego se presentará en la superficie asociado con la molécula MHC clase II. Mientras que el epítipo del linfocito B y el péptido clase II presentado (un epítipo de linfocito T) se encuentren físicamente unidos, se podrá iniciar una diferenciación exitosa de linfocito B.

El concepto de reconocimiento por unión explica por qué existe un tamaño mínimo de moléculas que pueden ser utilizadas para generar exitosamente una respuesta de anticuerpos de alta afinidad. Estas moléculas deben cumplir con varios criterios: deben contener un epítipo detectable por receptores de linfocito B, sufrir endocitosis y proteólisis, y un fragmento proteolizado de la molécula debe unirse a las moléculas MHC clase II disponibles para ser presentadas al complejo MHC-péptido tipo II, que servirá como una llamada para los linfocitos T helper. Por esta razón, los péptidos sintéticos utilizados para generar anticuerpos son conjugados para portar proteínas que mejoren su inmunogenicidad, donde dichas proteínas sirven como fuente de péptidos para la presentación a través de productos MHC clase II. Solo mediante el reconocimiento de estos complejos MHC-péptidos clase II a través del receptor de linfocito T es que los linfocitos T pueden proporcionar la ayuda necesaria a los linfocitos B para seguir su curso completo de diferenciación.

Este concepto se aplica de igual modo a los linfocitos B capaces de reconocer modificaciones particulares en proteínas o péptidos. Los anticuerpos que reconocen las formas fosforiladas de las cinasas son usualmente generados por inmunización de animales experimentales con el péptido fosforilado en cuestión, conjugado con una proteína transportadora. Un linfocito B apropiadamente específico reconoce el sitio fosforilado del péptido de interés, internaliza el péptido fosforilado y su proteína transportadora y genera un conjunto complejo de péptidos por proteólisis endosomal de la proteína transportadora. Entre estos péptidos debería existir al menos uno capaz de unirse a las moléculas MHC clase II que porta el linfocito B para lograr una respuesta exitosa. Si el complejo MHC-péptido clase II es presentado apropiadamente en la superficie del linfocito B se convierte en la llamada de ayuda para los linfocitos T helper, especialmente linfocitos T CD4 equipados con receptores capaces de reconocer el complejo de molécula MHC clase II y el péptido derivado de la proteína transportadora.

El linfocito T identifica, a través de su receptor tipo T, un linfocito B que conoce el antígeno por medio de los complejos MHC-péptidos clase II presentados en la superficie del linfocito B. El linfocito B también presenta moléculas coestimuladoras y receptores para citocinas producidas por los linfocitos T activados (p. ej., IL-4). Luego, estos linfocitos B proliferan. Algunos de ellos se diferencian en células plasmáticas, otros son reservados y se convierten en linfocitos B de memoria. Los primeros tipos de anticuerpos que se producen siempre son IgM. La conmutación de clase hacia otros isotipos y la hipermutación somática (necesaria para la generación y selección de anticuer-

pos de alta afinidad) requieren de la persistencia del antígeno o de la exposición repetida a este. Además de las citocinas, los linfocitos B requieren de contacto célula a célula para iniciar la hipermutación somática y la conmutación de clase. Este contacto involucra a la proteína CD40 en los linfocitos B y a la proteína CD40L en los linfocitos T. Estas proteínas son miembros de la familia del receptor TNF-TNF.

La vacunación genera inmunidad protectora contra una variedad de patógenos



Podría decirse que la aplicación más importante de los principios inmunológicos son las vacunas, materiales diseñados para ser inocuos pero que pueden provocar una respuesta inmunitaria con el objetivo de proporcionar protección contra un ataque de la versión virulenta del patógeno (Fig. 23-36). No siempre se sabe por qué dichas vacunas son tan exitosas, pero en muchos casos su habilidad para elevar el número de anticuerpos que pueden neutralizar al patógeno (virus) o mostrar efectos microbicidas (bacterias) son buenos indicadores de una vacunación exitosa.

Varias estrategias pueden conducir a una vacunación exitosa. Las vacunas pueden estar compuestas por variantes vivas y atenuadas de patógenos más virulentos. El paso seriado de cultivos celulares o entre animales usualmente conduce a la *atenuación*, cuya base molecular todavía no es bien comprendida. La versión atenuada del patógeno genera una forma leve de la enfermedad o no causa ningún síntoma. Sin embargo, por reclutamiento de todos los componentes del sistema inmunitario, dichas vacunas atenuadas pueden producir niveles protectores de anticuerpos. Estos niveles de anticuerpos pueden disminuir al avanzar la edad, y a veces es necesaria una repetición de la vacunación (inyecciones amplificadoras) para mantener una protección completa. Las vacunas atenuadas se usan contra la gripe, el sarampión, las paperas y la tuberculosis. En el último caso, se emplea una cepa atenuada del *Mycobacterium* que causa la enfermedad (el bacilo de Calmette-Guérin; BCG). A pesar de que hasta hace poco se utilizaban poliovirus atenuados como vacunas, se ha suspendido su uso debido al riesgo de la reemergencia de cepas más virulentas del poliovirus.

Se han usado con éxito vacunas basadas en el virus de la viruela bovina, muy relacionado con el patógeno humano que causa la viruela (ortopoxvirus de la viruela), para erradicar totalmente esta enfermedad, y es el primer ejemplo de la eliminación de una enfermedad infecciosa. Los intentos por lograr una hazaña similar con la polio se encuentra cerca de alcanzar el éxito.

El otro tipo principal de vacuna se denomina vacuna de subunidad. En lugar de utilizarse una cepa viva atenuada de una bacteria virulenta o virus, se usa uno solo de sus componentes para generar inmunidad. En algunos casos, esto es suficiente para producir una protección duradera contra una fuente viva y virulenta que genera el antígeno utilizado en la vacunación. Este método ha resultado exitoso para la prevención de infecciones contra el virus de la hepatitis B. Las vacunas comúnmente utilizadas contra la gripe están compuestas en su mayoría por las proteínas de la cubierta neuraminidasa y hemaglutinina (véase Fig. 3-10); estas vacunas generan anticuerpos neutralizantes. Del virus del papiloma humano HPV 16, un serotipo que causa cáncer de cuello uterino, se generan partículas similares a virus compuestas por proteínas virales pero que carecen de su material genético; estas partículas similares a virus no son infecciosas, pero sin embargo imitan al virión intacto. La vacuna contra el HPV ha recibido la autorización para su utilización en humanos y se espera que se logre reducir la incidencia

Antígeno

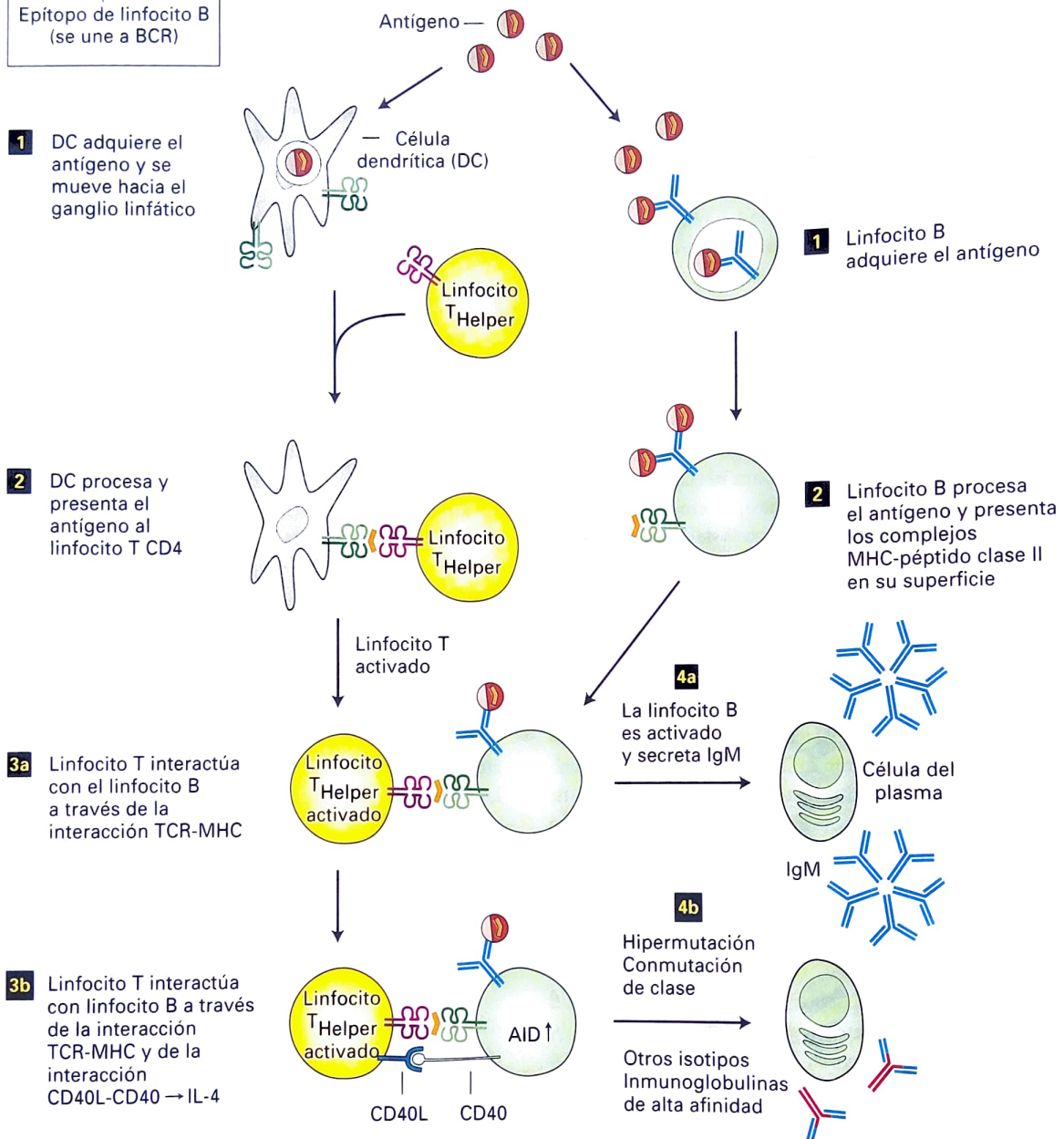
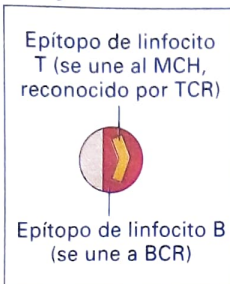


FIGURA 23-35 Se requiere la colaboración entre linfocitos T y linfocitos B para iniciar la producción de anticuerpos. *Izquierda:* activación de linfocitos T por medio de células dendríticas cargadas de antígeno (DC).

Derecha: adquisición del antígeno y subsecuente activación por linfocitos B. Paso **1**: las células presentadoras de antígenos profesionales (DC, linfocitos B) adquieren el antígeno. Paso **2**: el antígeno es internalizado, procesado y presentado a los linfocitos T. La activación de los linfocitos T ocurre cuando las células dendríticas presentan el antígeno a los linfocitos T. Paso **3a**: los linfocitos T activados se unen a los linfocitos B que tienen experiencia con el antígeno a través de los complejos MHC-péptidos que se encuentran en la superficie

de los linfocitos B. Paso **3b**: los linfocitos T que siguen activados inician la expresión del ligando CD40 (CD40L), un requisito para que los linfocitos B se vuelvan completamente activos y enciendan la maquinaria enzimática (desaminasa inducida por activación) para iniciar la conmutación de clase y la hipermutación somática. Paso **4a**: una célula B recibe las instrucciones apropiadas de un linfocito T CD4 helper y se convierte en una célula plasmática secretora de IgM. Paso **4b**: una célula B recibe señales de un linfocito T CD4 helper en la forma de interacciones CD40-CD40L y de las citocinas apropiadas, y puede realizar conmutación de clase hacia otro isotipo de inmunoglobulina o sufrir hipermutación somática.

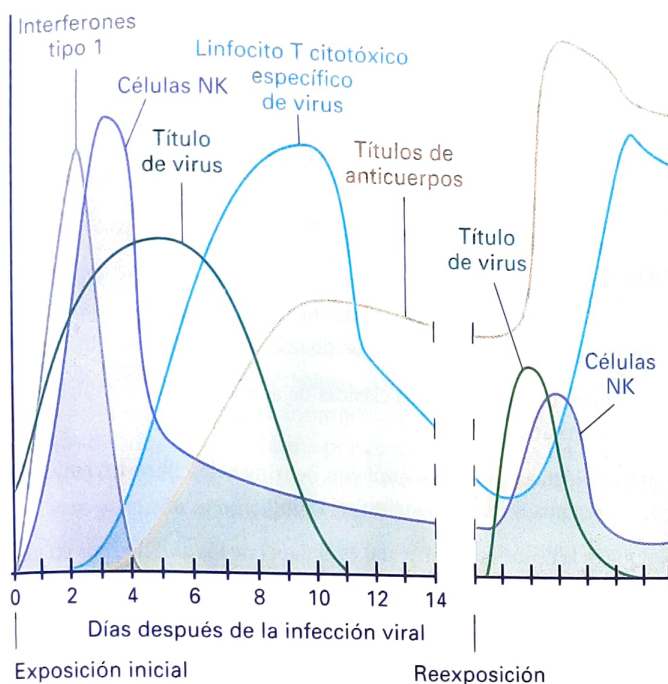


FIGURA 23-36 Curso de tiempo de la infección viral. La respuesta antiviral inicial, detectada cuando el número de partículas infecciosas se eleva, incluye la activación de células natural killer (NK) y la producción de interferones tipo I. Estas respuestas son parte de las defensas innatas. Sigue luego la producción de anticuerpos, como también la activación de linfocitos T citotóxicos, y finalmente elimina la infección. Una reexposición al mismo virus conduce a una producción más rápida y pronunciada de anticuerpos y a una activación más rápida de los linfocitos T citotóxicos. Una vacuna exitosa induce una respuesta inmunitaria similar en algunos aspectos a la exposición inicial al patógeno, pero sin causar síntomas significativos de la enfermedad. Si la persona vacunada es subsecuentemente expuesta a ese patógeno, el sistema inmunitario adaptativo se encuentra preparado para responder de modo rápido y fuerte.

de cáncer cervical en poblaciones susceptibles hasta en un 80%. Es el primer ejemplo de una vacuna que puede prevenir este tipo de cáncer.

Desde una perspectiva de salud pública, las vacunas producidas de manera económica y que se pueden distribuir ampliamente son herramientas formidables para erradicar enfermedades contagiosas. Los esfuerzos actuales apuntan a producir vacunas contra enfermedades que no tienen terapias disponibles (virus del Ébola) o donde las condiciones socioeconómicas generan problemas en la distribución de medicamentos (paludismo, HIV/sida). A través de un entendimiento más completo de cómo opera el sistema inmunitario, debería ser posible mejorar el diseño de las vacunas existentes y extender estos principios a enfermedades para las cuales todavía no existen vacunas exitosas disponibles.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 23.6

La colaboración de las células del sistema inmunitario en la respuesta adaptativa

- La activación de las células presentadoras de antígenos, como las células dendríticas, requieren de señales recibidas en sus receptores tipo Toll. En general, estos receptores son específicos para macromoléculas producidas por bacterias y virus. El acoplamiento y activación de los receptores tipo Toll activa la vía de señalización de NF- κ B cuya producción incluye la síntesis de citocinas inflamatorias (véase Fig. 23-33).

- Después de la activación, las células dendríticas se vuelven migratorias y se desplazan a los ganglios linfáticos, listas para el encuentro con los linfocitos T. La activación de las células dendríticas también incrementa la presentación de complejos MHC-péptidos y la expresión de moléculas coestimuladoras requeridas para iniciar la respuesta de los linfocitos T.

- Los linfocitos B requieren asistencia de los linfocitos T activados para ejecutar completamente su programa de diferenciación para convertirse en células plasmáticas. Los linfocitos T activados proporcionan ayuda antígeno específico a los linfocitos B, que reconocen complejos MHC-péptidos en la superficie de linfocitos B. Estos linfocitos B generan los complejos MHC-péptidos relevantes a través de internalizar el antígeno mediante endocitosis mediada por BCR. Luego, se procesa el antígeno y se presenta a través de la vía MHC clase II (véase Fig. 23-35).

- Además de las citocinas producidas por los linfocitos T activados, los linfocitos B requieren de contacto célula a célula para iniciar la hipermutación somática y la conmutación de clase, lo cual involucra CD40 en los linfocitos B y CD40L en los linfocitos T.

- Una de las aplicaciones más importantes del concepto inmunológico de colaboración entre los linfocitos T y los linfocitos B es el de las vacunas. Las formas más comunes de vacunas son virus o bacterias vivas atenuadas, que pueden evocar una respuesta inmunitaria protectora sin causar patologías, y vacunas basadas en subunidades.

- Una de las aplicaciones más importantes del concepto inmunológico de colaboración entre los linfocitos T y los linfocitos B es el de las vacunas. Las formas más comunes de vacunas son virus o bacterias vivas atenuadas, que pueden evocar una respuesta inmunitaria protectora sin causar patologías, y vacunas basadas en subunidades.

Perspectivas para el futuro

Varias áreas de investigación en inmunología prometen un mayor impacto. La generación de nuevas vacunas que sean seguras y efectivas sigue siendo un objetivo con enorme significado práctico y social: las infecciones por HIV, la tuberculosis resistente a varios fármacos y el paludismo son ejemplos de causas de millones de muertes anuales para las cuales no existen vacunas exitosas actualmente disponibles. La investigación debe incorporar conceptos de biología celular como también de inmunología para resolver esta necesidad insatisfecha. A pesar de que varias de las vacunas más exitosas han sido desarrolladas en ausencia de un conocimiento detallado de inmunología, el clima regulador actual demanda un mayor entendimiento de la composición de una vacuna exitosa y de por qué esa vacuna funciona.

Los linfocitos son uno de los pocos tipos celulares que pueden ser estudiados como células primarias porque siguen teniendo el mismo comportamiento celular y tisular específico en un cultivo celular. Esta característica hace de los linfocitos un modelo atractivo en el cual estudiar la transducción de las señales para explorar las interacciones entre distintos tipos celulares en condiciones de laboratorio y para medir con precisión las respuestas que evocan estímulos específicos.

La habilidad de los antígenos de crear receptores antígeno-específicos de una variabilidad casi ilimitada tiene su precio: la generación de receptores autorreactivos, el factor que más contribuye a las enfer-

Antígeno

Epítipo de linfocito T
(se une al MCH, reconocido por TCR)

Epítipo de linfocito B
(se une a BCR)

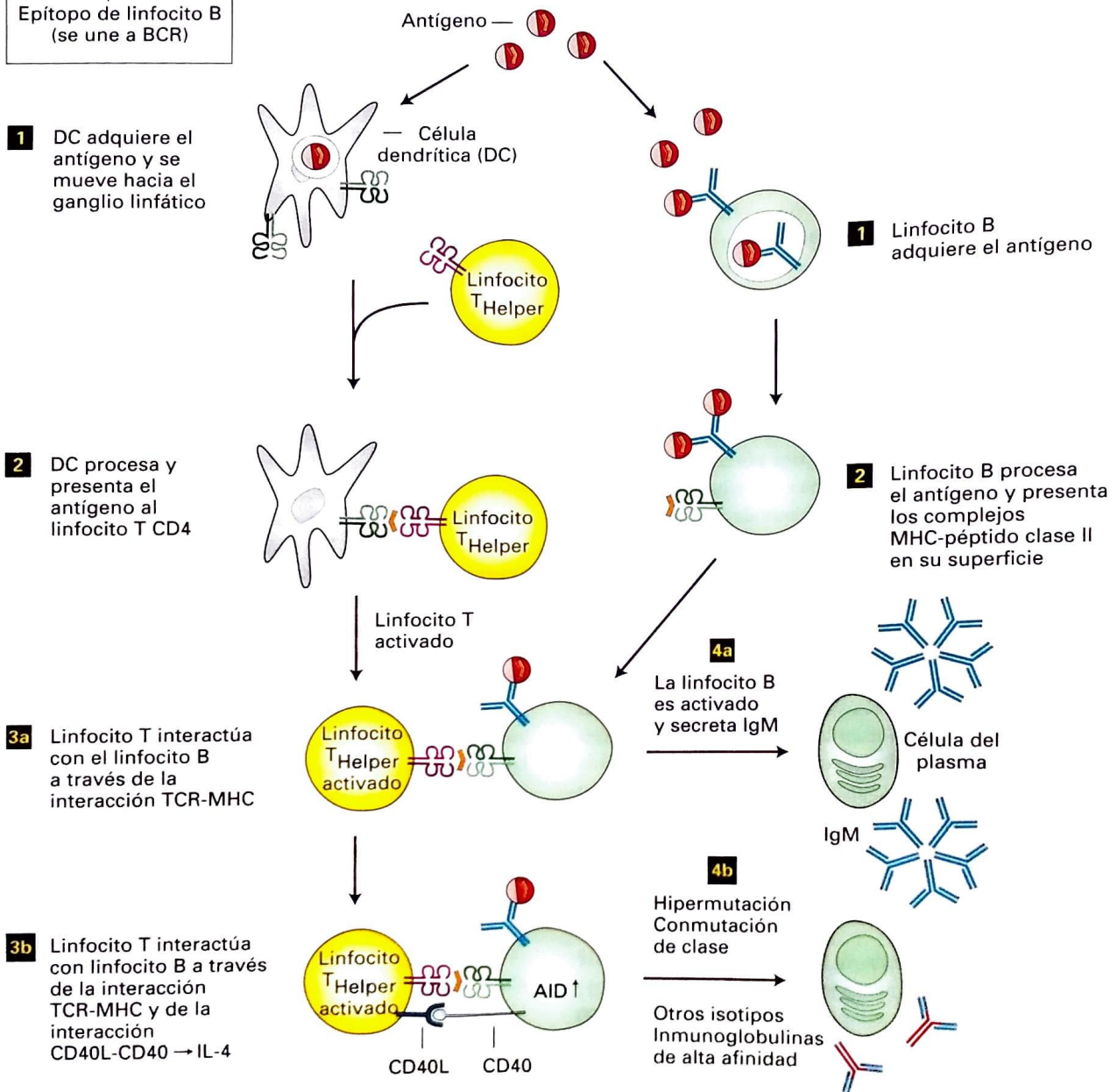


FIGURA 23-35 Se requiere la colaboración entre linfocitos T y linfocitos B para iniciar la producción de anticuerpos. *Izquierda:* activación de linfocitos T por medio de células dendríticas cargadas de antígeno (DC).

Derecha: adquisición del antígeno y subsecuente activación por linfocitos B. Paso **1**: las células presentadoras de antígenos profesionales (DC, linfocitos B) adquieren el antígeno. Paso **2**: el antígeno es internalizado, procesado y presentado a los linfocitos T. La activación de los linfocitos T ocurre cuando las células dendríticas presentan el antígeno a los linfocitos T. Paso **3a**: los linfocitos T activados se unen a los linfocitos B que tienen experiencia con el antígeno a través de los complejos MHC-péptidos que se encuentran en la superficie

de los linfocitos B. Paso **3b**: los linfocitos T que siguen activados inician la expresión del ligando CD40 (CD40L), un requisito para que los linfocitos B se vuelvan completamente activos y enciendan la maquinaria enzimática y la hipermutación somática para iniciar la conmutación de clase apropiadas de un linfocito T CD4 helper y se convierte en una célula plasmática secretora de IgM. Paso **4a**: una célula B recibe las instrucciones de un linfocito T CD4 helper en la forma de interacciones CD40-CD40L y de las citocinas apropiadas, y puede realizar conmutación de clase hacia otro isotipo de inmunoglobulina o sufrir hipermutación somática.

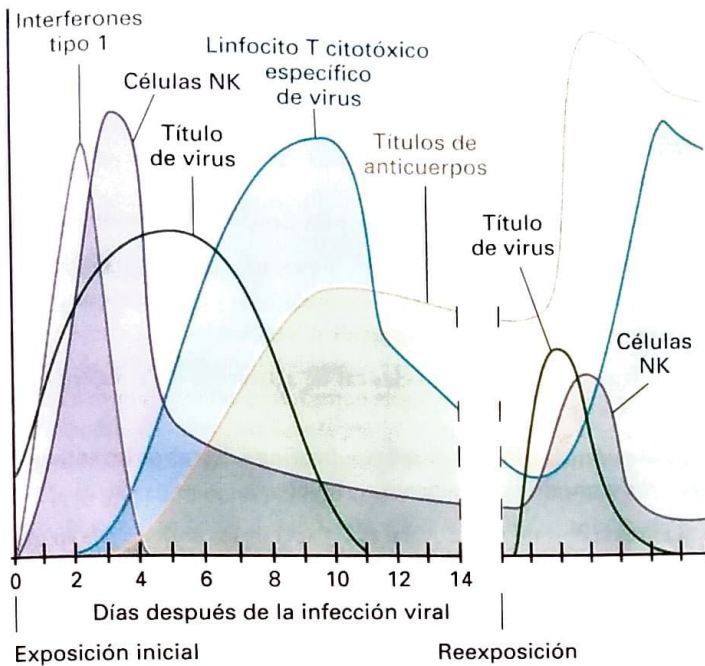


FIGURA 23-36 Curso de tiempo de la infección viral. La respuesta antiviral inicial, detectada cuando el número de partículas infecciosas se eleva, incluye la activación de células natural killer (NK) y la producción de interferones tipo I. Estas respuestas son parte de las defensas innatas. Sigue luego la producción de anticuerpos, como también la activación de linfocitos T citotóxicos, y finalmente elimina la infección. Una reexposición al mismo virus conduce a una producción más rápida y pronunciada de anticuerpos y a una activación más rápida de los linfocitos T citotóxicos. Una vacuna exitosa induce una respuesta inmunitaria similar en algunos aspectos a la exposición inicial al patógeno, pero sin causar síntomas significativos de la enfermedad. Si la persona vacunada es subsecuentemente expuesta a ese patógeno, el sistema inmunitario adaptativo se encuentra preparado para responder de modo rápido y fuerte.

de cáncer cervical en poblaciones susceptibles hasta en un 80%. Es el primer ejemplo de una vacuna que puede prevenir este tipo de cáncer.

Desde una perspectiva de salud pública, las vacunas producidas de manera económica y que se pueden distribuir ampliamente son herramientas formidables para erradicar enfermedades contagiosas. Los esfuerzos actuales apuntan a producir vacunas contra enfermedades que no tienen terapias disponibles (virus del Ébola) o donde las condiciones socioeconómicas generan problemas en la distribución de medicamentos (paludismo, HIV/sida). A través de un entendimiento más completo de cómo opera el sistema inmunitario, debería ser posible mejorar el diseño de las vacunas existentes y extender estos principios a enfermedades para las cuales todavía no existen vacunas exitosas disponibles.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 23.6

La colaboración de las células del sistema inmunitario en la respuesta adaptativa

- La activación de las células presentadoras de antígenos, como las células dendríticas, requieren de señales recibidas en sus receptores tipo Toll. En general, estos receptores son específicos para macromoléculas

producidas por bacterias y virus. El acoplamiento y activación de los receptores tipo Toll activa la vía de señalización de NF- κ B cuya producción incluye la síntesis de citocinas inflamatorias (véase Fig. 23-33).

- Después de la activación, las células dendríticas se vuelven migratorias y se desplazan a los ganglios linfáticos, listas para el encuentro con los linfocitos T. La activación de las células dendríticas también incrementa la presentación de complejos MHC-péptidos y la expresión de moléculas coestimuladoras requeridas para iniciar la respuesta de los linfocitos T.

- Los linfocitos B requieren asistencia de los linfocitos T activados para ejecutar completamente su programa de diferenciación para convertirse en células plasmáticas. Los linfocitos T activados proporcionan ayuda antígeno específico a los linfocitos B, que reconocen complejos MHC-péptidos en la superficie de linfocitos B. Estos linfocitos B generan los complejos MHC-péptidos relevantes a través de internalizar el antígeno mediante endocitosis mediada por BCR. Luego, se procesa el antígeno y se presenta a través de la vía MCH clase II (véase Fig. 23-35).

- Además de las citocinas producidas por los linfocitos T activados, los linfocitos B requieren de contacto célula a célula para iniciar la hipermutación somática y la conmutación de clase, lo cual involucra CD40 en los linfocitos B y CD40L en los linfocitos T.

- Una de las aplicaciones más importantes del concepto inmunológico de colaboración entre los linfocitos T y los linfocitos B es el de las vacunas. Las formas más comunes de vacunas son virus o bacterias vivas atenuadas, que pueden evocar una respuesta inmunitaria protectora sin causar patologías, y vacunas basadas en subunidades.

Perspectivas para el futuro

Varias áreas de investigación en inmunología prometen un mayor impacto. La generación de nuevas vacunas que sean seguras y efectivas sigue siendo un objetivo con enorme significado práctico y social: las infecciones por HIV, la tuberculosis resistente a varios fármacos y el paludismo son ejemplos de causas de millones de muertes anuales para las cuales no existen vacunas exitosas actualmente disponibles. La investigación debe incorporar conceptos de biología celular como también de inmunología para resolver esta necesidad insatisfecha. A pesar de que varias de las vacunas más exitosas han sido desarrolladas en ausencia de un conocimiento detallado de inmunología, el clima regulador actual demanda un mayor entendimiento de la composición de una vacuna exitosa y de por qué esa vacuna funciona.

Los linfocitos son uno de los pocos tipos celulares que pueden ser estudiados como células primarias porque siguen teniendo el mismo comportamiento celular y tisular específico en un cultivo celular. Esta característica hace de los linfocitos un modelo atractivo en el cual estudiar la transducción de las señales para explorar las interacciones entre distintos tipos celulares en condiciones de laboratorio y para medir con precisión las respuestas que evocan estímulos específicos.

La habilidad de los antígenos de crear receptores antígeno-específicos de una variabilidad casi ilimitada tiene su precio: la generación de receptores autorreactivos, el factor que más contribuye a las enfer-

medades autoinmunitarias. Los vertebrados tienen varios mecanismos para controlar dichos linfocitos autorreactivos, pero ninguno de ellos es infalible. Debemos comprender cómo se genera tolerancia a los antígenos propios, cómo se mantiene y, por último, interrumpir el comienzo de una enfermedad autoinmunitaria. Esta comprensión debería ayudar a definir nuevas estrategias para manipular y controlar linfocitos autorreactivos a fin de prevenir o tratar enfermedades autoinmunitarias (p. ej., diabetes tipo I, esclerosis múltiple y artritis).

Con avances en el entendimiento de células madres y cómo utilizarlas en terapias para tratamientos de enfermedades (p. ej., enfermedad de Parkinson, distrofia muscular, lesiones en columna espinal), los trasplantes heterólogos de células madre (p. ej., derivados de un individuo distinto del paciente) son opciones viables. La capacidad del sistema inmunitario de reconocer dichas células madre trasplantadas es un factor que limita el uso de células madres heterólogas. Consecuentemente, encontrar un medio para suprimir la respuesta a estos trasplantes o para inducir tolerancia a estos son metas importantes.

Herramientas genéticas más refinadas permitirán la identificación de subconjuntos de linfocitos, que en general tienen funciones diferentes. Una mejora en los esquemas de clasificación proporcionará ayuda en el entendimiento de la función de los linfocitos, y así luego podrá permitir manipular la función de los linfocitos con fines terapéuticos.

Nuestro entendimiento de la interacción entre la respuesta inmunitaria y adaptativa, y de las muchas formas en las que los patógenos interfieren con la inmunidad innata y adaptativa mejorará al aumentar nuestros conocimientos sobre las secuencias y las estructuras genómicas, tanto del huésped como del patógeno. El uso de patógenos genéticamente modificados para pruebas de la función inmunitaria del huésped podrán ayudar a nuestra comprensión de la inmunología básica. Esta es un área de rápida expansión en la investigación de biología celular básica.

Palabras clave

antígeno 1060	linfocitos T helper 1081
autoinmunidad 1059	macrófagos 1063
células de memoria 1100	maduración de la afinidad 1077
células dendríticas 1063	neutrófilos 1066
células <i>natural killer</i> (NK) 1064	opsonización 1064
células plasmáticas 1079	órganos linfoides
citocinas 1065	primarios 1061
complejo mayor de	órganos linfoides
histocompatibilidad (MHC) 1081	secundarios 1061
complemento 1063	procesamiento y presentación
epítipo 1072	de antígeno 1086
imprecisión de la unión 1075	quimiocinas 1101
inflamación 1065	receptor de linfocito B
inflamasoma 1104	(BCR) 1078
inmunoglobulinas 1066	receptor de linfocitos T
interleucinas 1099	(TCR) 1096
isotipos 1068	receptor Fc 1072
linfocito T citotóxica 1081	receptores tipo Toll (TLR) 1063
linfocitos 1061	recombinación somática 1073
linfocitos B 1060	teoría de selección clonal 1069
linfocitos T 1060	transcitosis 1069

Revisión de los conceptos

1. Describa las maneras por las cuales cada uno de los siguientes patógenos puede desarmar o manipular el sistema inmunitario de su huésped: (a) cepa patógena de *Staphylococcus aureus* y (b) virus encapsulados.
2. Rastree el curso de los linfocitos y las funciones que realizan en el cuerpo.
3. Identifique las principales defensas mecánicas y químicas que protegen a los tejidos internos del ataque de microbios.
4. Compare/contraste las vías clásicas de activación del complemento y la vía alternativa.
5. ¿Qué evidencia condujo a Emil von Behring a descubrir los anticuerpos y el sistema del complemento en 1905?
6. ¿Qué es la opsonización? ¿Cuál es el papel de los anticuerpos en este proceso?
7. ¿Qué mecanismos aseguran que solo los genes V reordenados sean transcritos en los linfocitos B?
8. ¿Qué evita que siga ocurriendo reordenamiento de segmentos genéticos de cadena pesada de inmunoglobulinas en un linfocito pre-B una vez ocurrido un reordenamiento de cadena pesada productivo?
9. ¿Cómo y por qué los anticuerpos sufren conmutación de clase, desde la producción de anticuerpos IgM hasta la producción de cualquier otro isotipo?
10. ¿Qué mecanismos bioquímicos explican la afinidad madurativa de la respuesta de los anticuerpos?
11. Compare/contraste la estructura de las moléculas MHC clase I y clase II. ¿Qué tipo de células expresan cada tipo de molécula MCH? ¿Cuáles son sus funciones?
12. Describa los seis pasos en el procesamiento y la presentación del antígeno a través de la vía restringida de MHC clase I.
13. Describa los seis pasos en el procesamiento y la presentación del antígeno a través de la vía restringida de MHC clase II.
14. ¿Qué evita que los linfocitos T autorreactivos salgan del timo?
15. Explique por qué las enfermedades autoinmunitarias mediadas por linfocitos T se encuentran asociadas con alelos particulares de genes de MCH clase II.
16. ¿Cómo se encuentran involucradas las células presentadoras de antígeno y linfocitos T helper en la activación de linfocitos B?
17. Explique en términos generales los eventos en las respuestas inmunitarias adaptativas e innatas desde que el patógeno invade hasta su eliminación.
18. Defina inmunización pasiva y de un ejemplo.
19. ¿Cómo diseñaría una vacuna capaz de proteger contra la infección de HIV sin la posibilidad de infección en el paciente?
20. Las inyecciones anuales contra la gripe están compuestas o por virus atenuados o bien por subunidades de gripe (proteínas del envoltorio neuraminidasa y hemaglutinina). ¿Cómo logra la inyección anual contra la gripe protegerlo de la infección?

21. Diseña un protocolo de laboratorio para desarrollar un anticuerpo monoclonal o policlonal contra una proteína de interés.

22. Considere a una persona sin células plasmáticas funcionales. ¿Qué efectos tendría esto sobre el sistema inmunitario adaptativo de esa persona? ¿Y sobre el sistema inmunitario innato?

Análisis de los datos

Para comprender cómo la ovoalbúmina (una proteína presente en el huevo de gallina) y otros antígenos extraños en el citoplasma de una célula son presentados para inmunovigilancia, la ovoalbúmina puede ser introducida en el citoplasma por electroporación de un linfocito B primario de ratón. La ovoalbúmina es escindida, y uno de los productos de su partición es un péptido con la secuencia SIINFEKL (abreviatura de una sola letra). Cuando estos linfocitos B son mezclados con una población clonal de linfocitos T que reconocen específicamente SIINFEKL en el contexto de moléculas de MHC, los linfocitos T son estimulados. El gráfico debajo muestra la secreción de IL-2 después de que estos linfocitos T fueron mezclados con linfocitos B que habían sido tratados de modos variados.

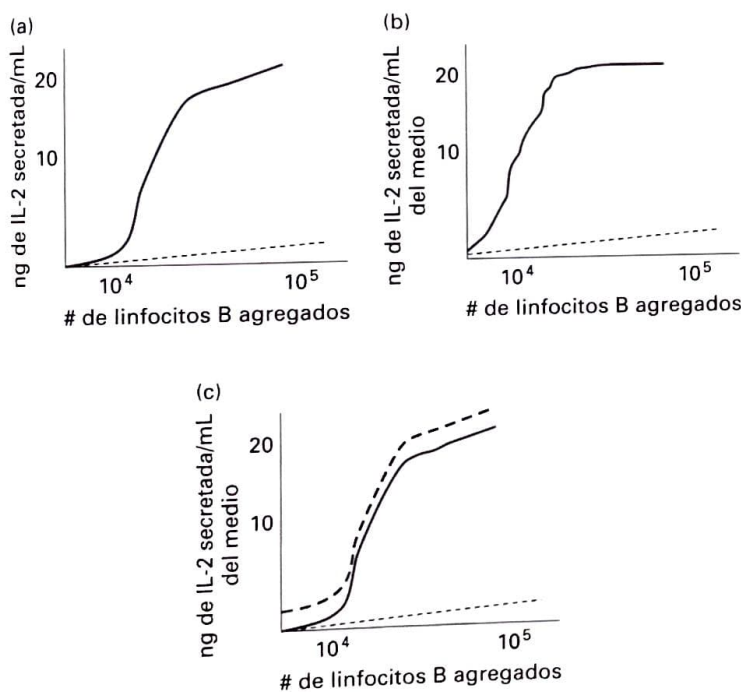


Gráfico A: los linfocitos B fueron electroporados con ovoalbúmina (línea continua) o con una proteína control (línea interrumpida) no reconocidas por la población clonal de células T.

Gráfico B: los linfocitos B fueron primero incubados con un inhibidor de proteasas lisosómicas de cisteína (línea continua) o un inhibidor de proteosoma (línea interrumpida) y luego electroporados con ovoalbúmina.

Gráfico C: los linfocitos B fueron expuestos a altas concentraciones del péptido SIINFEKL y luego inmediatamente fijados (muertos) (línea punteada) con formaldehído o incubados por dos horas en la presencia

(línea interrumpida) o ausencia (línea continua) del inhibidor de proteosoma y luego fijados con formaldehído.

a. ¿En qué condiciones se secreta IL-2? ¿Es más probable que los linfocitos T o los linfocitos B estén secretando IL-2?

b. ¿Qué información se extrae del uso de inhibidores lisosómicos y de proteosoma? ¿Es más probable que el péptido de ovoalbúmina sea presentado por complejos con moléculas MHC clase I o moléculas MHC clase II? ¿Cuál es la vía más probable por la cual la ovoalbúmina en el citoplasma del linfocito B sea presentado para reconocimiento de los linfocitos T apropiados?

c. ¿Por qué cree que la presencia o ausencia del inhibidor de proteosoma en el experimento C no tuvo efecto en la cantidad de IL-2 secretada, mientras que la presencia del inhibidor en el experimento B demostró un marcado efecto?

Referencias

Generalidades de la defensa del huésped

Akira, S., K. Kiyoshi Takeda, and T. Kaisho. 2001. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunol.* 2:675-680.

Heyman, B. 2000. Regulation of antibody responses via antibodies, complement, and Fc receptors. *Ann. Rev. Immunol.* 18:709-737.

Lemaitre, B., and J. Hoffmann. 2007. The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Ann. Rev. Immunol.* (in press).

von Behring, E., and S. Kitasato. 1890. The mechanism of diphtheria immunity and tetanus immunity in animals. Reprinted in *Mol. Immunol.* 1991, 28(12):1317, 1319-1320.

Inmunoglobulinas: estructura y función

Amzel, L. M., and R. J. Poljak. 1979. Three-dimensional structure of immunoglobulins. *Ann. Rev. Biochem.* 48:961-997.

Williams, A. F., and A. N. Barclay. 1988. The immunoglobulin superfamily—domains for cell-surface recognition. *Ann. Rev. Immunol.* 6:381-405.

Generación de diversidad de anticuerpos y desarrollo de linfocitos B

Hozumi, N., and S. Tonegawa. 1976. Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 73:3628-3632.

Jung, D., et al. 2006. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain loci. *Ann. Rev. Immunol.* 24:541-570.

Kitamura, D., et al. 1991. A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene. *Nature* 350:423-426.

Kitamura, D., et al. 1992. A critical role of lambda 5 protein in B cell development. *Cell* 69:823-831.

Muramatsu, M., et al. 2000. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102:553-563.

Schatz, D. G., M. A. Oettinger, and D. Baltimore. 1989. The V(D)J recombination activating gene, RAG-1. *Cell* 59:1035-1048.

El MCH y la presentación del antígeno

Bjorkman, P. J., et al. 1987. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329:506-512.

Brown, J. H., et al. 1993. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* 364:33-39.

Neefjes, J. J., et al. 1990. The biosynthetic pathway of MHC class II but not class I molecules intersects the endocytic route. *Cell* **61**:171-183.

Peters, P. J., et al. 1991. Segregation of MHC class II molecules from MHC class I molecules in the Golgi complex for transport to lysosomal compartments. *Nature* **349**:669-676.

Rock, K. L., et al. 1994. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* **78**:761-771.

Rudolph, M. G., R. L. Stanfield, and I. A. Wilson. 2006. How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Ann. Rev. Immunol.* **24**:419-466.

Townsend, A. R., et al. 1984. Cytotoxic T cell recognition of the influenza nucleoprotein and hemagglutinin expressed in transfected mouse A. cells. *Cell* **39**:13-25.

Zinkernagel, R. M., and P. C. Doherty. 1974. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* **248**:701-702.

Linfocitos T: receptores y desarrollo

Dembic, Z., et al. 1986. Transfer of specificity by murine alpha and beta T-cell receptor genes. *Nature* **320**:232-238.

Kisielow, P., et al. 1988. Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4 + 8+ thymocytes. *Nature* **333**:742-746.

Lenschow, D. J., T. L. Walunas, and J. A. Bluestone. 1996. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Ann. Rev. Immunol.* **14**:233-258.

Miller, J. F. 1961. Immunological function of the thymus. *Lancet* **30**(2):748-749.

Mombaerts, P., et al. 1992. RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* **68**:869-877.

Sharpe, A. H., and A. K. Abbas. 2006. T-cell costimulation: biology, therapeutic potential, and challenges. *N. Engl. J. Med.* **355**:973-975.

Shinkai, Y., et al. 1993. Restoration of T cell development in RAG-2-deficient mice by functional TCR transgenes. *Science* **259**:822-825.

La colaboración de las células del sistema inmunitario en la respuesta adaptativa

20 years of HIV science. 2003. *Nature Med.* **9**:803-843. A collection of opinion pieces on the prospects for an AIDS vaccine.

Banchereau, J. 2002. The long arm of the immune system. *Sci. Am.* **287**:52-59.

Chang, M.-H., et al. for The Taiwan Childhood Hepatoma Study Group. 1997. Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. *N. Engl. J. Med.* **336**:1855-1859.

Cytokines Online Pathfinder Encyclopedia. <http://www.copewithcytokines.de>.

Gross, O., et al. 2011. The inflammasome: an integrated view. *Immunol. Rev.* **243**:136-151.

Jego, G., et al. 2003. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* **19**:225-234.

Kang, J. Y., and J.-O. Lee. 2011. Structural biology of the Toll-like receptor family. *Ann. Rev. Biochem.* **80**:917-941.

Koutsky, L. A., et al. 2002. A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N. Engl. J. Med.* **347**:1645-1651.

Plotkin, S. A., and W. A. Orenstein. 2003. *Vaccines*, 4th ed. Saunders.

Rajewsky, K., et al. 1969. The requirement of more than one antigenic determinant for immunogenicity. *J. Exp. Med.* **129**: 1131-1143.

Smith, Jane S. 1990. *Patenting the Sun: Polio and the Salk Vaccine*. Wm Morrow and Co.

Steinman, R. M., and Z. A. Cohn. 2007. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Immunol.* **178**:5-25.

Steinman, R. M., and H. Hemmi. 2006. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **311**:17-58.

Dos genes se convierten en uno: reordenamiento somático de los genes de inmunoglobulinas

N. Hozumi y S. Tonegawa, 1976, *Proc. Nat'l Acad. Sci USA* 73:3629

Durante décadas, los inmunólogos se preguntaron cómo el cuerpo era capaz de generar una multitud de inmunoglobulinas para combatir patógenos, denominadas anticuerpos, necesarias para eliminar el vasto número de bacterias diferentes y virus encontrados durante la vida. Claramente, estas proteínas protectoras, al igual que todas las proteínas, eran codificadas de algún modo por el genoma. Pero el enorme número de anticuerpos potenciales producidos por el sistema inmunitario hacía que fuese poco probable que genes individuales de inmunoglobulinas (Ig) codificaran todos los anticuerpos posibles que un individuo podría necesitar. En trabajos que comenzaron temprano en la década de 1970, Susumu Tonegawa, un biólogo molecular, sentó las bases para resolver el problema de cómo se generaba la diversidad de anticuerpos.

Antecedentes

Las investigaciones en la estructura de las moléculas de Ig brindaron algunas pistas acerca de la generación de la diversidad de anticuerpos. Primero, se demostró que la molécula de Ig se encuentra compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas idénticas (H) y dos cadenas ligeras idénticas (L). Algunos investigadores propusieron que la diversidad de los anticuerpos resultaba de la combinación de diferentes cadenas pesadas y ligeras. A pesar de que esta hipótesis reducía el número de genes necesarios, todavía requería que se dedicara una larga porción de genoma a los genes Ig. Luego, químicos de proteínas secuenciaron varias cadenas pesadas y ligeras de Ig. Encontraron que las regiones terminales C de las diferentes cadenas ligeras eran muy similares y entonces fueron denominadas región constante (C), mientras que las regiones terminales N eran altamente variables y así fueron denominadas región variable (V). Las secuencias de

diferentes cadenas pesadas exhibieron un patrón similar. Estos descubrimientos sugirieron que el genoma contenía un pequeño número de genes C y un grupo mucho más grande de genes V.

En 1965, W. Dryer y J. Bennett propusieron que dos genes separados, un gen V y un gen C, codifican cada cadena pesada y cada cadena ligera. A pesar de que esta proposición parecía lógica, violaba el principio bien documentado de que cada gen codifica un único polipéptido. Para evitar esta objeción, Dryer y Bennett sugirieron que los genes V y C eran de algún modo reordenados en el genoma para formar un único gen que era luego transcrito y traducido en un único polipéptido, de cadena pesada o de cadena ligera. Un apoyo indirecto para este modelo provino de estudios de hibridación del DNA que demostraron que solo un pequeño número de genes codificaban las regiones constantes de Ig. Sin embargo, hasta la aparición de técnicas más poderosas para el análisis de genes, fue imposible realizar una prueba definitiva del nuevo modelo de dos genes propuesto.

El experimento

Tonegawa pensó que, si los genes de inmunoglobulinas sufrían reordenamiento, entonces los genes V y C muy probablemente deberían estar localizados en puntos diferentes del genoma. El descubrimiento de las endonucleasas de restricción, enzimas que cortan el DNA en sitios específicos, había permitido el mapeo de algunos genes bacterianos. Sin embargo, dado que los genomas de mamíferos son mucho más complejos, el mapeo de los genes codificadores de las regiones V y C no era técnicamente posible. En cambio, basándose en técnicas de biología molecular recién desarrolladas, Tonegawa divisó otro modo para determinar si las regiones V y C eran codificadas por dos genes separados. Razonó que si ocurría reordenamiento de los

genes V y C entonces debería ocurrir durante la diferenciación de las células embrionarias a los linfocitos B secretoras de Ig. Además, si el reordenamiento ocurría, debería existir una diferencia detectable entre las líneas germinales de DNA no recombinadas de células embrionarias y el DNA de los linfocitos B secretoras de Ig. Así, se dedicó a comprobar si existían dichas diferencias utilizando una combinación de digestión con enzimas de restricción e hibridación DNA-RNA para detectar los fragmentos de DNA.

Comenzó por aislar DNA genómico de embriones de ratón y de linfocitos B de ratón. Para simplificar el análisis, utilizó una línea de linfocitos B tumorales, las cuales producían el mismo tipo de anticuerpo. Este DNA genómico luego fue digerido con la enzima de restricción *BamHI*, la cual reconoce una secuencia cuya presencia es relativamente rara en genomas de mamíferos. Así, el DNA fue roto en varios fragmentos de gran tamaño. Luego, él separó estos fragmentos de DNA utilizando electroforesis en gel de agarosa, que separa biomoléculas sobre la base de su carga y tamaño. Dado que el DNA porta en su totalidad una carga negativa, los fragmentos fueron separados según su tamaño. Posteriormente, cortó el gel en pequeñas partes y aisló el DNA de cada una de ellas. Ahora, Tonegawa tenía varias fracciones de partes de DNA de tamaños distintos. Podía entonces analizar estas fracciones de DNA para determinar si los genes V y C residían en el mismo fragmento en linfocitos B y en células embrionarias.

Para realizar este análisis, Tonegawa primero aisló el mRNA de los linfocitos B tumorales, que codifica el principal tipo de cadena ligera de Ig, denominado κ . Debido a que el RNA es complementario a una hebra de DNA a partir de la cual es transcrito, puede hibridar con dicha hebra y formar un híbrido RNA-DNA. Utilizando un marcado radioactivo del mRNA κ entero, Tonegawa produjo una prueba para detectar cuál de los fragmentos de DNA separados contenía el

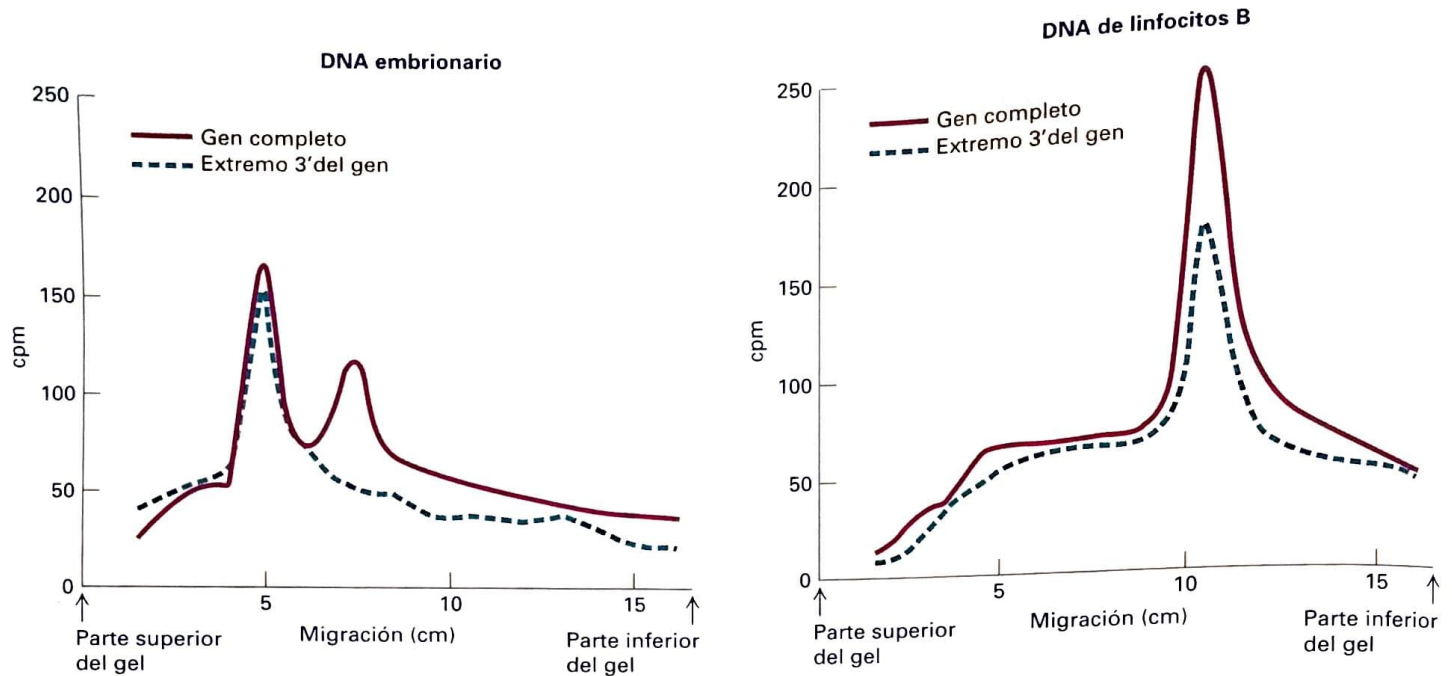


FIGURA 1 Resultados experimentales que demuestran que los genes que codifican las regiones variables (V) y constantes (C) de las cadenas ligeras κ son reordenados durante el desarrollo de los linfocitos B. Estas curvas ilustran la hibridación de las sondas marcadas de RNA, específicas para

el gen κ entero (V + C) y para el extremo 3' que codifica la región C, a fracciones de DNA de linfocitos B o embrionarios digeridos separados por electroforesis en gel de agarosa. (Adaptado de N. Hozumi y S. Tonegawa, 1976, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* **73** 3629).

gen de la cadena κ . A continuación, aisló el extremo 3' del mRNA κ y lo marcó con una sonda, y produjo así una segunda prueba que codificaría solo las secuencias de DNA que codificarían la región constante de la cadena κ . Con estas pruebas, una específica para la combinación de genes V + C y otra específica para C, Tonegawa se encontraba listo para comparar los fragmentos de DNA obtenidos de los linfocitos B y las células embrionarias.

Primero desnaturalizó el DNA de cada fracción en hebras simples y luego añadió una u otra a la sonda marcada. Encontró que la sonda específica de C hibridaba diferentes fracciones derivadas de las células embrionarias que del DNA de linfocito B (Fig. 1). Aún más revelador, la sonda completa de mRNA

marcado hibridó con dos fracciones diferentes del DNA embrionario, lo que sugirió que los genes V y C no se encuentran conectados y que el sitio de corte de *Bam*HI reside entre ellos dos. Tonegawa concluyó que, durante la formación de linfocitos B, los genes separados que codifican las regiones V y C son reordenados en una única secuencia de DNA que codifica la cadena ligera κ entera (Fig. 2).

Análisis

La generación de la diversidad de anticuerpos era un problema a la espera de un poderoso desarrollo de técnicas moleculares para ser resuelto. Tonegawa logró clonar los genes de la región V y probar que los reordenamientos

deben ocurrir somáticamente. Estos resultados afectaron la genética, como también la inmunología. Mientras que antes se creía que cada célula en el cuerpo contenía la misma información genética, se volvió claro que algunas células toman esa información y la alteran para cumplir sus propósitos. Además del reordenamiento somático, los genes Ig sufren una variedad de otras alteraciones que le permiten al sistema inmunitario crear un conjunto diverso de anticuerpos necesarios para reaccionar ante cualquier organismo invasor. Nuestro entendimiento actual de estos mecanismos reside en las bases del descubrimiento fundamental de Tonegawa. Por este trabajo, recibió el Nobel en Fisiología y Medicina en 1987.

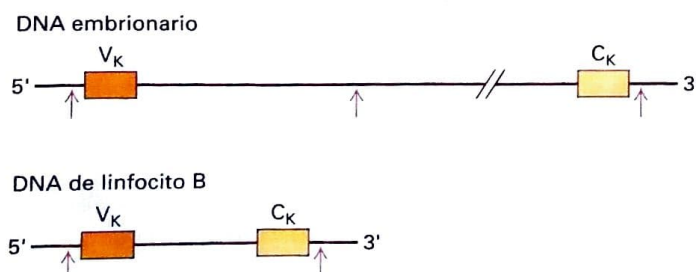
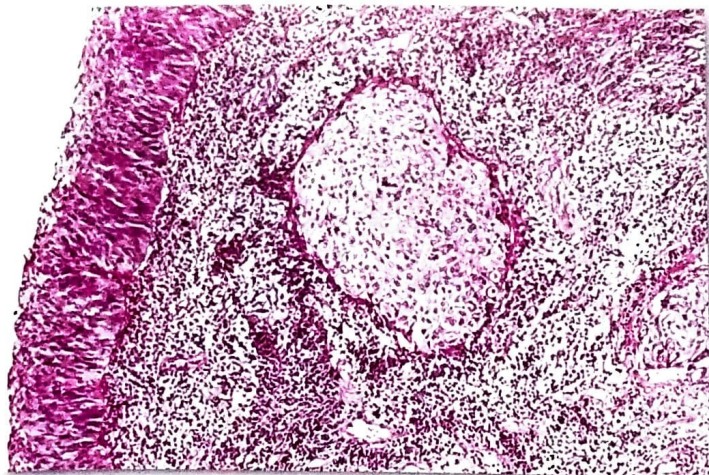


FIGURA 2 Diagrama esquemático de DNA de cadena ligera κ en células embrionarias y linfocitos B, consistente con los resultados de Tonegawa.

En las células embrionarias, los cortes con la enzima de restricción *Bam*HI (flechas rojas) producen fragmentos de dos tamaños diferentes, uno que contiene al gen V y uno que contiene al gen C. En los linfocitos B, el DNA es reordenado de modo tal que los genes V y C sean adyacentes, sin sitio de corte en el medio. Así, la digestión con *Bam*HI produce un fragmento que contiene a ambos genes: V y C.



Carcinoma nasofaríngeo. El carcinoma nasofaríngeo es un tumor maligno que se origina a partir del epitelio de la mucosa de la nasofaringe, la parte más elevada de la garganta. Los carcinomas nasofaríngeos pueden aparecer por fumar cigarrillos, comer comidas ricas en nitrosamina (como pescado curado en sal), o ser el resultado de una infección por el virus de Epstein-Barr. Este preparado muestra el carcinoma nasofaríngeo teñido con hematoxilina y eosina. (Biophoto Associates/PhotoResearchers).

Cáncer

El cáncer causa alrededor de una quinta parte de las muertes en los Estados Unidos cada año. En todo el mundo, anualmente entre 100 y 350 de 100 000 personas mueren a causa de esta enfermedad. El cáncer se debe a fallas de los mecanismos que por lo general controlan el crecimiento y la proliferación de las células. Durante el desarrollo normal y a lo largo de la vida adulta, intrincados sistemas de control genético regulan el equilibrio entre el nacimiento y la muerte celular en respuesta a señales de crecimiento, de inhibición del crecimiento y de muerte. La tasa de nacimiento y muerte celular determina el tamaño del cuerpo adulto y la tasa de crecimiento en alcanzar ese tamaño. En algunos tejidos adultos, la proliferación celular ocurre continuamente como una estrategia constante de renovación del tejido. Por ejemplo, las células epiteliales intestinales viven solo por unos pocos días antes de morir y ser reemplazadas; ciertos leucocitos son sustituidos con la misma rapidez, y por lo general las células de la piel sobreviven sólo por 2-4 semanas antes de ser descamadas. Sin embargo, las células en muchos tejidos adultos normalmente no proliferan, excepto durante procesos de curación. Tales células estables (hepatocitos, células del músculo cardíaco, neuronas) pueden permanecer funcionales por largos períodos o incluso durante la vida entera de un organismo. El cáncer ocurre cuando los mecanismos que mantienen estas tasas de crecimiento normal funcionan mal y causan división celular en exceso.

Las pérdidas en la regulación celular que originan la mayoría o todos los casos de cáncer se deben a daño genético, a menudo acompañado por influencias de químicos que promueven tumores, hormonas

y algunas veces virus (Fig. 24-1). Las mutaciones en dos amplias clases de genes han sido implicadas en la aparición del cáncer: **protooncogenes** y **genes supresores de tumores**. En general, los protooncogenes promueven el crecimiento celular; las mutaciones los convierten en **oncogenes** cuyos productos son excesivamente activos en la promoción del crecimiento. Usualmente, las mutaciones oncogénicas resultan en una expresión genética aumentada o bien en un producto hiperactivo. Por lo general, los genes supresores de tumores limitan el crecimiento, de manera que las mutaciones que los inactivan permiten una división celular inapropiada. Una tercera y más especializada clase de genes llamados **genes cuidadores o de mantenimiento** a menudo también está vinculada al cáncer. Los genes cuidadores normalmente protegen la integridad del genoma; cuando están inactivados, las células adquieren mutaciones adicionales a una velocidad mayor (incluyendo mutaciones que causan la desregulación del crecimiento celular y la proliferación y conducen al cáncer). Muchos de los genes en estas tres clases codifican proteínas que ayudan a regular la proliferación celular (entrada a y progresión a través del ciclo celular) o la muerte celular por **apoptosis**; otros codifican proteínas que participan en la reparación de DNA dañado.

Comúnmente, el cáncer resulta de las mutaciones que surgen durante la exposición de toda una vida a **carcinógenos**, sustancias encontradas en el ambiente, las cuales incluyen ciertos químicos y radiación. La mayoría de las células cancerosas han perdido uno o más sistemas de mantenimiento y reparación del genoma debido a mutación, lo cual podría

CONTENIDO

24.1	Células tumorales y aparición del cáncer	1114
24.2	La base genética del cáncer	1124
24.3	Cáncer y alteración de las vías reguladoras del crecimiento	1131

24.4	Cáncer y mutación de los reguladores de la división celular y los puntos de control	1140
24.5	Carcinógenos y genes cuidadores en cáncer	1144

FIGURA 24-1 Panorama de cambios en las células que causan cáncer.

Durante la carcinogénesis, se alteran seis propiedades celulares fundamentales, como se muestra aquí en este tumor que está creciendo dentro de un tejido normal, para dar origen al fenotipo completo y más destructivo de cáncer.

Los tumores menos peligrosos surgen solo cuando algunos de estos cambios ocurren. En este capítulo, examinamos los cambios genéticos que resultan en estas propiedades celulares alteradas. (Adaptado de Hanahan, D., y R. A. Weinberg, 2011. *Cell* 144:646-674.)

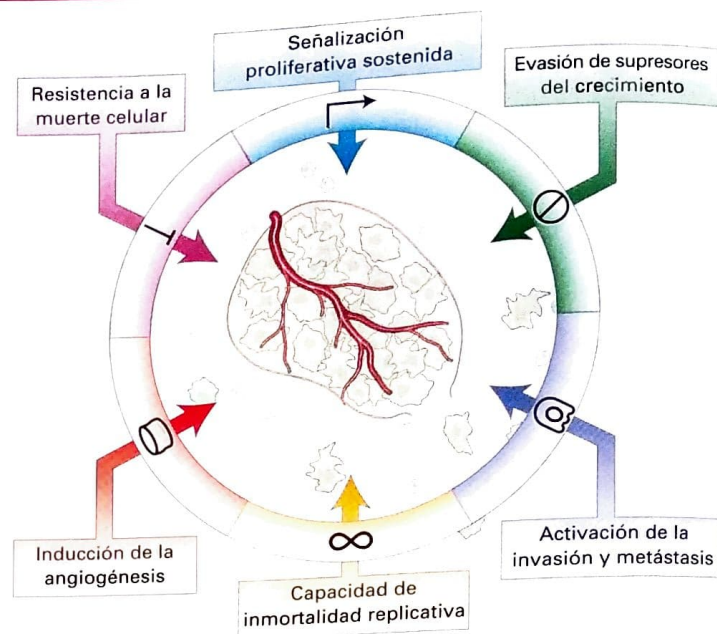
explicar el gran número de mutaciones adicionales que acumulan. Aunque las enzimas de reparación del DNA no inhiben de manera directa la proliferación celular, las células que han perdido su habilidad de reparar errores, espacios vacíos o extremos rotos en el DNA acumulan mutaciones en muchos genes, incluyendo aquellos que son críticos en el control del crecimiento y la proliferación celulares. De este modo, las mutaciones de pérdida de función en los genes cuidadores como los que codifican enzimas de reparación del DNA impiden que las células corrijan las mutaciones que inactivan genes supresores de tumores o activan oncogenes.

Las mutaciones que causan cáncer ocurren en su mayoría en células somáticas, no en las células de la línea germinal, y las mutaciones en células somáticas no se transmiten a la siguiente generación. Sin embargo, ciertas mutaciones heredadas, las cuales son transportadas en la línea germinal, incrementan la probabilidad de que el cáncer ocurra en algún momento. En una asociación destructiva, las mutaciones somáticas pueden combinarse con mutaciones heredadas para producir un cáncer.

El proceso de formación del cáncer, llamado *oncogénesis* o *tumorigénesis*, es una interacción entre la genética y el medioambiente. La mayoría de los cánceres surgen después de que los genes son alterados por carcinógenos o por errores en la copia y reparación de genes. Incluso si el daño genético ocurre solo en una célula somática, la división de esta célula transmitirá el daño a sus células hijas, lo que dará origen a un **clon** de células alteradas. Sin embargo, rara vez la mutación en un único gen conduce a la aparición de cáncer. Más típicamente, una serie de mutaciones en múltiples genes crea un tipo celular que prolifera de manera progresiva y con tanta rapidez que escapa de las restricciones del crecimiento normal, lo que crea una oportunidad para mutaciones adicionales. Las células también adquieren otras propiedades que les proporcionan una ventaja, como la habilidad de escapar de los epitelios normales y estimular el crecimiento de vascularización para obtener oxígeno. Finalmente, el clon de células crece hasta convertirse en un **tumor**. En algunos casos, las células del tumor primario migran a nuevos sitios, donde forman tumores secundarios, un proceso denominado **metástasis**. La mayoría de las muertes por cáncer se deben a tumores metastásicos invasores de crecimiento rápido.

La metástasis es un proceso complejo con muchos pasos. Es facilitado por las células tumorales que producen sus propios factores de crecimiento y angiogénicos (inductores del crecimiento de vasos sanguíneos). Las células móviles invasoras son las más peligrosas. Los tejidos que producen factores de crecimiento y en los cuales crece fácilmente nueva vascularización, como el hueso, los vasos sanguíneos y el hígado, son los más vulnerables a la invasión ya que estas características contribuyen para apoyar a los invasores.

El tiempo juega un papel importante en el cáncer. Se precisarían muchos años para acumular las múltiples mutaciones requeridas para



formar un tumor, de manera que la mayoría de los cánceres se desarrollan más tarde en la vida. El requerimiento de múltiples mutaciones también disminuye la frecuencia del cáncer en comparación con la necesaria si la tumorigénesis fuese disparada por una única mutación. Sin embargo, una enorme cantidad de células son, en esencia, mutagenizadas y puestas a prueba para el crecimiento alterado durante nuestras vidas, una selección poderosa a favor de estas células, la cual en este caso no queremos. Las células que proliferan con mayor rapidez se tornan más abundantes, sufren cambios genéticos adicionales y pueden volverse progresivamente más peligrosas. Además, el cáncer ocurre con mayor frecuencia después de la edad de reproducción y, por lo tanto, juega un papel menor en el éxito reproductivo. Entonces el cáncer es común, y en parte refleja vidas humanas cada vez más largas pero también la falta de selección evolutiva contra la enfermedad.

En este capítulo, primero introducimos las propiedades de las células tumorales y describimos el proceso de múltiples pasos de la oncogénesis. A continuación, consideramos los tipos generales de cambios genéticos que conducen a las características únicas de las células cancerosas y la interacción entre las mutaciones somáticas y las heredadas. Las secciones subsiguientes examinan en detalle cómo las mutaciones que afectan ambos procesos de promoción del crecimiento y la inhibición de este pueden resultar en proliferación celular excesiva. Concluimos el capítulo con un análisis del papel de los carcinógenos y cómo una rotura en los mecanismos de reparación en el DNA debida a la pérdida de genes cuidadores puede llevar a oncogénesis.

24.1 Células tumorales y aparición del cáncer

Antes de examinar en detalle las bases genéticas del cáncer, consideramos el proceso general de la tumorigénesis y las propiedades de las células tumorales que las diferencian de las células normales. En general,

(a)



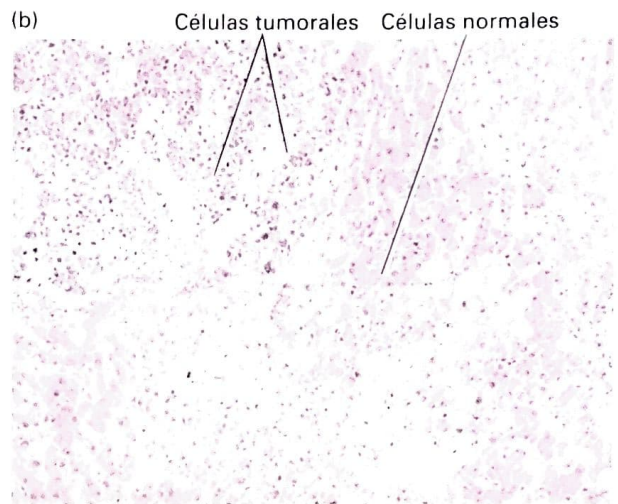
FIGURA 24-2 Vista macroscópica y microscópica de un tumor invadiendo tejido de hígado normal.

(a) La morfología macroscópica de un hígado humano en el cual un tumor de pulmón metastático está creciendo. Las protrusiones blancas en la superficie del hígado con las masas tumorales.

el cambio de una célula normal a una cancerosa involucra múltiples pasos, y cada uno añade propiedades que hacen que las células tengan más probabilidad de convertirse en un tumor. Los cambios genéticos que subyacen a la oncogénesis alteran varias propiedades celulares fundamentales, lo que permite que las células evadan los controles de crecimiento normal y, en última instancia, confieren el fenotipo completo de cáncer (véase Fig. 24-1). Las células cancerosas adquieren un impulso de proliferar que no requiere de una señal inductora externa. Fallan en detectar señales que restringen la división celular y siguen viviendo cuando deberían morir. Con frecuencia, cambian su adhesión a las células circundantes o a la matriz extracelular y se sueltan alejándose y diseminando el tumor. Hasta cierto punto, una célula cancerosa podría parecerse a un tipo celular normal en rápida división, pero la célula de cáncer y su progenie serán inmortales. Los tumores son característicamente *hipóxicos* (privados de oxígeno), de manera que para crecer más allá de un tamaño pequeño los tumores deben obtener un suministro sanguíneo. A menudo lo hacen por medio de señalización para inducir el crecimiento de vasos sanguíneos dentro del tumor. Conforme el cáncer progresa, los tumores se vuelven un órgano anormal, cada vez mejor adaptado al crecimiento y a la invasión de los tejidos circundantes.

Las células animales normales a menudo se clasifican según su tejido embrionario de origen, y la denominación de los tumores ha seguido su ejemplo. Los tumores malignos se clasifican en *carcinomas* si derivan de epitelios como el endodermo (epitelio del intestino) o el ectodermo (piel y epitelio neuronal) y *sarcomas* si derivan de mesodermo (músculo, sangre y precursores de tejido conjuntivo). Los carcinomas son, de lejos, el tipo más común de tumor maligno (más del 90%). La mayoría de los tumores son masas sólidas, pero las *leucemias*, una clase de sarcomas, crecen como células individuales en la sangre (el nombre *leucemia* se deriva del latín para “sangre blanca”: la proliferación masiva de células leucémicas puede hacer que la sangre de un paciente tenga un aspecto lechoso). Los *linfomas*, otro tipo de sarcoma maligno, son tumores sólidos de linfocitos y células plasmáticas. Los tumores cerebrales malignos pueden derivarse de células neurales, y los *glioblastomas* son tumores de las células gliales que constituyen el mayor tipo celular en el cerebro.

(b)



(b) Una micrografía óptica de una sección del tumor en (a) que muestra áreas de células tumorales pequeñas, teñidas de color oscuro invadiendo una región de células normales de hígado más grandes, teñidas de color claro. (Cortesía de J. Braun.)

Las células tumorales metastásicas son invasoras y pueden diseminarse

Los tumores surgen con gran frecuencia, en especial en individuos mayores, pero la mayoría representa poco riesgo a su huésped debido a que son localizados y de pequeño tamaño. Llamamos a dichos tumores **benignos**; un ejemplo es una verruga, un tumor benigno de la piel. Las células que componen los tumores benignos son muy parecidas y pueden funcionar como células normales. Las moléculas de adhesión celular que mantienen unidos a los tejidos hacen lo propio con las células tumorales benignas, al igual que con las células normales, localizadas en los tejidos en los que se originaron. Usualmente, una cápsula fibrosa limita la extensión de un tumor benigno y lo hace un blanco fácil para un cirujano. Los tumores benignos se vuelven graves problemas médicos solo si su masa interfiere con las funciones normales o si secretan cantidades excesivas de sustancias biológicamente activas, como las hormonas. La acromegalia, el crecimiento excesivo de cabeza, manos y pies, por ejemplo, puede ocurrir cuando un tumor pituitario benigno causa una superproducción de la hormona de crecimiento.

En contraste, las células que componen un tumor **maligno** (canceroso) (Fig. 24-2) en general crecen y se dividen más rápidamente que las células normales y no mueren a la velocidad usual. Una característica clave de las células malignas es su capacidad para invadir tejidos cercanos, propagándose y sembrando tumores nuevos a medida que las células siguen proliferando. Algunos tumores malignos, como aquellos en el ovario o la mama, permanecen localizados y encapsulados, al menos por un tiempo. Cuando estos tumores progresan, las células invaden los tejidos adyacentes y metastatizan (Fig. 24-3a). Eventualmente, la mayoría de las células malignas adquieren la capacidad de hacer metástasis. Así, las principales características que diferencian los tumores metastásicos (o malignos) de los benignos son sus habilidades para invadir tejidos cercanos y diseminarse a sitios distantes en el cuerpo.

Las células normales están restringidas a su lugar en un órgano o tejido por adhesión célula-célula y por barreras físicas como la *lámina basal*, la cual está por debajo de capas de células epiteliales y también rodea las células endoteliales de vasos sanguíneos (véase Cap. 20). En

ciertas células tienen la habilidad de dividirse en forma incontrolada y generar nuevos tumores; dichas células son *células madre del cáncer*, analizadas en la siguiente sección.

El entorno local afecta la formación de tumores heterogéneos por células madre del cáncer

Algunos tipos de tumores parecieran tener sus propias células madre; es decir, estas son las únicas células tumorales capaces de sembrar un nuevo tumor. El concepto es que, dentro de un tumor, algunas células dejarán de dividirse mientras que otras continuarán el crecimiento canceroso. Por supuesto, las últimas son las más peligrosas y las más importantes para destruir con tratamiento anticáncer. Se cree que las células madre del cáncer originan algunas células con altas capacidades replicativas y otras con un potencial replicativo más limitado. Aún no está claro cómo muchos tipos de tumores tienen células madre que difieren de la mayoría de las otras células en el tumor.



Una manera de identificar las células madre del cáncer es purificar distintas clases de células de un tumor basándose en diferencias en sus marcadores de superficie, por lo general mediante el uso de un clasificador celular activado por fluorescencia (FACS; véase Cap. 9). Las pruebas de trasplante, usualmente en ratones, revelan qué clases de célula tienen la capacidad de sembrar un nuevo tumor y cuáles no. Por ejemplo, una muestra de unos pocos cientos de células tumorales de cerebro humano con un antígeno llamado *CD133* en la superficie es potente para iniciar nuevos tumores en ratones inmunitariamente deprimidos, mientras que una muestra de muchos miles de células tumorales sin *CD133* fue incapaz de sembrar tumores. Hallazgos similares han sido hechos para el mieloma múltiple de ser humano; la mayoría de las células (> 95%) expresan un marcador llamado *CD138*. La pequeña población de células que carece de *CD138* tiene una capacidad considerablemente mayor que el resto de las células para iniciar el crecimiento de un tumor. Estos hallazgos sugieren que identificar las células madre del cáncer y luego hacer de esas células el objetivo específico de fármacos o anticuerpos podría ser una terapia contra el cáncer más efectiva que convertir en dianas las células de la masa tumoral. ■

Los resultados con las células madre del cáncer destacan tres puntos importantes. Primero, los tumores no siempre se componen de células uniformes, incluso si son originados a partir de una única célula iniciadora. Segundo, una minoría de las células podría ser la verdaderamente peligrosa. Tercero, las células tumorales podría crecer con mayor rapidez o más lentitud dependiendo de si se encuentran en un entorno particular. Tal como las células madre pueden ser mantenidas en un estado de división, no diferenciado, en virtud de ocupar un nicho apropiado (véase Cap. 21), las células madre tumorales podrían comportarse según el entorno. Algunas células vecinas podrían ser más propicias para el crecimiento de células tumorales o de células madre del cáncer que otras. De este modo, el entorno de células tumorales, llamado *microentorno del tumor*, puede tener un dramático impacto en la habilidad de las células tumorales para crecer.

La idea de que el microentorno del tumor es importante se extiende a la trascendencia de uno de los entornos más comunes para una célula tumoral: las células inflamatorias. Con frecuencia, los cánceres surgen en sitios de heridas o infecciones crónicas. Las células inmunitarias migran a sitios de lesiones y allí producen factores de crecimiento para promover la curación, y la matriz extracelular es reconstruida. To-

das estas propiedades locales del tejido podrían contribuir al establecimiento y el crecimiento de un tumor. Se estima que más del 20% de los cánceres se asocian con la infección crónica. Por ejemplo, la infección persistente de *Helicobacter pylori* se asocia con cáncer gástrico y linfoma del tejido linfóide asociado con la mucosa. Las infecciones con virus de la hepatitis B o C incrementan el riesgo de carcinoma hepatocelular.

Una respuesta inflamatoria no solo puede promover la tumorigénesis, sino que la formación del tumor en sí puede disparar una respuesta inflamatoria. Ciertos oncogenes inducen un programa transcripcional que conduce al reclutamiento de células inmunitarias, especialmente macrófagos. Los macrófagos y otros linfocitos producen citocinas promotoras de tumores y disparan una respuesta inflamatoria, lo cual proporciona a las células del cáncer de factores de crecimiento adicionales y promueve el crecimiento de vasos sanguíneos; este proceso (como estudiaremos a continuación) es un aspecto esencial del crecimiento tumoral.

El crecimiento tumoral requiere de la formación de nuevos vasos sanguíneos

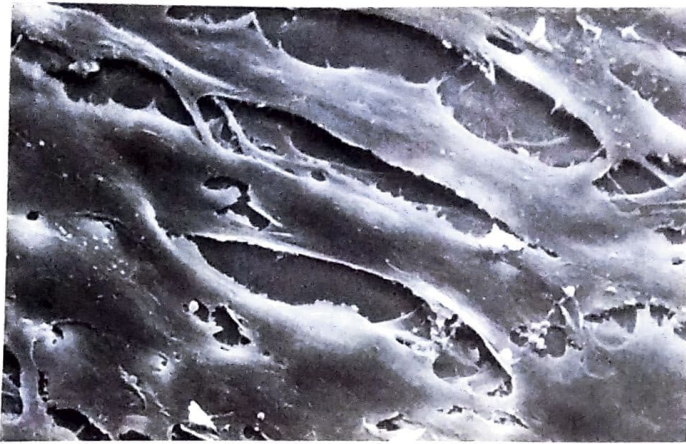
Los tumores, sean primarios o secundarios, requieren del reclutamiento de nuevos vasos sanguíneos a fin de convertirse en una gran masa. En la ausencia de un suministro de sangre, un tumor puede convertirse en una masa de unas 10^6 células, más o menos una esfera de 2 mm de diámetro. En este punto, la división de células en el exterior de la masa tumoral es compensada por la muerte de aquellas en el centro causada por un suministro inadecuado de nutrientes. Dichos tumores, a menos que secreten hormonas, causan pocos problemas. Sin embargo, la mayoría de los tumores inducen la formación de nuevos vasos sanguíneos que invaden el tumor y lo nutren, un proceso llamado *angiogénesis*. Este complejo proceso requiere de varios pasos individuales: degradación de la lámina basal que rodea un capilar cercano, migración de las células endoteliales que recubren internamente el capilar hacia el tumor, división de estas células endoteliales y formación de una nueva lámina basal alrededor del capilar recientemente alargado.

Muchos tumores producen factores de crecimiento que estimulan la angiogénesis; otros de alguna manera inducen a las células normales circundantes a sintetizar y secretar dichos factores. El factor de crecimiento de fibroblasto básico (b-FGF), el factor de crecimiento transformador α (TGF α) y el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), los cuales son secretados por muchos tumores, tienen propiedades angiogénicas. Nuevos vasos sanguíneos nutren el tumor en crecimiento; así, permiten que aumente de tamaño y se incrementa la probabilidad de que ocurran mutaciones dañinas adicionales. La presencia de un vaso sanguíneo adyacente también facilita el proceso de metástasis.

En los seres humanos existen cinco genes de VEGF y tres genes de proteínas receptoras de VEGF. La expresión de VEGF puede ser inducida por hipoxia, la privación de oxígeno en las células que ocurre cuando $[pO_2]$ es < 7 mm Hg. Los receptores de VEGF, los cuales son tirosincinasas, regulan diferentes aspectos del crecimiento de vasos sanguíneos como la supervivencia de células endoteliales (pared de los vasos sanguíneos) y crecimiento, migración celular y permeabilidad de la pared vascular.

La señal de hipoxia está mediada por el factor inducible por hipoxia (HIF-1), un factor de transcripción que es activado en condiciones de bajo oxígeno y que luego se une a e induce la transcripción del gen de VEGF y de otros 30 genes, muchos de los cuales pueden afectar la probabilidad de crecimiento de un tumor. Entre estos hay enzimas glucolíticas como lactato deshidrogenasa; de este modo, HIF-1 tam-

(a)



(b)



FIGURA EXPERIMENTAL 24-4 Micrografías electrónicas de barrido revelan las diferencias organizacionales y morfológicas entre células 3T3 normales y transformadas. (a) Las células 3T3 normales son alargadas y están alineadas y cercanamente empaquetadas de una manera ordenada. (b) Las células 3T3 transformadas por un oncogén codificado por el virus del sarcoma de Rous son redondeadas y están cubiertas por procesos pequeños

similares a cabellos y proyecciones bulbosas. Las células transformadas han perdido la organización una al lado de la otra de las células normales y crecen apiladas. Estas células transformadas tienen muchas de las propiedades que las células malignas. Cambios similares son vistos en células transfectadas con el DNA de cánceres humanos que contienen el oncogén *ras*^D. (Cortesía de L. B. Chen.)

bién podría ayudar a las células tumorales a adaptarse al bajo oxígeno recurriendo a la glucólisis en lugar de la fosforilación oxidativa para la generación de ATP. A su vez, la actividad de HIF-1 es controlada por un sensor de oxígeno compuesto por una prolil hidroxilasa que está activa en niveles normales de O_2 pero inactiva cuando carece de O_2 . La hidroxilación de HIF-1 causa la ubiquitinación y degradación del factor de transcripción, un proceso que está bloqueado cuando el O_2 está bajo. Los compuestos que inhiben la angiogénesis han suscitado gran interés como potenciales agentes terapéuticos. Sin embargo, hasta ahora su éxito en la práctica clínica ha sido limitado.

Mutaciones específicas transforman células en cultivo en tumorales

La morfología y las propiedades del crecimiento de las células tumorales claramente difieren de aquellas de sus contrapartes normales; algunas de estas diferencias también son evidentes cuando las células son cultivadas. Que las mutaciones causan estas diferencias fue establecido de manera concluyente por experimentos de transfección con una línea cultivada de fibroblastos de ratón llamadas *células 3T3*. Por lo general, estas células crecen solo cuando están ancladas a la superficie plástica de una placa de cultivo y son mantenidas a baja densidad celular. Debido a que las células 3T3 detienen su crecimiento cuando se contactan con otras células, eventualmente forman una monocapa de células bien ordenadas que ha cesado su proliferación y están en la fase quiescente G_0 del ciclo celular (Fig. 24-4a).

Cuando el DNA de células cancerosas de vejiga humana es transfectado en células 3T3 en cultivo, cerca de una célula en un millón incorpora un segmento particular del DNA exógeno que causa un cambio fenotípico. La progenie de la célula afectada es más redondeada y menos adherente una a la otra y a la placa de lo que son las células normales circundantes, lo que forma un grupo tridimensional de células (un foco) que puede ser reconocido con el microscopio (Fig. 24-4b). Dichas células, las cuales continúan creciendo cuando las células normales se han vuelto quiescentes, han sufrido una **transformación** oncogenética.

ca. Las células transformadas tienen propiedades similares a aquellas de las tumorales malignas, incluyendo cambios en la morfología celular, la habilidad de crecer sin estar ancladas a una matriz extracelular, el requerimiento reducido de factores de crecimiento, la secreción del activador de plasminógeno y la pérdida de los microfilamentos de actina.

La Figura 24-5 esquematiza el procedimiento para la transformación de células 3T3 con DNA de un cáncer de vejiga humana y la clonación del segmento específico de DNA que causa la transformación. Fue notable que una sola pieza pequeña de DNA tuviera esta capacidad; si se hubiera necesitado que se incorporara más de un fragmento de DNA para inducir la transformación, el experimento habría fracasado. Los estudios subsiguientes mostraron que el segmento clonado incluyó una versión mutante del gen celular *ras*, donde la glicina normalmente encontrada en la posición 12 es reemplazada por una valina. Este mutante fue designado *ras*^D, donde la D representa “dominante”. La mutación es genéticamente dominante debido a que la proteína activa tiene un efecto incluso en la presencia del otro alelo normal *ras*. La **proteína Ras** normal, la cual participa en muchas vías de transducción de señales intracelulares activadas por factores de crecimiento (véase Cap. 16), cicla entre un estado inactivo, “apagado”, con GDP unido y un estado activo, “encendido”, con GTP unido. La proteína Ras^D mutada hidroliza el GTP unido muy lentamente y, por lo tanto, se acumula en el estado activo, enviando una señal promotora del crecimiento hacia el núcleo incluso en ausencia de las hormonas normalmente requeridas para activar su función de señalización.

La producción y activación constitutiva de la proteína Ras^D no es suficiente para causar la transformación de células normales en un cultivo primario (fresco) de fibroblastos de ser humano, rata o ratón. Sin embargo, a diferencia de las células en un cultivo primario, las células 3T3 cultivadas ya portan varias mutaciones, incluyendo mutaciones de pérdida de función en los genes *p19ARF* o *p53*, los cuales son reguladores del ciclo celular y de la supervivencia de la célula. Estas mutaciones permiten a las células 3T3 crecer por un tiempo ilimitado en cultivo si periódicamente son diluidas y provistas de nutrientes, lo cual las células normales no mutagenizadas no pueden hacer (véase Fig. 9-1b). Estas células 3T3 **inmortales** son transformadas completamente en cé-

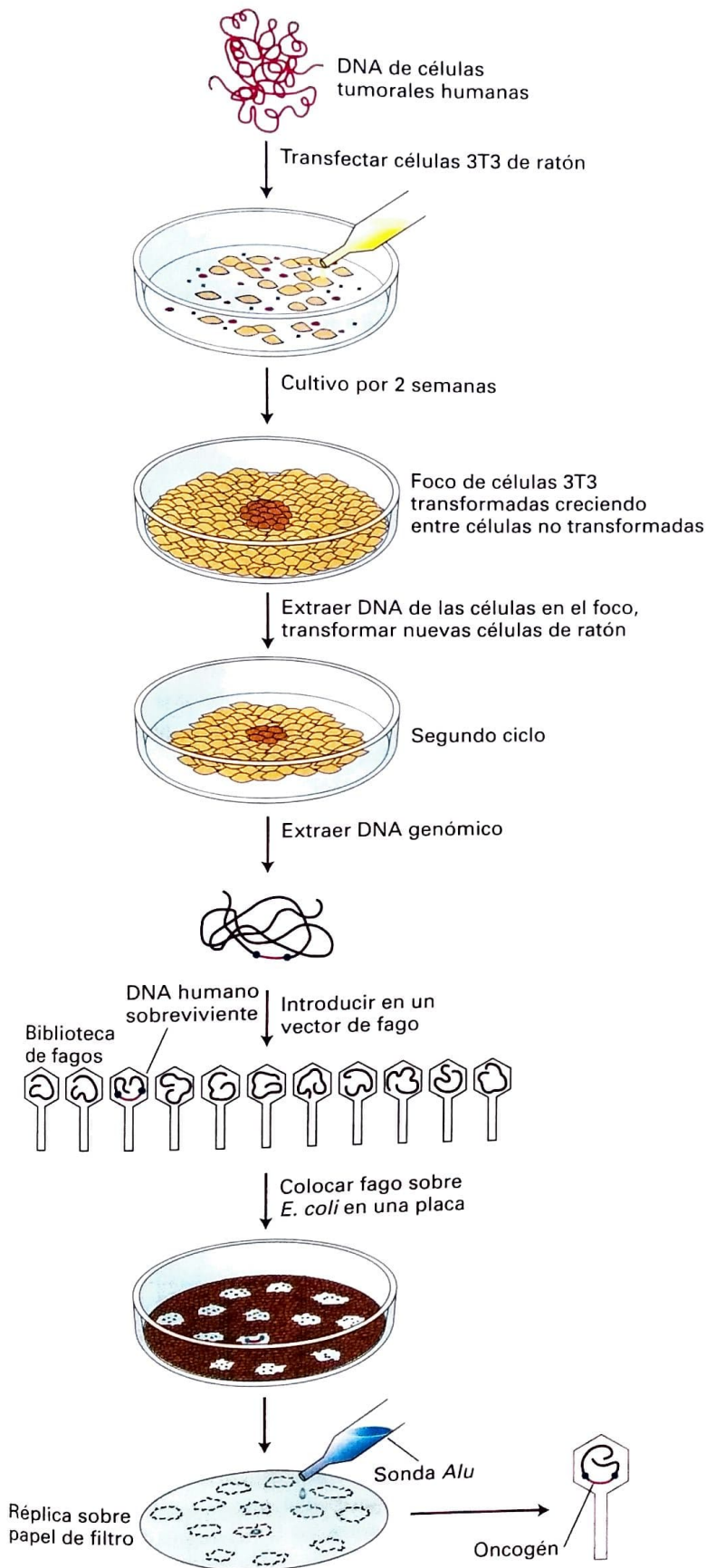


FIGURA EXPERIMENTAL 24-5 La transformación de células de ratón con DNA de una célula cancerosa de ser humano permite la identificación y la clonación molecular del oncogén *ras*^P. La adición de DNA de cáncer de vejiga humano a un cultivo de células 3T3 de ratón causa que cerca de una célula en un millón se divida anormalmente y forme un foco, o clon, de células transformadas. Para clonar el oncogén responsable de la transformación, se toma ventaja del hecho de que la mayoría de los genes humanos tienen en sus inmediaciones secuencias de DNA repetitivo llamadas secuencias *Alu*. El DNA del foco inicial de las células de ratón transformadas es aislado, y el oncogén es separado del DNA humano adventicio por medio de una transferencia secundaria a células de ratón. El DNA adventicio es DNA humano que no tiene ningún efecto sobre la transformación celular pero que simplemente quedó en una célula que también contiene el oncogén activo. El DNA total de una célula de ratón transfectada secundariamente es luego clonado en el bacteriófago λ ; solo el fago que recibe el DNA humano hibrida con una sonda *Alu*. El fago que hibrida debería contener parte o todo el gen transformante. Este resultado esperado puede ser probado mostrando que el DNA del fago puede transformar células (si el oncogén ha sido completamente clonado) o que la pieza de DNA clonada está siempre presente en células transformadas por transferencia de DNA a partir de la célula de cáncer de vejiga donante original.

lulas tumorales solo cuando producen una proteína Ras constitutivamente activa u otras oncoproteínas. Por esta razón, la transfección con el gen *ras*^P puede transformar células 3T3 pero no células de fibroblasto normales en cultivo primario en células tumorales.

Un gen mutante *ras* se encuentra en la mayoría de los cánceres de colon, vejiga, páncreas y otros cánceres pero no en el DNA humano normal; de este modo, debe surgir como resultado de una mutación somática en una de las células tumorales progenitoras. Como veremos en la Sección 24.2, cualquier gen, tal como *ras*^P, que codifique una proteína capaz de transformar las células en cultivo o de contribuir con el cáncer en animales se conoce como un **oncogén**. Un oncogén surge de un gen celular normal, un protooncogén, como el *ras*.

Varias líneas de evidencia apoyan un modelo de impacto múltiple de inducción del cáncer

Como se ha señalado anteriormente e ilustrado por la transformación oncogénica de células 3T3, se requiere de múltiples mutaciones para convertir un cuerpo celular normal en uno maligno. Según este modelo "de impacto múltiple", los cánceres evolucionados (o "la supervivencia del más apto") surgen por un proceso de selección clonal no muy diferente de la selección de animales individuales en una población grande. Aquí está el escenario, el cual podría o no aplicarse a todos los cánceres: una mutación en una célula, quizá en una célula madre, le daría una ligera ventaja de crecimiento. Una de las células de la progenie sufriría luego una segunda mutación que le permitiría a sus descendientes crecer de manera más incontrolada y formar un pequeño tumor benigno; una tercera mutación en una célula dentro de este tumor le permitiría aventajar en crecimiento a las otras y superar las restricciones impuestas por el microentorno del tumor, y su progenie formaría una masa de células, cada una de las cuales tendría estas tres mutaciones. Una mutación adicional en una de estas células le permitiría a su progenie escapar hacia el torrente sanguíneo y establecer colonias hijas en otros sitios, el sello distintivo del cáncer metastásico. Este modelo hace dos predicciones fácilmente contrastables.

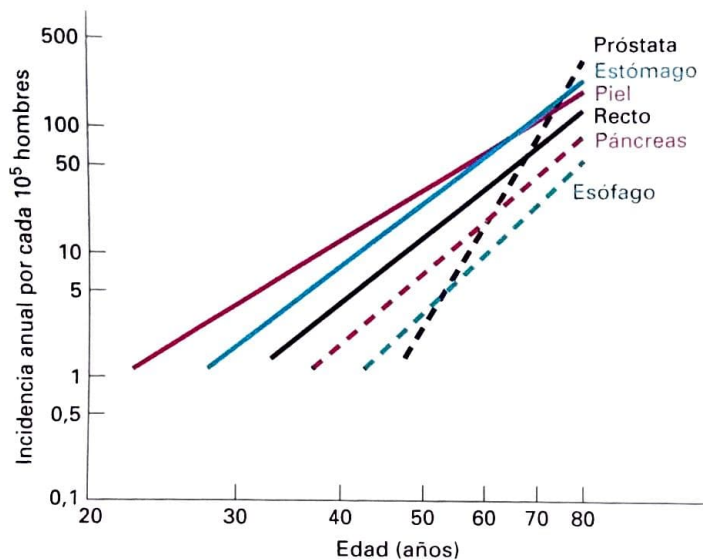


FIGURA EXPERIMENTAL 24-6 La incidencia de cánceres humanos aumenta en función de la edad. El marcado aumento en la incidencia con la edad es consistente con el modelo de impacto múltiple de inducción del cáncer. Nótese que el logaritmo de la incidencia anual se representa versus el logaritmo de la edad. (De B. Vogelstein y K. Kinzler, 1993, *Trends Genet* 9:101.)

Primero, todas las células en un tumor dado deberían tener por lo menos algunas alteraciones genéticas en común. El análisis sistemático de células de tumores humanos individuales apoya la predicción de que todas las células son derivadas de un único progenitor. Recordemos que durante el desarrollo fetal de una hembra humana cada célula inactiva uno de los dos cromosomas X. Una mujer es un mosaico genético: la mitad de sus células tienen un X inactivado, y las restantes tienen el otro X inactivado. Si un tumor no surgiera de un único progenitor, estaría compuesto de una mezcla de células con uno o el otro X inactivado. Sin embargo, se observa lo opuesto: todas las células en un tumor tomado de una mujer tienen el mismo cromosoma X inactivado. Diferentes tumores pueden estar compuestos por células con el X materno o el paterno inactivo. Segundo, la incidencia de cáncer debería aumentar con la edad debido a que puede tomar décadas para que las mutaciones requeridas ocurran. Asumiendo que la tasa de mutación es constante durante el período de una vida, entonces la incidencia de la mayoría de los tipos de cáncer sería independiente de la edad si solo una mutación fuera requerida para convertir una célula normal en una maligna. De hecho, las estimaciones actuales sugieren que 5-6 “impactos”, o mutaciones, deben acumularse a medida que las células cancerosas más peligrosas emergen. Como muestran los datos en la Figura 24-6, la incidencia de muchos tipos de cáncer humano de hecho no aumenta drásticamente con la edad.

Una evidencia más directa de que se requieren múltiples mutaciones para la inducción de un tumor surge de ratones transgénicos. Una variedad de combinaciones de oncogenes puede cooperar con la causa del cáncer. Por ejemplo, se han hecho ratones que portan ya sea el oncogén dominante *ras^{V12}* mutante (una versión de *ras^D*) o el protooncogén *c-myc*, en cada caso bajo el control de un promotor/amplificador específico de célula mamaria de un retrovirus. El promotor es inducido por niveles de hormona endógenos y reguladores específicos de tejido, lo que lleva a la sobreexpresión de *c-myc* o *ras^{V12}* en el tejido mamario. La proteína myc es un factor de transcripción que induce la expresión de muchos genes requeridos para la tran-

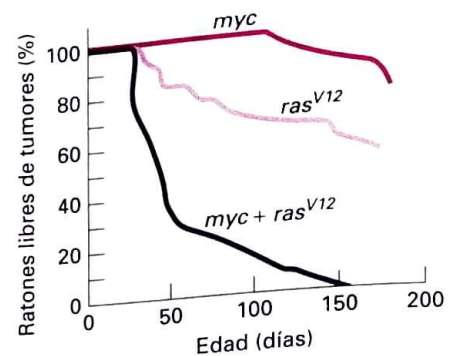


FIGURA EXPERIMENTAL 24-7 La cinética de la aparición tumoral en ratones hembra que portan uno o dos transgenes oncogénicos muestra la naturaleza cooperativa de las mutaciones múltiples en la inducción del cáncer. Cada uno de los transgenes fue dirigido por el promotor específico de mama de virus de tumor mamario de ratón. La estimulación hormonal asociada con la preñez activa el promotor de virus de tumor mamario de ratón y, por lo tanto, la sobreexpresión de transgenes en el tejido mamario. El gráfico muestra el curso temporal de la tumorigénesis en ratones que portan los transgenes *myc* o *ras^{V12}* así como la progenie de un cruzamiento de portadores *myc* con portadores *ras^{V12}* que contienen ambos transgenes. Los resultados demuestran claramente los efectos cooperativos de mutaciones múltiples en la inducción del cáncer. (Véase E. Sinn y cols., 1987, *Cell* 49:465.)

sición desde la fase G_1 a la fase S del ciclo celular. La transcripción aumentada de *c-myc* imita las mutaciones oncogénicas previamente identificadas que activan la transcripción de *c-myc*, lo que convierte el protooncogén en un oncogén. Por sí mismo, el transgén *c-myc* causa tumores solo después de 100 días y solo en unos pocos ratones; está claro que únicamente una fracción diminuta de las células mamarias que producen la proteína Myc en exceso se vuelven de hecho malignas. En forma similar, la sola producción de la proteína Ras^{V12} mutante causa tumores antes, pero aun así lentamente, y con cerca del 50% de eficiencia durante 150 días. Sin embargo, cuando los transgénicos *c-myc* y *ras^{V12}* son cruzados de manera que todas las células mamarias produzcan en exceso Myc y Ras^{V12}, los tumores surgen mucho más rápidamente y todos los animales sucumben al cáncer (Fig. 24-7). Tales experimentos hacen énfasis en los efectos sinérgicos de múltiples oncogenes. También sugieren que la latencia prolongada de la formación de un tumor, incluso en los ratones transgénicos dobles, se debe a la necesidad de adquirir aún más mutaciones somáticas.

Efectos cooperativos similares entre oncogenes pueden ser vistos en células en cultivo. Por ejemplo, la transfección de fibroblastos normales (fibroblastos 3T3 no immortalizados) con cualquiera *c-myc* o *ras^D* activado no es suficiente para la transformación oncogénica, mientras que cuando son transfectados juntos, los dos genes cooperan para transformar las células. Los niveles no regulados de solo *c-myc* inducen la proliferación, pero también sensibilizan a los fibroblastos a la apoptosis. La sobreexpresión de solo *ras^D* activado induce a las células a que entren en un estado en el que no ya no pueden dividirse, el cual se denomina *senescencia*. Cuando los dos oncogenes son expresados en la misma célula, estas respuestas celulares son neutralizadas y las células experimentan transformación. Mientras que los ejemplos mencionados son combinaciones de transformaciones de cultivos celulares combinando un oncogén con la pérdida de un gen supresor de tumores.

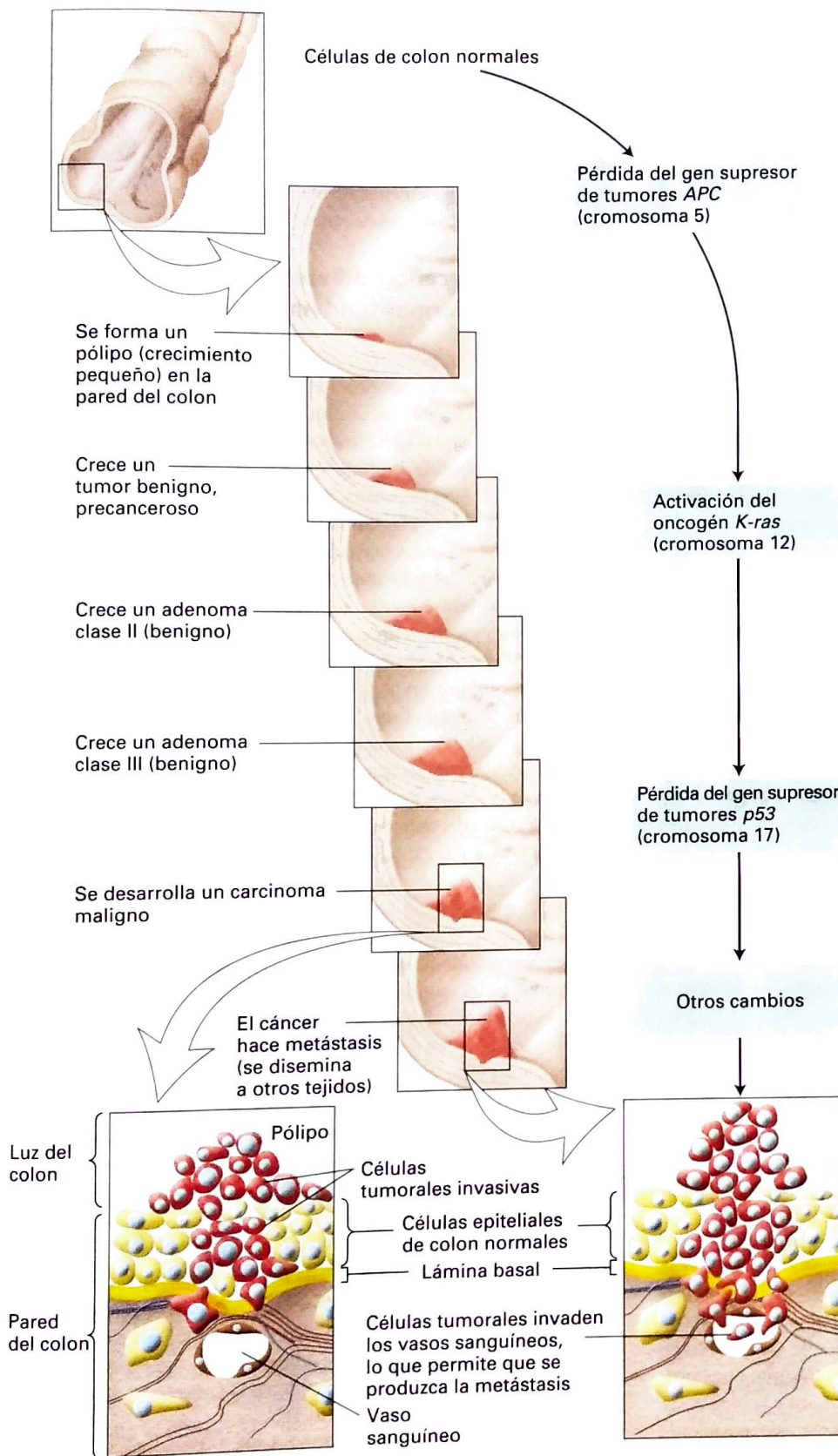


FIGURA 24-8 El desarrollo y la metástasis del cáncer colorrectal humano y sus bases genéticas. Una mutación en el gen supresor de tumores APC en una sola célula epitelial causa que la célula se divida, aunque las células circundantes no lo hagan, y se forme una masa localizada de células tumorales benignas, o un pólipo. Mutaciones subsiguientes llevan a la expresión de una proteína Ras constitutivamente activa y a la pérdida del gen supresor de tumores p53. Esto, junto con cambios genéticos que aún deben ser identificados, genera una célula maligna. La célula continúa dividiéndose, y la progenie invade la lámina basal que rodea el tejido. Algunas células tumorales se diseminan a los vasos sanguíneos, que las distribuirán a otros sitios en el cuerpo. Mutaciones adicionales permiten que las células tumorales salgan de los vasos sanguíneos y proliferen en sitios distantes; se dice que una persona con tal tumor tiene cáncer. (Adaptado de B. Vogelstein y K. Kinzler, 1993, *Trends Genet.* 9:101)

Mutaciones oncogénicas sucesivas pueden rastrearse en cánceres de colon

Los estudios en cáncer de colon proveen la evidencia más convincente hasta la fecha para el *modelo de impacto múltiple del cáncer*. Los cirujanos

nos pueden obtener muestras bastante puras de muchos cánceres humanos, pero dado que el tumor se observa tan solo en un momento, su estadio exacto de progresión no puede ser fácilmente determinado. Una excepción es el cáncer de colon, el cual evoluciona a través de estadios morfológicos definidos, bien caracterizados. Estos estadios intermedios

(pólipos, adenomas benignos y carcinomas) pueden ser aislados por un cirujano, y esto permite que cada una de las mutaciones que ocurren en cada uno de los estadios morfológicos sea identificada. Numerosos estudios demuestran que el cáncer de colon surge de una serie de mutaciones que comúnmente ocurren en un orden bien definido, lo que provee un fuerte apoyo para el modelo de impacto múltiple (Fig. 24-8).

El entendimiento de la progresión del cáncer de colon provino primero del estudio de las predisposiciones heredadas a cáncer de colon como la poliposis adenomatosa familiar. Las mutaciones en la vía de señalización de Wnt han sido identificadas en muchos de estos síndromes, y ahora se cree que la desregulación de la señalización de Wnt resulta en la formación de pólipos (crecimientos precancerosos) en el interior de la pared del colon (no solo en personas con síndromes de poliposis heredados, sino también en aquellas afectadas por formas esporádicas de cáncer de colon). APC (adenomatous polyposis coli) es un regulador negativo de la señalización de Wnt, el cual promueve la entrada al ciclo celular al activar la expresión del gen *c-myc* (véase Cap. 16). De este modo, la ausencia de proteína APC funcional conduce a la producción inapropiada de Myc, y las células homocigotas para las mutaciones en APC proliferan a una velocidad mayor de lo normal y forman pólipos. Las mutaciones de pérdida de función en el gen APC son las más frecuentes encontradas en los estadios tempranos del cáncer de colon. La mayoría de las células en un pólipo contienen las mismas una o dos mutaciones en el gen APC que resultan en su pérdida o inactivación, lo que indica que son clones de la célula en la cual ocurrió la mutación original. Así, APC es un gen supresor de tumores, y ambos alelos del gen APC deben portar una mutación inactivante para que se formen pólipos debido a que las células con un gen APC silvestre expresan suficiente proteína APC como para funcionar normalmente.

Si una de las células en un pólipo experimenta otra mutación, esta vez una mutación inactivante del gen *ras*, su progenie se divide en forma aún más incontrolada y se forma un adenoma más grande. Le sigue la inactivación del gen *p53*, y esta resulta en la pérdida gradual de la regulación normal y la consecuente formación de un carcinoma maligno (véase Fig. 24-8). La proteína *p53* es un supresor de tumores que detiene la progresión a través del ciclo celular en respuesta al daño en el DNA. Mientras que los tres “impactos” listados aquí son por cierto partes cruciales del panorama, es probable que sean eventos genéticos de contribución adicional. Sin embargo, no todo cáncer de colon adquiere todas las últimas mutaciones o las adquiere en el orden representado en la Figura 24-8. De este modo, las diferentes combinaciones de mutaciones podrían resultar en el mismo fenotipo.

Por lo general, el DNA de distintos carcinomas de colon humano contiene mutaciones en todos los tres genes: mutaciones de pérdida de función en los supresores tumorales APC y *p53* y una mutación activante (de ganancia de función) en el oncogén dominante *K-ras* (uno de la familia de los genes *ras*), lo cual establece que las mutaciones múltiples en la misma célula son necesarias para la formación de cáncer. Pareciera que algunas de estas mutaciones confieren ventajas de crecimiento en un estadio temprano del desarrollo tumoral, mientras que otras promueven los estadios posteriores, incluyendo la invasión y la metástasis, procesos requeridos para el fenotipo maligno. El número de mutaciones necesarias para la progresión del cáncer de colon podría parecer sorprendente al principio, aparentemente una barrera efectiva a la tumorigénesis. Sin embargo, nuestros genomas están bajo un constante ataque. Estimaciones recientes indican que los pólipos que emergen esporádicamente tienen cerca de 11 000 alteraciones genéticas en cada célula, aunque es muy probable que solo unas pocas de estas sean relevantes para

la oncogénesis. La inestabilidad genética es una marca distintiva de las células cancerosas. Esta inestabilidad genómica promueve la evolución tumoral posterior, lo que permite la creación acelerada de células tumorales con una mayor autosuficiencia y/o la habilidad de hacer metástasis, un excelente ejemplo del modelo.

El carcinoma de colon proporciona, en general, el grado al cual este modelo de impacto múltiple del cáncer. En general, el grado al cual este modelo de impacto múltiple del cáncer está siendo ahora aprendido, pero se aplica al cáncer recientemente está involucran mutaciones múltiples, sugiere claro que muchos tipos de cáncer involucran mutaciones múltiples.

Las células de cáncer difieren de las células normales en formas fundamentales

Las células de cáncer a menudo pueden distinguirse de las células normales mediante la examinación microscópica. Usualmente, están menos diferenciadas que las células normales o las células de tumores benignos. En un tejido específico, las células malignas por lo general exhiben las características de células que crecen rápidamente, esto es, una alta relación núcleo-citoplasma, nucléolos prominentes, una frecuencia incrementada de células mitóticas y relativamente pocas estructuras especializadas. Las células normales paran de crecer cuando se contactan con otras células y finalmente forman una monocapa de células bien ordenadas (véase Fig. 24-4a). Las células transformadas son menos adherentes y forman un grupo tridimensional de células (un foco) que puede ser reconocido con el microscopio (véase Fig. 24-4b).

Las células tumorales no solo difieren de las normales en su apariencia, sino que su metabolismo energético entero está modificado. Normalmente, las células diferenciadas dependen de la fosforilación oxidativa mitocondrial para satisfacer sus necesidades energéticas. Las células metabolizan la glucosa a dióxido de carbono mediante la oxidación del piruvato a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) en la mitocondria (véase Cap. 12). Solo en condiciones anaeróbicas las células experimentan glucólisis anaeróbica y producen grandes cantidades de lactato. En contraste con las células normales, la mayoría de las células cancerosas dependen de la glucólisis para la producción de energía, independientemente de si los niveles de oxígeno están altos o bajos, y producen grandes cantidades de lactato (Fig. 24-9). La utilización de la glucólisis para producir energía incluso en presencia de oxígeno, llamada glucólisis aeróbica, fue descubierta primero en células cancerosas por el biólogo celular Otto Warburg y, por lo tanto, se llama **efecto Warburg**.

El metabolismo de glucosa a lactato genera solo 2 moléculas de ATP por molécula de glucosa, mientras que la fosforilación oxidativa genera hasta 36 moléculas de ATP por molécula de glucosa. No está claro por qué las células cancerosas utilizan esta forma ineficiente para generar energía, pero alguna de las diferencias moleculares entre las células diferenciadas normales y las cancerosas podrían proporcionar la respuesta. Mientras que las células diferenciadas expresan la isoforma M1 de la piruvato cinasa (PK-M1), todas las células cancerosas cambian hacia la expresión de la isoforma M2, la cual normalmente es expresada solo durante el desarrollo embrionario. PK-M2 se activa por señalización tirosinasa y resulta en la conversión de piruvato a lactato en lugar de entrar en el ciclo TCA.

Quizá la característica más sorprendente de las células tumorales es que su composición genética entera difiere dramáticamente de aquella de las células normales. La **aneuploidía** es característica de casi todas las células tumorales, la presencia de un número aberrante de cromosomas (por lo general, demasiados).

Varios mecanismos que llevan a aneuploidía han sido identificados. Como se analizó en el Capítulo 19, el punto de control de la

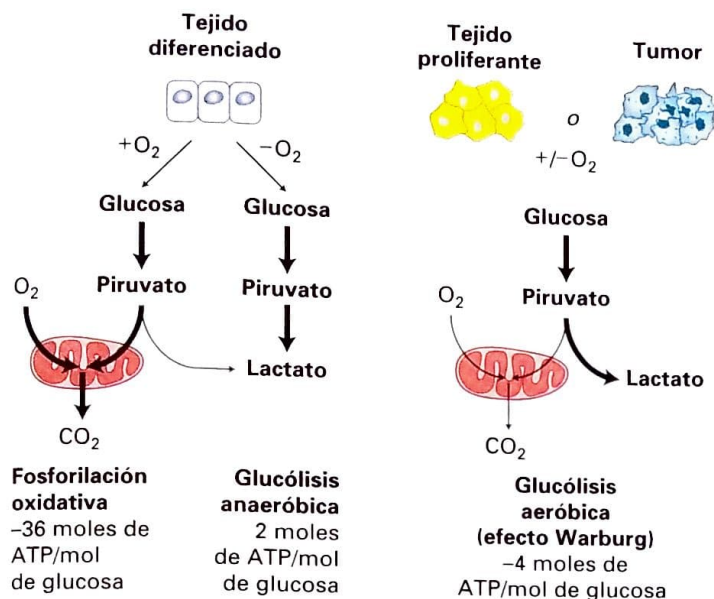


FIGURA 24-9 Producción de energía en células cancerosas por glucólisis aeróbica. En presencia de oxígeno, las células no proliferantes (diferenciadas) metabolizan la glucosa en piruvato por medio de la glucólisis. El piruvato es luego transportado a la mitocondria, donde es introducido en el ciclo TCA. El oxígeno es requerido como el aceptor final de electrones durante la fosforilación oxidativa. De este modo, cuando el oxígeno es limitante, las células metabolizan piruvato en lactato, lo que permite que la glucólisis continúe reciclando NADH de vuelta a NAD⁺. Las células cancerosas y las células proliferantes convierten la mayor parte de la glucosa en lactato independientemente de si el oxígeno está presente o no. La producción de lactato en presencia de oxígeno se llama glucólisis aeróbica. (Adaptado de Vander Heiden y cols., 2009, *Science* 324:1029.)

replicación del DNA por lo general impide la entrada en la mitosis a menos que todos los cromosomas hayan replicado completamente su DNA. El punto de control del ensamblado del huso impide la entrada en la anafase a menos que todos los cromosomas replicados se anclen de manera apropiada al aparato del huso, y el punto de control de la posición del huso impide la salida de la mitosis y la citocinesis si los cromosomas segregan inapropiadamente. Una falla en los puntos de control de daño en el DNA y de ensamblado del huso causa anomalías cromosómicas y segregación alterada, respectivamente, lo que lleva a aneuploidía. Los defectos en el punto de control de la posición del huso causan la formación de células tetraploides, las cuales luego, por medio de pérdidas de cromosomas, pueden también volverse aneuploides. El papel exacto de la aneuploidía en la tumorigénesis se está debatiendo, pero es claro que la aneuploidía causa cáncer. Las mutaciones que inducen inestabilidad genómica llevan a cáncer en ratones. Los síndromes humanos, como la aneuploidía variegada en mosaico, que causan segregación alterada de cromosomas incrementada también predisponen a los pacientes a ciertos cánceres, incluyendo el tumor de Wilm y el rhabdomyosarcoma.

El análisis de una micromatriz de DNA de los patrones de expresión puede revelar diferencias sutiles entre células tumorales

Tradicionalmente, las propiedades de las células tumorales y normales han sido estudiadas por tinción y microscopía. El pronóstico para muchos tumores podría ser determinado, dentro de ciertos límites, a partir de su histología. Sin embargo, la sola apariencia de las células tiene contenido informativo limitado, y son deseables mejores maneras de discernir las propiedades de las células tanto para entender la tumorigénesis como para llegar a decisiones precisas y con un significado sobre el pronóstico y el tratamiento.

Como hemos visto, los estudios genéticos pueden identificar la única mutación iniciadora o series de mutaciones que causan la transformación de células normales en tumorales, como en el caso del cáncer de colon. Sin embargo, después de estos eventos iniciales las células

de un tumor sufren una cascada de cambios que reflejan la interrelación entre los sucesos iniciadores y las señales del exterior. Como resultado, las células tumorales pueden volverse bastante diferentes, incluso si surgen a partir de la misma mutación o de mutaciones iniciadoras. Aunque estas diferencias podrían no ser reconocidas a partir de la apariencia de las células, pueden ser detectadas a partir de los patrones de expresión génica de las células. Un análisis de una **micromatriz de DNA** puede determinar la expresión de decenas de miles de genes simultáneamente, lo que permite que fenotipos complejos sean definidos a nivel genético molecular (véanse Figs. 5-29 y 5-30 para una explicación de esta técnica).

La llegada de la micromatriz de DNA y la tecnología de secuenciación a gran escala están permitiendo un examen más detallado de las propiedades tumorales. No es sorprendente que los tumores primarios puedan a menudo ser distinguibles de los tumores metastásicos por el patrón de expresión génica. El análisis por micromatriz ahora también es utilizado en forma rutinaria para determinar la evolución de un paciente y el mejor curso de tratamiento para muchos tipos de cánceres.



Los pacientes afectados por cáncer de mama tienen respuestas marcadamente distintas al tratamiento y resultados muy variables. La quimioterapia y las terapias hormonales reducen el riesgo de metástasis en aproximadamente un 30%, pero el 70-80% de estos pacientes habría sobrevivido sin el tratamiento. De este modo, la determinación de qué paciente debería recibir quimioterapia para prevenir la metástasis es una cuestión fundamental. Los análisis por micromatrices han proporcionado un medio para tomar esta decisión. Los investigadores analizaron el perfil de expresión génica de cánceres de mama que aún no se habían diseminado a ganglios linfáticos vecinos (cánceres de mama no metastásicos). Identificaron 70 genes cuya expresión predice la probabilidad de metástasis con más del 90% de precisión (Fig. 24-10). Esta firma de expresión génica “clasificadora” de mal pronóstico contenía genes involucrados en la progresión del ciclo celular, la invasión y la angiogénesis, lo que proveyó una base biológica de por qué la metástasis era más probable en este grupo de pacientes que en el grupo que carecía de esta firma de expresión génica. Basándose en estos clasificadores de expresión génica, ahora podría ser más sencillo determinar qué pacientes se beneficiarán de las quimioterapias intensivas y cuáles no necesitarán este tratamiento agresivo. Análisis similares de los patrones de expresión génica de otros tumores probablemente mejoren la clasificación y el diagnóstico, lo que permitirá decisiones informadas sobre los tratamientos y también proporcionará conocimientos sobre las propiedades de las células tumorales. ■

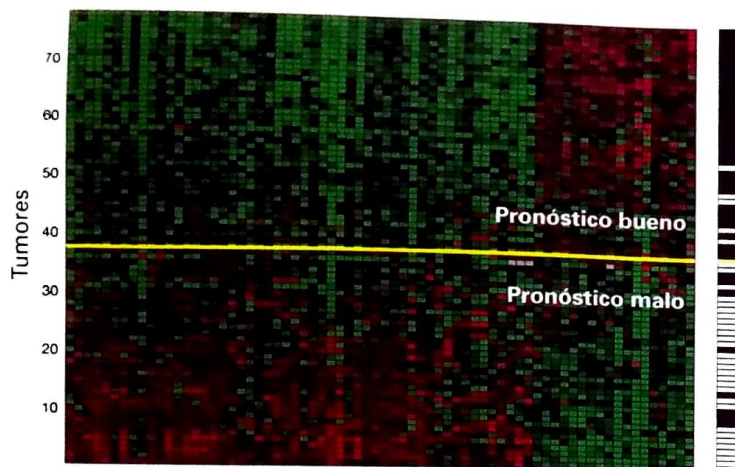


FIGURA EXPERIMENTAL 24-10 Las diferencias en los patrones de expresión génica determinadas por análisis de micromatrices de DNA pueden predecir el comportamiento metastásico de los cánceres de mama. Muestras de mRNA fueron extraídas de 78 pacientes con cáncer de mama (de 55 años de edad y más jóvenes) que portaban tumores de mama esporádicos que aún no se habían extendido a los ganglios linfáticos vecinos. El análisis de micromatrices de DNA del RNA extraído determinó los niveles de transcripción de cerca de 25 000 genes en cada una de las 78 muestras experimentales (véanse Figs. 5-29 y 5-30 para una descripción del análisis de micromatrices). Luego se determinó una firma de expresión génica de 70 genes como pronóstico. Primero se identificaron todos los genes que eran sobreexpresados en más de 1 de los 78 tumores. El coeficiente de correlación de la expresión para cada gen con la evolución de la enfermedad (los pacientes que estaban libres de metástasis después de 5 años versus los pacientes que desarrollaron metástasis distantes en un plazo de 5 años) fue luego calculado, y se halló que 231 genes estaban significativamente asociados con la evolución de la enfermedad. Después, los genes fueron seleccionados y se eliminaron aquellos con poder de predicción más bajo hasta que se determinó un conjunto de genes cuyos patrones de expresión clasificaban pacientes con mal pronóstico con más de un 90% de precisión. Se muestra la firma de expresión génica clasificadora de estos 70 genes. En el diagrama de agrupación, cada fila representa un tumor, y cada columna vertical contiene datos para un solo gen del conjunto de 70 genes. Un color rojo intenso indica un alto nivel de transcripción de ese gen; verde intenso indica lo opuesto. Los genes fueron agrupados según sus patrones similares de hibridación. Los pacientes por encima de la línea amarilla tienen una buena firma de pronóstico; por debajo de la línea amarilla la firma de pronóstico es mala. El estado de metástasis de cada paciente se muestra a la derecha. El blanco indica que los pacientes desarrollaron metástasis distantes en un plazo de 5 años después del diagnóstico inicial; el negro indica que los pacientes estuvieron libres de la enfermedad por al menos 5 años. (De L. J. van't Veer, 2002, *Nature* **415**:530.)

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 24.1

Células tumorales y aparición del cáncer

- El cáncer es una aberración fundamental en el comportamiento celular, e involucra muchos aspectos de la biología celular molecular. La mayoría de los tipos celulares del cuerpo pueden dar origen a células tumorales malignas (cáncer).
- Las células cancerosas pueden multiplicarse en ausencia de al menos algunos factores promotores del crecimiento requeridos para la proliferación de las células normales y son resistentes a las señales que por lo general programan la muerte celular (apoptosis).

- La mayoría de las mutaciones oncogénicas ocurren en células somáticas y no son portadas en el DNA de la línea germinal.
- Las células cancerosas algunas veces invaden los tejidos circundantes, a menudo irrumpiendo a través de las láminas basales que definen los límites de los tejidos y diseminándose por todo el cuerpo para establecer áreas secundarias de crecimiento, un proceso llamado *metástasis*. Las células tumorales metastásicas adquieren propiedades migratorias en un proceso llamado transición epitelio a mesénquima.
- Las células cancerosas pueden surgir a partir de células madre y a menudo se originan a partir de células proliferantes. Las células cancerosas se asemejan más a células precursoras en división que a tipos celulares diferenciados más maduros.
- Tanto los tumores primarios como los secundarios requieren de la angiogénesis, la formación de nuevos vasos sanguíneos, para poder crecer hasta convertirse en una gran masa.
- El modelo de impacto múltiple, el cual propone que se necesitan mutaciones múltiples para causar cáncer, es consistente con la homogeneidad genética de las células de un tumor dado, el aumento observado en la incidencia de los cánceres humanos con la edad avanzada y el efecto cooperativo de los transgenes oncogénicos y mutaciones en los genes supresores de tumores en la formación de tumores en ratones.
- El cáncer de colon se desarrolla a través de estadios morfológicos definidos que comúnmente están asociados con mutaciones en genes supresores de tumores específicos y en protooncogenes.
- Las células cancerosas difieren de las células normales en formas fundamentales. Es particularmente sorprendente cómo se modifica el metabolismo energético hacia la glucólisis, un proceso conocido como efecto Warburg.
- La mayoría de las células tumorales humanas son aneuploides, y contienen una cantidad anormal de cromosomas (usualmente, demasiados). La falla de los puntos de control del ciclo celular que por lo general detectan DNA no replicado, ensamblado incorrecto del huso o segregación alterada de cromosomas permite que las células aneuploides se originen.
- Los análisis por micromatriz de DNA pueden identificar diferencias en la expresión génica entre tipos de células tumorales que son indistinguibles mediante los criterios tradicionales y puede ser utilizado para predecir la evolución de un paciente.

24.2 La base genética del cáncer

Como hemos visto, las mutaciones en tres amplias clases de genes (protooncogenes [*ras*], genes supresores de tumores [*APC*] y genes cuidadores) juegan papeles clave en la inducción del cáncer. Estos genes codifican muchos tipos de proteínas que ayudan a controlar el crecimiento celular y la proliferación (Fig. 24-11). Virtualmente, todos los tumores humanos tienen mutaciones inactivantes en genes cuyos productos por lo general actúan en varios **puntos de control** del ciclo celular para detener el progreso de la célula a través de dicho ciclo si un paso previo ha ocurrido incorrectamente o si el DNA ha sido dañado. Por ejemplo, la mayoría de los cánceres tienen mutaciones inactivantes en los genes que codifican una o más proteínas que normalmente restringen la progresión a tra-

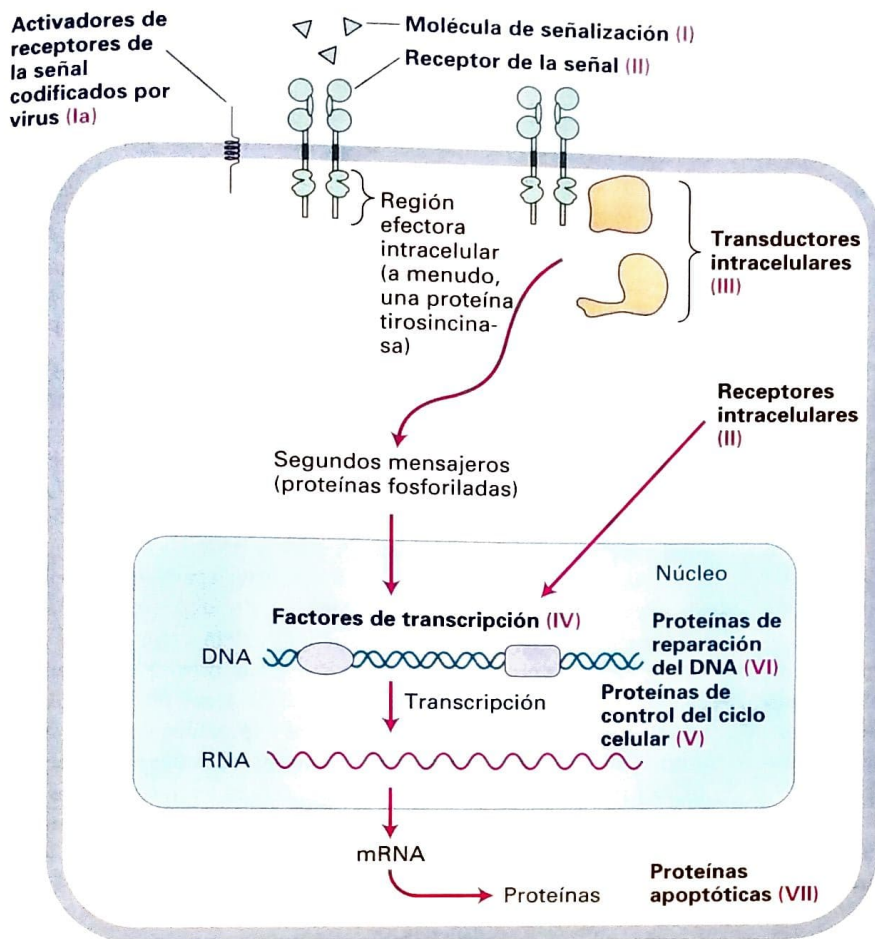


FIGURA 24-11 Siete tipos de proteínas que participan en el control del crecimiento celular y la proliferación.

El cáncer puede resultar de la expresión de formas mutantes de estas proteínas. Las mutaciones que cambian la estructura o la expresión de las proteínas que normalmente promueven el crecimiento celular por lo general dan origen a oncogenes dominantes activos. Muchas, pero no todas, las moléculas de señalización extracelulares (I), los receptores de las señales (II), las proteínas de transducción de la señal (III) y los factores de transcripción (IV) están en esta categoría. Las proteínas de control del ciclo celular (V) que funcionan para restringir la proliferación celular y las proteínas de reparación del DNA (VI) son codificadas por genes supresores de tumores. Las mutaciones en estos genes actúan recesivamente, incrementando en gran medida la probabilidad de que las células mutantes se vuelvan células tumorales o de que ocurran mutaciones en otras clases. Las proteínas apoptóticas (VII) incluyen supresores tumorales que promueven la apoptosis y oncoproteínas que promueven la supervivencia de la célula. Las proteínas codificadas por virus que activan receptores de las señales (Ia) también pueden inducir cáncer.

vés del estadio G_1 del ciclo celular o mutaciones activantes en genes que codifican proteínas que impulsan a las células a través del ciclo celular. Asimismo, una proteína Ras constitutivamente activa u otra proteína de transducción de la señal activada es encontrada en varios tipos de tumores humanos que tienen orígenes diferentes. De este modo, la malignidad y los intrincados procesos para controlar el ciclo celular analizados en el Capítulo 19 son dos caras de la misma moneda. En la serie de eventos que llevan al crecimiento de un tumor, los oncogenes se combinan con mutaciones supresoras de tumores para originar el espectro completo de propiedades de las células tumorales descritas en la sección previa.

En esta sección, consideramos los tipos generales de mutaciones que son oncogénicas y vemos cómo ciertos virus pueden causar cáncer. También explicamos por qué algunas mutaciones heredadas aumentan el riesgo de cánceres particulares.

Las mutaciones de ganancia de función convierten a los protooncogenes en oncogenes

Debe recordarse que un oncogén es cualquier gen que codifique una proteína capaz de transformar células en cultivo, por lo general en combinación con otras alteraciones celulares, o de inducir cáncer en animales. De los muchos oncogenes conocidos, todos excepto unos pocos son derivados de genes celulares normales (protooncogenes), cuyos productos silvestres promueven la proliferación celular u otras características importantes para el cáncer. Por ejemplo, el gen *ras* estudiado previamente es

un protooncogén que codifica una proteína de transducción de la señal intracelular que promueve la progresión controlada a través del ciclo celular; el gen mutante *ras^D* derivado de *ras* es un oncogén cuya proteína codificada provee una señal promotora del crecimiento excesivo o incontrolado. Otros protooncogenes codifican moléculas de señalización promotoras de la señal y sus receptores, proteínas antiapoptóticas (supervivencia celular) y algunos factores de transcripción.

En general, la conversión, o activación, de un protooncogén a un oncogén involucra una *mutación de ganancia de función*. Al menos cuatro mecanismos pueden producir oncogenes a partir de los correspondientes protooncogenes:

1. **Mutación puntual** (cambio en un solo par de bases) en un protooncogén que resulta en un producto proteico hiperactivo o constitutivamente activo.
2. **Translocación cromosómica**, que fusiona dos genes juntos para producir un gen híbrido que codifica una proteína quimérica cuya actividad, a diferencia de la de las proteínas parentales, a menudo es constitutiva.
3. **Translocación cromosómica**, que pone un gen regulador del crecimiento bajo el control de un promotor diferente que causa la expresión inapropiada del gen.
4. **Amplificación** (replicación anormal del DNA) de un segmento de DNA que incluye un protooncogén, de manera que existan numerosas copias, lo cual lleva a la sobreproducción de la proteína codificada.

Un oncogén formado por cualquiera de los primeros dos mecanismos codifica una “oncoproteína” que difiere de la proteína normal codificada por el protooncogén correspondiente. En contraste, los otros dos mecanismos generan oncogenes cuyos productos proteicos son idénticos a las proteínas normales; su efecto oncogénico se debe a la producción a niveles más altos de lo normal o en células en las que normalmente no son producidos.

La amplificación localizada del DNA para producir tantas como 100 copias de una región dada (usualmente una región que abarca cientos de kilobases) es un cambio genético común visto en tumores. En general, un evento tal sería reparado o la célula detendría el ciclo debido al punto de control, de manera que tales lesiones implican un defecto en la reparación de DNA (cuidador) de algún tipo. Esta anomalía puede tomar cualquiera de dos formas: el DNA duplicado puede estar organizado uno detrás del otro en un solo sitio en un cromosoma, o puede existir como pequeñas, estructuras independientes similares a un minicromosoma. El primer caso conduce a una región homogéneamente teñida que es visible en el microscopio óptico en el sitio de la amplificación; el último caso produce cromosomas extra “diminutos”, separados de los cromosomas normales que aparecen en un preparado cromosómico teñido (Fig. 24-12).

Como sea que surjan, las mutaciones de ganancia de función que convierte a los protooncogenes en oncogenes son genéticamente dominantes; esto es, la mutación en solo uno de los dos alelos es suficiente para la inducción del cáncer. Véase el Cuadro 24-1 para una comparación de las distintas clases de genes relacionados con el cáncer.



La amplificación de genes puede involucrar un pequeño número de genes, como el gen *N-myc* y su vecino *DDX1*, los cuales son amplificados en el neuroblastoma, o una región cromosómica que

contenga muchos genes. Puede ser difícil determinar qué genes son amplificados, un primer paso en la determinación de qué genes contribuyen a la formación de un tumor. Las micromatrices de DNA o la secuenciación profunda ofrecen una aproximación poderosa para encontrar regiones amplificadas de los cromosomas. En lugar de mirar la expresión génica, la aplicación de micromatrices o de un análisis de secuencia cuantitativo involucra buscar secuencias de DNA anormalmente abundantes. En la aproximación por micromatrices, el DNA genómico de células cancerosas es utilizado como sonda en matrices que contienen fragmentos de DNA genómico, y los sitios con DNA amplificado dan señales más fuertes que los sitios control. En la aproximación por secuenciación profunda, el genoma se rompe en fragmentos pequeños y se secuencia. La frecuencia con la cual una región particular del genoma es secuenciada provee una estimación cuantitativa del número de copias en un locus particular. Entre los genes amplificados, los candidatos más fuertes a ser los relevantes pueden ser identificados midiendo también la expresión génica. Una línea celular de carcinoma de mama, con cuatro regiones cromosómicas amplificadas conocidas, se estudió para detectar genes amplificados, y los niveles de expresión de esos genes también fueron estudiados en micromatrices. Se encontró que 50 genes estaban amplificados, pero solo 5 estaban también altamente expresados. Estos 5 eran mejores candidatos a ser nuevos oncogenes, ya que es menos probable que los genes amplificados que no son altamente expresados contribuyan al crecimiento tumoral. A medida que las aproximaciones por micromatrices y por secuenciación del genoma entero se vuelven más baratas, es posible que los tumores de pacientes individuales sean rutinariamente analizados de esta manera para determinar qué mutaciones oncogénicas subyacen al tumor. El tratamiento podría entonces estar adaptado específicamente al tumor del paciente. ■

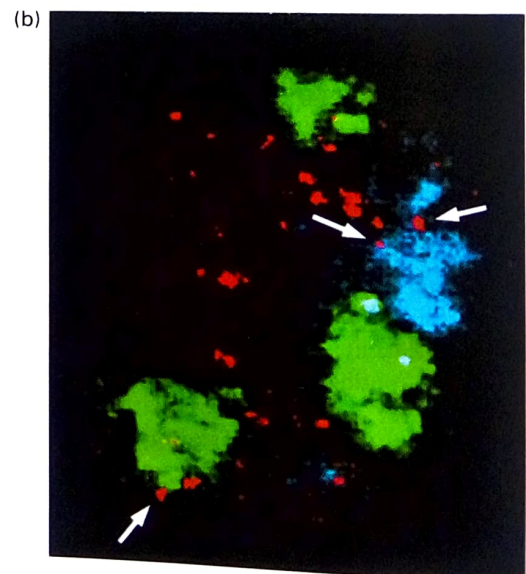
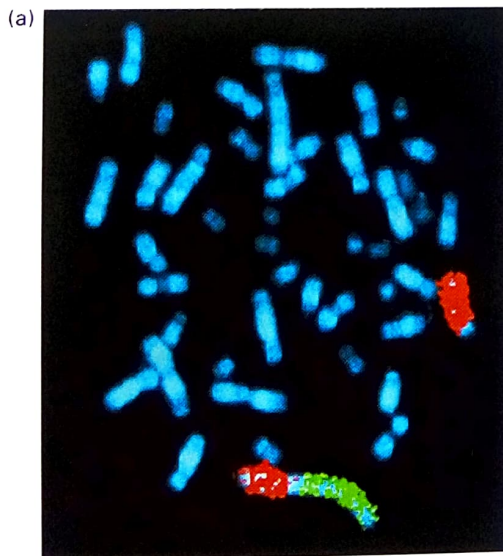


FIGURA EXPERIMENTAL 24-12 Las amplificaciones de DNA en cromosomas teñidos toman dos formas, visibles con el microscopio óptico. (a) Regiones homogéneamente teñidas en un cromosoma humano de una célula de neuroblastoma. Los cromosomas están uniformemente teñidos con un colorante azul de manera que todos puedan ser vistos. Secuencias específicas de DNA fueron detectadas usando hibridación in situ con fluorescencia (FISH) en la cual clones de DNA marcados con fluorescencia son hibridados a DNA desnaturizado en los cromosomas. El par de cromosomas 4 se marca (rojo) por hibridación in situ a un gran clon de DNA que contiene

el oncogén *N-myc*. En 1 de los cromosomas 4, una región homogéneamente teñida (verde) es visible después de la tinción de una secuencia enriquecida en la región homogéneamente teñida. (b) Secciones ópticas a través de los núcleos de una célula de neuroblastoma humano que contiene los así llamados cromosomas dobles diminutos. Los cromosomas normales son pequeños puntos rojos. Las flechas indican dobles diminutos asociados con la superficie o el interior de los cromosomas normales. (De I. Solovei y cols., 2000, *Genes Chromosomes Cancer* 29:297-308, Figs. 4 y 17.)

Cuadro 24-1

Clases de genes implicados en la aparición del cáncer

	Función normal de los genes	Ejemplos de productos génicos	Efecto de la mutación	Propiedades genéticas del gen mutante	Origen de las mutaciones
Protooncogenes	Promueven la supervivencia de las células o la proliferación	Proteínas antiapoptóticas, componentes de vías de señalización y de transducción de señales que resultan en la proliferación, factores de transcripción	Mutaciones de ganancia de función permiten la proliferación y supervivencia celular no reguladas	Las mutaciones son genéticamente dominantes	Surgen por mutación puntual, translocación cromosómica, amplificación
Genes supresores de tumores	Inhiben la supervivencia de la célula o la proliferación	Proteínas que promueven la apoptosis, inhibidores de la progresión del ciclo celular, proteínas de control de los puntos de control que evalúan daño en el DNA/cromosómico, componentes de vías de señalización que limitan la proliferación celular	Mutaciones de pérdida de función permiten la proliferación y supervivencia celular no reguladas	Las mutaciones son genéticamente recesivas	Surgen por delección, mutación puntual, metilación
Genes cuidadores	Reparan o previenen el daño en el DNA	Enzimas de reparación del DNA	Mutaciones de pérdida de función permiten que las mutaciones se acumulen	Las mutaciones son genéticamente recesivas	Surgen por delección, mutación puntual, metilación

Los virus que causan cáncer contienen oncogenes o activan protooncogenes celulares

Los estudios pioneros por Peyton Rous que comenzaron en 1911 condujeron al reconocimiento inicial de que un virus podría causar cáncer cuando es inyectado en un huésped animal adecuado. Muchos años después, los biólogos moleculares mostraron que el virus del sarcoma de Rous es un retrovirus cuyo genoma de RNA es transcrito de forma inversa a DNA, el cual es incorporado en el genoma de la célula huésped (véase Fig. 4-49). Además de los genes “normales” presentes en todos los retrovirus, los virus transformadores oncogénicos como RSV contienen un oncogén: en el caso de RSV, el gen *v-src*. Los estudios subsiguientes con formas mutantes de RSV demostraron que solo el gen *v-src*, no los otros genes virales, era requerido para la inducción del cáncer.

A finales de la década de 1970, los científicos se sorprendieron al encontrar que las células normales de pollos y otras especies contienen un gen que está cercanamente relacionado con el gen *v-src* de RSV. Este gen celular normal, un protooncogén, en general se distingue del gen viral por el prefijo “c” (*c-src*). Se cree que RSV y otros virus agudamente transformadores han surgido incorporando, o transduciendo, un protooncogén celular normal en su genoma. La mutación subsiguiente en el gen transducido luego lo convirtió en un oncogén que actúa predominantemente, el cual puede inducir la transformación de la célula incluso en presencia del protooncogén *c-src* normal. Tales virus son llamados *retrovirus de transducción* porque sus genomas contienen un oncogén transducido derivado de un protooncogén celular. Cuando esto se descubrió, fue alarmante encontrar que estos peligrosos virus estaban volviendo los propios genes del animal en su contra.

Debido a que su genoma porta el potente oncogén *v-src*, el RSV de transducción induce tumores en cuestión de días. En contraste, la mayoría de los retrovirus oncogénicos inducen cáncer sólo después de un período de meses o años. Los genomas de estos *retrovirus de acción lenta*, los cuales son débilmente transformadores, difieren de aquellos de los virus de transducción en un aspecto crucial: carecen de un oncogén. Todos los retrovirus de acción lenta, o de “latencia prolongada”, parecen causar cáncer al integrarse en el DNA de la célula huésped cerca de un protooncogén celular y activando su expresión. Las secuencias de repeticiones terminales largas (LTR, *long terminal repeat*) en el DNA retroviral integrado pueden actuar como un amplificador o promotor para un gen celular cercano, y estimular de este modo su transcripción. Por ejemplo, en las células de tumores causados por el virus de la leucemia aviar (ALV), el DNA retroviral es insertado cerca del gen *c-myc*. Estas células sobreproducen la proteína c-Myc; como se ha visto antes, la sobreproducción de c-Myc causa una proliferación anormalmente rápida de las células. Los virus de acción lenta actúan con lentitud por dos razones: la integración cerca de un protooncogén (*c-myc*) es un evento aleatorio, raro, y las mutaciones adicionales tienen que ocurrir antes de que un tumor maduro se vuelva evidente.

En las poblaciones naturales de aves y ratones, los retrovirus de acción lenta son mucho más comunes que aquellos que contienen oncogenes, como el virus del sarcoma de Rous. Así, la activación por inserción de un protooncogén es probablemente el mayor mecanismo por el cual los retrovirus causan cáncer. Aunque el único retrovirus conocido que causa tumores humanos es el virus de la leucemia/linfoma de las células T (HTLV, *human T-cells leukemia/lymphoma virus*), la enorme inversión en el estudio de los retrovirus como un modelo para el cáncer humano ha dado fruto tanto en el descubrimiento de oncogenes

celulares como en el entendimiento sofisticado de los retrovirus, el cual más tarde aceleró el progreso en el virus del HIV que causa sida.

Unos pocos virus de DNA también son oncogénicos. A diferencia de la mayoría de los virus de DNA que infectan las células animales (véase Cap. 4), los virus de DNA oncogénicos integran su DNA viral en el genoma de la célula huésped. El DNA viral contiene uno o más oncogenes, los cuales permanentemente transforman las células infectadas. Por ejemplo, muchas verrugas y otros tumores benignos de células epiteliales son causados por los virus del papiloma humano que contienen DNA (HPV). Un resultado médicamente mucho más serio de la infección por HPV es el cáncer de cuello de útero, el tercer tipo de cáncer más común en mujeres después del cáncer de pulmón y el de mama. Se cree que la prueba de Papanicolaou, utilizada para muestrear el tejido del cuello uterino y detectar posibles cánceres, ha reducido la tasa de mortalidad en un 70%. Sin embargo, miles de mujeres aún mueren de cáncer de cuello de útero cada año, y algunas de estas muertes podrían haberse evitado si se hubiese hecho el estudio de detección. Afortunadamente, no todas las infecciones por HPV conducen a cáncer. Aprenderemos más sobre las oncoproteínas del HPV más adelante en este capítulo.

A diferencia de los oncogenes retrovirales, los cuales son derivados de los genes celulares normales y no tienen una función para el virus excepto permitir su proliferación en tumores, los oncogenes conocidos de los virus de DNA son partes integrales del genoma viral y se requieren para la replicación viral. Como se analiza más adelante, las oncoproteínas expresadas a partir de DNA viral integrado en células infectadas actúan de varias maneras para estimular el crecimiento celular y la proliferación.

Las mutaciones de pérdida de función en los genes supresores de tumores son oncogénicas

Los genes supresores de tumores generalmente codifican proteínas que de una forma u otra inhiben la proliferación celular. Las mutaciones de *pérdida de función* en uno o más de estos “frenos” contribuyen al desarrollo de muchos cánceres. Cinco proteínas prominentes entre las clases de proteínas codificadas por genes supresores de tumores son las siguientes:

1. Proteínas intracelulares que regulan, o inhiben, la entrada en el ciclo celular (p. ej., p16 y Rb para G_1).
2. Receptores o transductores de señales para hormonas secretadas o señales del desarrollo que inhiben la proliferación celular (p. ej., TGF β y el receptor de hedgehog Patched).
3. Proteínas de control de los puntos de control que detienen el ciclo celular si el DNA es dañado o si el aparato de segregación cromosómica es anormal (p. ej., p53).
4. Proteínas que promueven la apoptosis.
5. Enzimas que participan en la reparación del DNA.

Dado que por lo general una copia de un gen supresor de tumores basta para controlar la proliferación celular, *ambos* alelos de un gen supresor de tumores deben ser perdidos o inactivados para promover el desarrollo tumoral. De este modo, las mutaciones de pérdida de función oncogénicas en genes supresores de tumores son a menudo genéticamente recesivas (véase Cuadro 24-1). En este contexto, “recesivo” significa que si existe al menos un gen funcional que produce aproximadamente la mitad de la cantidad usual de producto proteico, la formación del

tumor será impedida. Con algunos genes, la mitad de la cantidad del producto no es suficiente, en cuyo caso la pérdida de solo uno de los genes puede conducir a cáncer. Este tipo de gen es *haplosuficiente*. La pérdida de una copia del gen es decisiva para el fenotipo final, por lo que este tipo de mutación es dominante. Entonces, es útil recordar dos procesos por los cuales los genes del cáncer pueden ser dominantes: (1) pérdida de una copia de un gen supresor de tumores haploinsuficiente, lo que resulta en un producto insuficiente para controlar el crecimiento, y (2) activación de un gen o proteína que causa el crecimiento incluso en presencia de un alelo normal, es decir, un oncogén dominante (como fue descrito en la sección previa). En muchos cánceres, los genes supresores de tumores tienen deleciones o mutaciones puntuales que impiden la producción de cualquier proteína o conducen a la producción de una proteína no funcional. Otro mecanismo de inactivación de genes supresores de tumores es la metilación de los residuos de citosina en el promotor o en otros elementos de control, lo cual inhibe su transcripción. Tal metilación es comúnmente encontrada en regiones no transcritas del DNA (véase Cap. 7).

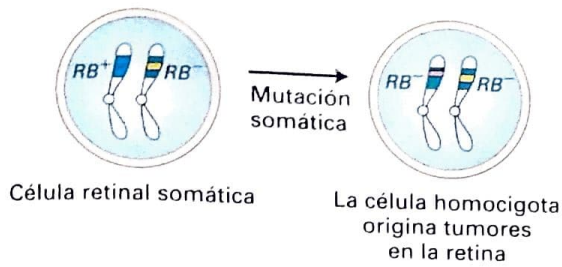
Las mutaciones heredadas en los genes supresores de tumores aumentan el riesgo de cáncer

Los individuos con mutaciones heredadas en genes supresores de tumores tienen una predisposición hereditaria para ciertos cánceres. Por lo general, dichos individuos heredan una mutación de la línea germinal en un alelo del gen; una mutación somática del segundo alelo facilita la progresión del tumor. Un caso clásico es el retinoblastoma, el cual es causado por la pérdida de la función de *RB*, el primer gen supresor de tumores en ser identificado. Como analizaremos más adelante, la proteína codificada por *RB* regula la entrada en el ciclo celular.

Retinoblastoma hereditario versus esporádico Los niños con retinoblastoma hereditario heredan una sola copia defectuosa del gen *RB*, algunas veces vista como una pequeña deleción en una de las dos copias del cromosoma 13. Los niños desarrollan varios tumores retinianos a temprana edad y generalmente en ambos ojos. La deleción o la mutación del gen *RB* normal en el otro cromosoma es un paso esencial en la formación del tumor, lo que da origen a una célula que no produce una proteína Rb funcional (Fig. 24-13a). En contraste, los individuos con retinoblastoma esporádico heredan dos alelos de *RB* normales, cada uno de los cuales ha sufrido una mutación somática de pérdida de función en una única célula retinal (Fig. 24-13b). Debido a que perder dos copias del gen *RB* es mucho menos probable que perder una, el retinoblastoma esporádico es raro y usualmente afecta un solo ojo.

Si los tumores retinianos son extirpados antes de que se vuelvan malignos, los niños con retinoblastoma hereditario con frecuencia sobreviven hasta la edad adulta y pueden tener hijos, pero tienen un riesgo aumentado de desarrollar otros tipos de tumores más tarde en la vida. Debido a que sus células germinales contienen un alelo *RB* normal y uno mutante, estos individuos pasarán, en promedio, el alelo mutante a la mitad de sus hijos y el alelo normal a la otra mitad. Los niños que hereden el alelo normal serán normales si su otro padre tiene dos alelos *RB* normales. Sin embargo, aquellos que hereden el alelo mutante tendrán la misma predisposición aumentada de desarrollar tumores retinianos que su padre afectado, incluso aunque hereden un alelo *RB* normal de su otro padre, normal. De este modo, la *tendencia* a desarrollar retinoblastoma es heredada como un rasgo dominante: una copia mutante es suficiente para predisponer a una persona a desarrollar el cáncer.

(a) Retinoblastoma hereditario



(b) Retinoblastoma esporádico

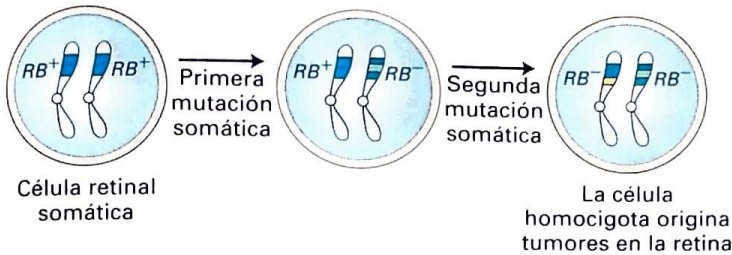


FIGURA 24-13 Papel de una mutación somática espontánea en el retinoblastoma. Esta enfermedad está marcada por tumores retinales que surgen a partir de células que portan dos alelos *RB* mutantes. (a) En el retinoblastoma hereditario (familiar), un niño hereda un alelo *RB*⁺ normal de un padre y un alelo *RB*⁻ mutante del otro padre. Una sola mutación en una célula retinal somática heterocigota que inactiva el alelo normal producirá una célula que carece de la función del gen *Rb* debido a dos mutaciones. (b) En el retinoblastoma esporádico, un niño hereda dos alelos *RB*⁺ normales. Se requiere de dos mutaciones somáticas separadas en una célula retinal particular o en su progenie para producir una célula homocigota *RB*⁻/*RB*⁻.

Como veremos en breve, muchos tumores humanos (no solo los tumores retinianos) contienen alelos *RB* mutantes o mutaciones que afectan otros componentes de la misma vía; la mayoría de estos surgen como resultado de mutaciones somáticas. Aunque los casos de retinoblastoma hereditario suman unos 100 por año en los Estados Unidos, cerca de 100 000 otros casos de cáncer cada año involucran mutaciones de *RB* adquiridas después de la concepción.

Formas heredadas de cáncer de colon y cáncer de mama Una predisposición hereditaria similar para otros cánceres ha sido asociada con las mutaciones heredadas en otros genes supresores de tumores. Por ejemplo, los individuos que heredan una mutación en la línea germinal en un alelo *APC* desarrollan miles de pólipos intestinales precancerosos (véase Fig. 24-8). Puesto que existe una alta probabilidad de que uno o más de estos pólipos progresen hacia la malignidad, dichos individuos tienen un riesgo muy incrementado de desarrollar cáncer de colon antes de los 50 años. El estudio de detección de pólipos por colonoscopia es una buena idea para personas de 50 años o mayores, incluso cuando se sabe que no existe una mutación en *APC* presente. De igual modo, las mujeres que heredan un alelo mutante de *BRCA-1*, otro gen supresor de tumores, tienen un 60% de probabilidades de desarrollar cáncer de mama hacia los 50 años, mientras que aquellas que heredan dos alelos *BRCA-1* normales tienen un 2% de probabilidades de que esto ocurra. Las mutaciones heterocigóticas en *BRCA-1* también aumentan el riesgo de por vida de cáncer de ovario del 2 al 15-40%. La proteína *BRCA-1* está involucrada en la reparación del daño del DNA inducido

por radiación. En mujeres con cáncer de mama hereditario, la pérdida del segundo alelo *BRCA-1*, junto con otras mutaciones, se requiere para que una célula del conducto mamario normal se vuelva maligna. Sin embargo, por lo general *BRCA-1* no está mutado en el cáncer de mama esporádico, no heredado.

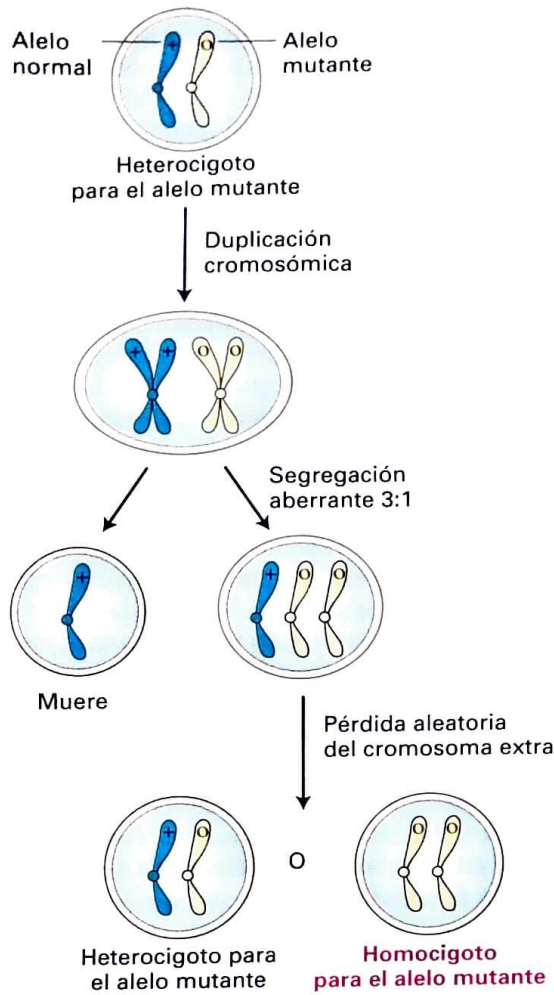
Pérdida de la heterocigosidad Claramente, entonces, podemos heredar una propensión al cáncer al recibir un alelo dañado de un gen supresor de tumores de uno de nuestros padres; es decir, somos heterocigotos para la mutación. En general, este hecho en sí mismo no causará cáncer; puesto que el alelo normal restante impide el crecimiento aberrante, el cáncer es recesivo. Como hemos visto, la pérdida subsiguiente o inactivación del alelo normal en una célula somática, referida como *pérdida de la heterocigosidad*, es usualmente la manera en que un cáncer se desarrolla. Un mecanismo para la pérdida de la heterocigosidad involucra la segregación alterada de los cromosomas que portan el gen supresor de tumores afectado durante la mitosis (Fig. 24-14a). Este proceso, también referido como *no disyunción*, es provocado por una falla en el punto de control del ensamblado del huso, el cual normalmente impide que una célula en metafase con un huso mitótico anormal complete la mitosis (véase Fig. 19-35). Otro mecanismo común para la pérdida de la heterocigosidad es la recombinación mitótica entre una cromátida que porta un alelo silvestre y una cromátida homóloga que porta un alelo mutante. Como se ilustra en la Figura 24-14b, la segregación cromosómica subsiguiente puede generar una célula hija que es homocigota para el alelo supresor de tumores mutante. Un tercer mecanismo es la delección o mutación de la copia normal del gen supresor de tumores; tal delección puede abarcar una gran región cromosómica y no necesita ser una delección precisa de solo el gen supresor de tumores.

Las estimaciones varían, pero se cree que los cánceres hereditarios, es decir, aquellos que surgen debido en parte a una versión heredada de un gen, constituyen cerca del 10% de los cánceres humanos. Es probable que nuevos estudios sobre la contribución de los genes humanos aumenten este porcentaje. Sin embargo, es importante recordar que la mutación en la línea germinal heredada no es suficiente para provocar el desarrollo de un tumor. En todos los casos, no solo debe perderse o inactivarse el alelo supresor de tumores normal heredado, sino que las mutaciones que afectan otros genes también son necesarias para que el cáncer se desarrolle. Así, una persona con una mutación recesiva en un gen supresor de tumores puede ser excepcionalmente susceptible a mutágenos ambientales como la radiación.

Los cambios epigenéticos pueden contribuir a la tumorigénesis

Hemos visto cómo las mutaciones pueden debilitar el control del crecimiento mediante la inactivación de genes supresores de tumores. Sin embargo, estos tipos de genes también pueden ser silenciados por estructuras de cromatina represivas. En años recientes, la importancia de los *complejos de remodelación de la cromatina*, como el complejo SWI/SNF, en el control transcripcional se ha vuelto cada vez más claro. Estos grandes y diversos complejos multiproteicos tienen en su centro una helicasa dependiente de ATP y a menudo controlan la modificación de histonas y la remodelación de la cromatina (véase Cap. 7). Por ejemplo, los complejos SWI/SNF producen cambios en las posiciones o las estructuras de los nucleosomas al volver a los genes accesibles o inaccesibles a las proteínas de unión al DNA que controlan la transcripción. Si un

(a) Segregación alterada



(b) Recombinación mitótica

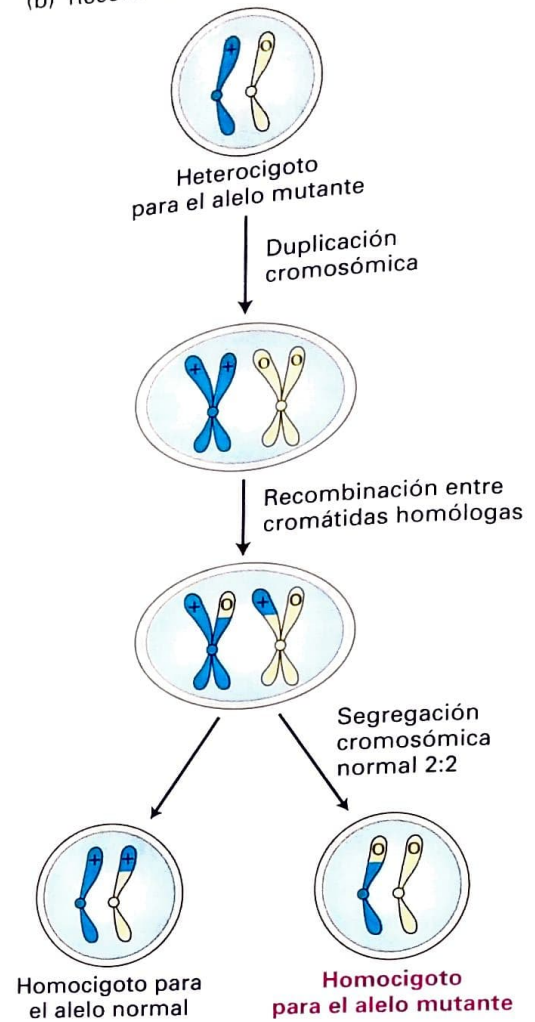


FIGURA 24-14 Dos mecanismos para la pérdida de la heterocigosidad de los genes supresores de tumores.

Una célula con un alelo normal y uno mutante de un gen supresor de tumores por lo general es fenotípicamente normal. (a) Si la formación del huso mitótico es defectuosa, entonces los cromosomas duplicados que portan los alelos normal y mutante podrían segregarse en una proporción aberrante de 3:1. Una célula hija que recibe tres cromosomas de un tipo puede perder uno y restaurar el número $2n$ de cromosomas normal. A veces, la célula resultante contendrá un alelo normal

y un alelo mutante, pero a veces será homocigota para el alelo mutante. Nótese que tal aneuploidía (constitución cromosómica anormal) por lo general es dañina o letal para células relativamente no diferenciadas que deben desarrollarse en muchas estructuras complejas de un organismo pero a menudo pueden ser toleradas en clones de células que tienen destinos y deberes limitados. (b) La recombinación mitótica entre un cromosoma con un alelo silvestre y un alelo mutante, seguida de la segregación cromosómica, puede producir una célula que contenga dos copias del alelo mutante.

gen es normalmente activado o reprimido por cambios en la cromatina mediados por SWI/SNF, las mutaciones en los genes que codifican las proteínas SWI o SNF producirán cambios en la expresión del gen diana. Los estudios con ratones transgénicos sugieren que SWI/SNF tiene un papel en la represión de los genes *E2F*, inhibiendo de este modo la progresión a través del ciclo celular. Así, la pérdida de función de SWI/SNF, al igual que la pérdida de función de Rb, puede conducir a un crecimiento excesivo y quizá, a cáncer. En efecto, en ratones, la proteína Rb recluta a las proteínas SWI/SNF para reprimir la transcripción del gen *E2F*. Rb reprime genes a través de este efecto en *E2F* y por medio del reclutamiento de desacetilasas de histonas y metiltransferasas de histonas.

La evidencia reciente en seres humanos y ratones ha implicado fuertemente al gen *SNF5* en el cáncer. *Snf5* es un miembro del centro del complejo SWI/SNF. En seres humanos, las mutaciones somáticas inactivantes en *SNF5* producen tumores rabdoideos, los cuales por lo

general se forman en el riñón, y una disposición heredada (familiar) de formar tumores cerebrales y de otro tipo. En ratones, el 15-30% de los heterocigotos *snf5*⁻/*snf5*⁺ desarrollan tumores rabdoideos, y en todos los casos las células tumorales han perdido el alelo funcional remanente. Dado que no se conocía nada acerca del mecanismo involucrado, los estudios por micromatrices fueron utilizados para descubrir los cambios reguladores en los tumores. Estos estudios mostraron la similitud en la expresión génica de los tumores de ratón y de ser humano y que la pérdida de *SNF5* lleva a la expresión aumentada de los genes del ciclo celular, incluyendo muchos regulados por *E2F*. Con los complejos de remodelación de la cromatina involucrados en tantos aspectos del control transcripcional, se espera que SWI/SNF y complejos similares estén relacionados con muchos cánceres. En seres humanos, las mutaciones en *Brg1*, el cual codifica la subunidad catalítica de SWI/SNF, han sido encontradas en tumores de próstata, pulmón y mama.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 24.2

La base genética del cáncer

- Las mutaciones de ganancia de función dominantes en los protooncogenes y las mutaciones de pérdida de función recesivas en genes supresores de tumores son oncogénicas.
- Entre las proteínas codificadas por protooncogenes, están las proteínas de señalización promotoras del crecimiento y sus receptores, las proteínas de transducción de señales, factores de transcripción y proteínas apoptóticas (véase Fig. 24-11).
- Una mutación inactivante de uno de los dos alelos de un protooncogén lo convierte en un oncogén. Esto puede ocurrir por una mutación puntual, amplificación génica, translocación génica o sobreexpresión.
- El primer oncogén humano en ser identificado codifica una forma constitutivamente activa de Ras, una proteína de transducción de la señal. Este oncogén fue aislado del carcinoma de vejiga humano (véase Fig. 24-5).
- Los genes supresores de tumores codifican proteínas que directa o indirectamente interfieren con la progresión a través del ciclo celular, tales como proteínas de control de los puntos de control que detienen el ciclo celular en respuesta a defectos en el ciclo celular, componentes de las vías de señalización que inhiben el crecimiento, proteínas proapoptóticas, reguladores de actividades cinasa y enzimas de reparación del DNA.
- El primer gen supresor de tumores en ser reconocido, *RB*, está mutado en el retinoblastoma y en muchos otros tumores; algún componente de la vía de RB está alterado en la mayoría de los tumores.
- La herencia de un solo alelo mutante de *RB* aumenta sobremedida la probabilidad de que un tipo específico de cáncer se desarrolle, como es el caso de muchos otros genes supresores de tumores (p. ej., *APC* y *BRCA-1*).
- En individuos nacidos heterocigotos para un gen supresor de tumores, una célula somática puede experimentar pérdida de heterocigosidad por recombinación mitótica, segregación cromosómica alterada, mutación, silenciamiento génico o delección (véase Fig. 24-14).
- Las mutaciones en los genes cuidadores son genéticamente recesivas, ya que tener siquiera una copia funcional es por lo general suficiente para prevenir un daño serio en el DNA. Sin embargo, una sola copia deja al portador sujeto a una posible pérdida de la heterocigosidad.
- Las mutaciones que afectan los factores modificadores de la cromatina que participan en el control transcripcional, tales como el complejo de remodelación de la cromatina SWI/SNF, están asociadas con una variedad de tumores.

24.3 Cáncer y alteración de las vías reguladoras del crecimiento

En esta sección, examinaremos con mayor detalle cómo la disregulación de las vías de señalización inhibidores del crecimiento contribuye a la tumorigénesis. Primero analizaremos cómo la utilización de

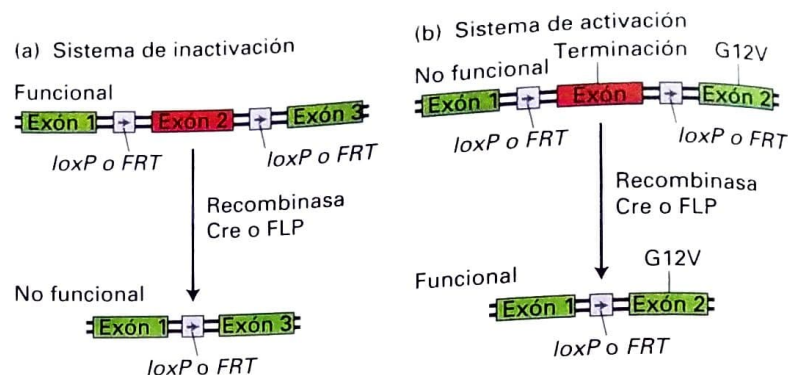
modelos en ratón de cánceres humanos ha contribuido a dar forma a nuestro entendimiento del proceso de carcinogénesis. Luego examinaremos con mayor detalle cómo las mutaciones que resultan en la actividad desregulada, constitutiva, de ciertas proteínas o en su sobreproducción promueven la proliferación celular y la transformación, seguido por un análisis de cómo las mutaciones de pérdida de función en las vías de diferenciación contribuyen a la tumorigénesis. Finalizaremos esta sección con una descripción de cómo el análisis molecular de tumores está cambiando la manera en la que el cáncer es tratado. La medicina personalizada (la capacidad de diagnosticar tumores individuales a nivel molecular y de designar tratamientos para el cáncer específico de un paciente) es probable que se convierta en una realidad en el siglo XXI.

Los modelos en ratón del cáncer humano nos enseñan acerca del inicio de la enfermedad y su progresión

Los ratones modificados genéticamente han provisto enormes conocimientos sobre los pasos del inicio de un tumor y su progresión. Por ejemplo, como se mostró previamente en la Figura 24-7, los experimentos en murinos revelaron que los ratones que sobreexpresan Myc desarrollan tumores en los tejidos en los que Myc está presente en niveles altos, y el desarrollo tumoral se acelera cuando la sobreproducción de Myc se combina con la expresión de un oncogén adicional, lo que apoya el modelo de impacto múltiple de inducción del cáncer. El análisis de ratones que carecen de genes supresores de tumores clave como *RB* y *p53* también ayudó a dar forma a nuestro entendimiento de cómo funcionan estos genes. Sin embargo, utilizar modelos en ratón para estudiar el cáncer no siempre es sencillo. Muchos genes supresores de tumores cumplen funciones esenciales durante el desarrollo normal del ratón, y los ratones que carecen de ambas copias de estos genes no son viables. La función esencial de estos genes durante la embriogénesis temprana imposibilita el estudio de su papel en la progresión tumoral. Para sortear este problema, los investigadores han comenzado a utilizar estrategias de manipulación génica condicional y de inactivación génica que permiten la activación específica o la inactivación de un gen en un tejido determinado y/o en un estadio del desarrollo determinado.

En el modelo condicional en ratón, un alelo de un oncogén particular o gen supresor de tumores es silvestre hasta que es activado o inactivado con químicos exógenos o virus en un tejido o en un momento específico. En el corazón de los sistemas condicionales están las recombinasas Cre y FLP. Estas recombinasas facilitan la recombinación homóloga entre los sitios loxP y FRT, respectivamente (Fig. 24-15). Cuando las recombinasas son dirigidas por un promotor específico de un tejido, la recombinación ocurre solo en el tejido que produce la recombinasa. El sistema de recombinasa puede ser utilizado de dos formas. Los sitios diana de la recombinasa podrían flanquear un exón. En la inducción de la recombinasa, el exón se pierde y el gen es inactivado (Fig. 24-15a). Este sistema es especialmente útil para inactivar los genes supresores de tumores en forma específica de un tejido. La expresión de oncogenes puede ser controlada introduciendo en el oncogén un exón adicional que contiene un codón de terminación. El oncogén con el exón que contiene el codón de terminación es, por lo tanto, no funcional. Sin embargo, si el exón adicional está flanqueado por los sitios diana de la recombinasa, el oncogén será producido en la inducción de la recombinasa (Fig. 24-15b). Utilizando este sistema,

FIGURA 24-15 Modelos condicionales de cáncer en ratón. En el sistema de inactivación (a), un exón es flanqueado por dos sitios loxP o FRT, como se muestra. La expresión de la recombinasa Cre o FLP lleva a recombinación homóloga entre los dos sitios loxP y FRT, respectivamente. Esto conduce a la escisión del exón, lo que vuelve al gen no funcional. En el sistema de activación (b), un exón adicional con un codón de terminación es introducido en el gen de interés, lo que torna al gen no funcional. Este exón está flanqueado por sitios loxP o FRT. Cuando la recombinasa Cre o FLP es inducida, el exón que contiene el codón de terminación es removido en la recombinación y el gen de interés, tal como una forma oncogénica de *ras* con valina sustituida por glicina en la posición 12, se expresa.



los investigadores han examinado el papel de las formas oncogénicas de Ras en el ratón y, usando este alelo Ras oncogénico condicional, han creado un modelo en ratón del cáncer de pulmón humano.

El desarrollo de promotores que puedan ser regulados por químicos añadidos exógenamente ha provisto un método adicional poderoso para controlar la expresión génica en los animales. Los más ampliamente utilizados son los sistemas Tet-On y Tet-Off. Cada sistema está compuesto de dos partes: el promotor del operón Tet que regula la expresión del gen de interés y el transactivador tTA (en el caso de Tet-Off) o el transactivador inverso rtTA (en el caso de Tet-On). Ambos factores de transcripción se unen al operador Tet para inducir la expresión génica, y ambos son regulables por tetraciclina (o el análogo de tetraciclina doxiciclina, más comúnmente usado por los científicos en sus experimentos). La diferencia entre los dos sistemas radica en las respuestas de tTA y rtTA a la unión a doxiciclina. La doxiciclina inhibe la unión de tTA al promotor. Así, en el sistema Tet-Off, la adición de doxiciclina apaga la transcripción. En el sistema Tet-On, rtTA no puede unirse al promotor en ausencia del fármaco y la adición de doxiciclina induce la transcripción. La doxiciclina puede ser administrada simplemente añadiéndola al suministro de agua del animal. Colocar los reguladores transcripcionales de Tet bajo el control de promotores específicos de un tejido permite, por lo tanto, el control temporal y espacial de la expresión génica.

Utilizando el sistema Tet-Off para controlar la expresión de Myc, los investigadores encontraron que la supervivencia de un tumor depende de la producción continua de la proteína Myc. Cuando la expresión de Myc fue incluso brevemente interrumpida, las células de sarcoma osteogénico cesaron de dividirse y se desarrollaron en osteocitos maduros (Fig. 24-16). Ahora está claro que la actividad continua de los oncogenes es requerida para la supervivencia de muchos tumores diferentes. Esta dependencia de un tumor de la producción continua de un oncogén ha sido denominada **adicción oncogénica** y podría proporcionar nuevas oportunidades para el tratamiento. Los inhibidores específicos de los oncogenes (incluso cuando son aplicados solo transitoriamente) podrían llevar a la regresión de la enfermedad.

Los receptores oncogénicos pueden promover la proliferación en ausencia de factores de crecimiento externos

La hiperactivación de una proteína de señalización inductora del crecimiento debida a una alteración de la proteína podría parecer un mecanismo probable de cáncer, pero de hecho esto rara vez ocurre. Solo

uno de tales genes que ocurren naturalmente, *sis*, ha sido descubierto. El oncogén *sis*, el cual codifica una forma alterada del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, *platelet-derived growth factor*), puede estimular en forma aberrante la proliferación de células que normalmente expresan el receptor de PDGF. Un evento más común es que las células cancerosas comiencen a producir un factor de crecimiento no alterado que actúe en la célula que lo produce. Esto se llama estimulación **autocrina**.

En contraste, los oncogenes que codifican receptores de superficie celular que transducen señales promotoras del crecimiento han sido asociados con varios tipos de cáncer. Muchos de estos receptores tienen

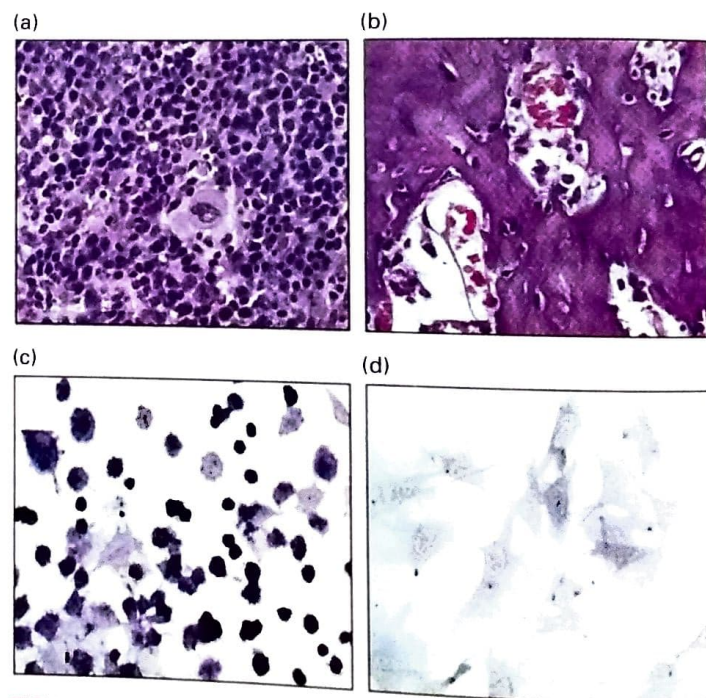


FIGURA EXPERIMENTAL 24-16 Myc se necesita continuamente para el crecimiento tumoral. Se desarrollaron ratones transgénicos en los cuales la expresión de *myc* estaba dirigida por el sistema Tet-Off. El 1% de tales ratones desarrolla sarcomas osteogénicos. Los ratones silvestres fueron trasplantados con sarcomas osteogénicos y el gen *myc* fue luego inactivado tratando a los ratones con doxiciclina. Esto causó el cese de la proliferación de los sarcomas osteogénicos (a) y la diferenciación en osteocitos maduros (b). Después de alcalina, un marcador de sarcomas osteogénicos (c,d). Sorprendentemente, la reexpresión de la proteína Myc no disparó un regreso al estado de sarcoma. (De Meenakshi y cols., 2002, *Science* 297:102)

actividad proteica tirosincinasa intrínseca en sus dominios citosólicos, una actividad que permanece quiescente hasta que es activada. La unión del ligando a los dominios externos de estos **receptores tirosincinasas (RTK)** lleva a su dimerización y a la activación de su actividad cinasa, lo que inicia una vía de señalización intracelular que, en última instancia, promueve la proliferación.

En algunos casos, una mutación puntual cambia un RTK normal a uno que forma un dímero y que está constitutivamente activo incluso en ausencia de ligando. Por ejemplo, una sola mutación puntual convierte el receptor 2 de EGF humano normal (Her2) en la oncoproteína Neu ("neu" por su primer papel conocido, en el neuroblastoma), la cual es un iniciador de ciertos cánceres de ratón (Fig. 24-17, *izquierda*). De manera similar, los tumores humanos llamados *neoplasia endocrina múltiple tipo 2* producen un receptor de un factor neurotrófico dímérico derivado de la glía (GDNF, *glia-derived neurotrophic factor*) constitutivamente activo que surge a partir de una mutación puntual en el dominio extracelular. El receptor de GDNF y el receptor Her2 son proteínas con actividad tirosincinasa, de manera que las formas

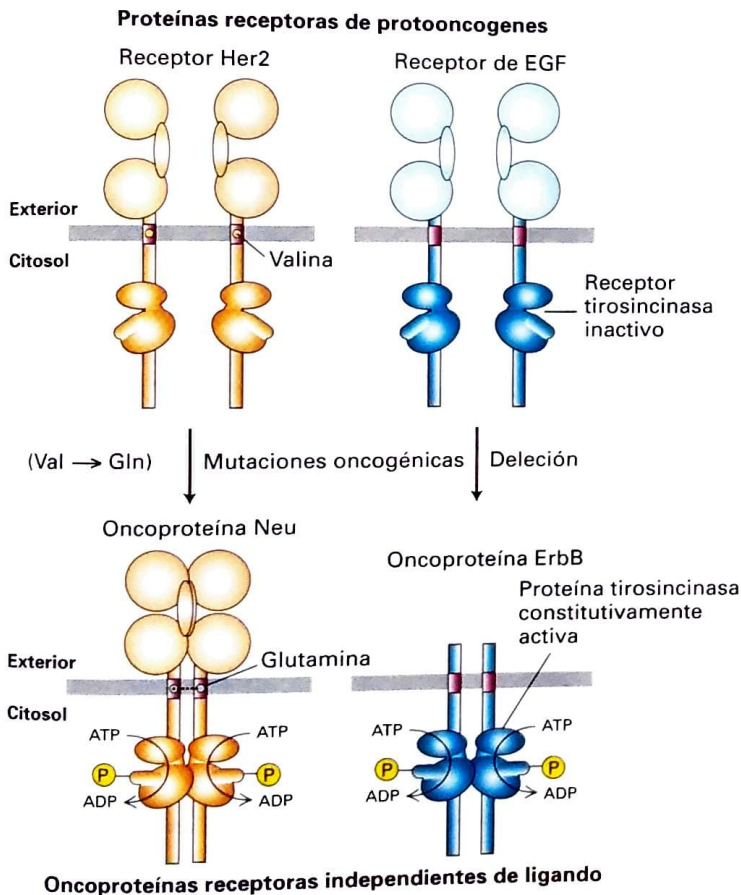


FIGURA 24-17 Efectos de las mutaciones oncogénicas en protooncogenes que codifican receptores de superficie celular.

Izquierda: una mutación que altera un solo aminoácido (valina a glutamina) en la región transmembrana del receptor Her2 causa la dimerización del receptor, lo que incluso en ausencia del ligando normal relacionado con EGF, lo que torna a la oncoproteína Neu una cinasa constitutivamente activa. *Derecha:* una delección que causa la pérdida del dominio extracelular de unión al ligando en el receptor de EGF lleva, por razones desconocidas, a la activación constitutiva de la actividad cinasa de la oncoproteína resultante ErbB.

constitutivamente activas fosforilan en exceso sus proteínas diana corriente abajo. En otros casos, la delección de la mayor parte del dominio extracelular de unión al ligando produce un receptor oncogénico constitutivamente activo. Por ejemplo, la delección del dominio extracelular del receptor de EGF normal (Fig. 24-17, *derecha*) lo convierte en la oncoproteína dímérica ErbB (del virus de la eritroblastosis, en el que una versión viral del gen alterado fue identificada por primera vez).

Las mutaciones que llevan a la sobreproducción de un RTK normal también pueden ser oncogénicas. Por ejemplo, muchos cánceres de mama humanos producen en exceso un receptor Her2 normal. Como resultado, las células son estimuladas para proliferar en presencia de muy bajas concentraciones de EGF y hormonas relacionadas, concentraciones demasiado bajas como para estimular la proliferación de células normales (véase Cap. 16).

Los activadores virales de los receptores de factores de crecimiento actúan como oncoproteínas

Los virus utilizan sus propios trucos para causar cáncer, presumiblemente para aumentar la producción de virus de las células cancerosas infectadas. Por ejemplo, un retrovirus llamado *spleen focus-forming virus* (SFFV) induce eritroleucemia (un tumor de progenitores eritroides) en ratones adultos mediante la manipulación de una señal del desarrollo normal. La proliferación, supervivencia y diferenciación de progenitores eritroides en células rojas maduras requiere eritropoyetina (Epo) y el correspondiente receptor de Epo (véase Fig. 16-8). Una glucoproteína mutante de envoltura del SFFV, denominada gp55, es responsable del efecto oncogénico del virus. Aunque gp55 no puede funcionar como una proteína de envoltura de retrovirus normal en la formación de los virus y en la infección, ha adquirido la notable capacidad de unirse a los receptores de Epo en la célula infectada y activarlos (Fig. 24-18). Estimulando inapropiada y continuamente la proliferación de los progenitores eritroides, gp55 induce la formación

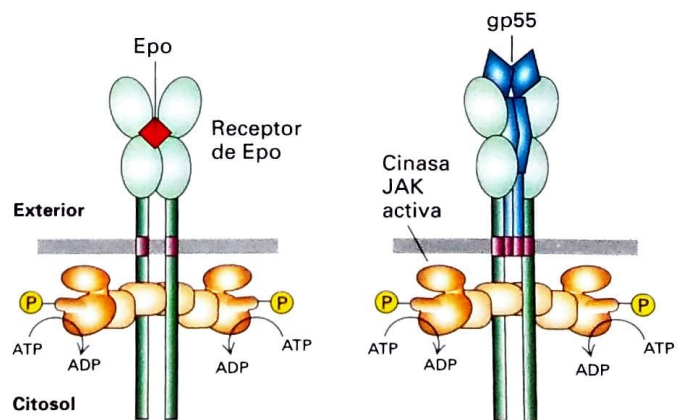


FIGURA 24-18 Activación del receptor de eritropoyetina (Epo) por el ligando natural, Epo, o por una oncoproteína viral. La unión de Epo dimeriza el receptor e induce la formación de eritrocitos de células progenitoras eritroides. Normalmente, los cánceres ocurren cuando las células progenitoras infectadas por el *spleen focus-forming virus* producen el receptor de Epo y gp55 viral, ambos localizados en la membrana plasmática. Los dominios transmembrana de gp55 dímérico se unen específicamente al receptor de Epo, y dimerizan y activan el receptor en ausencia de Epo. (Véase S. N. Constantinescu y cols., 1999, *EMBO J.* 18:3334.)

Otro ejemplo de este fenómeno es provisto por el virus del papiloma humano (HPV), el virus de DNA transmitido sexualmente que causa cáncer de cuello uterino y verrugas genitales. Una proteína del virus del papiloma designada E5, la cual contiene solo 44 aminoácidos, atraviesa la membrana plasmática y forma un dímero o un trímero. Cada polipéptido E5 puede formar un complejo estable con un receptor endógeno para el factor de crecimiento derivado de plaquetas, lo que de este modo agrega dos o más receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas dentro del plano de la membrana plasmática. Esto imita la dimerización de un receptor mediada por hormonas y causa la activación sostenida del receptor y, eventualmente, la transformación de la célula. Como veremos más adelante, el genoma de HPV también codifica para varias otras proteínas que actúan para inhibir los genes supresores de tumores, lo que contribuye adicionalmente a la transformación celular. Recientemente se ha encontrado que una vacuna contra una proteína de la cápside del HPV (L1) protege contra el cáncer de cuello de útero causado por al menos algunos subtipos de HPV.

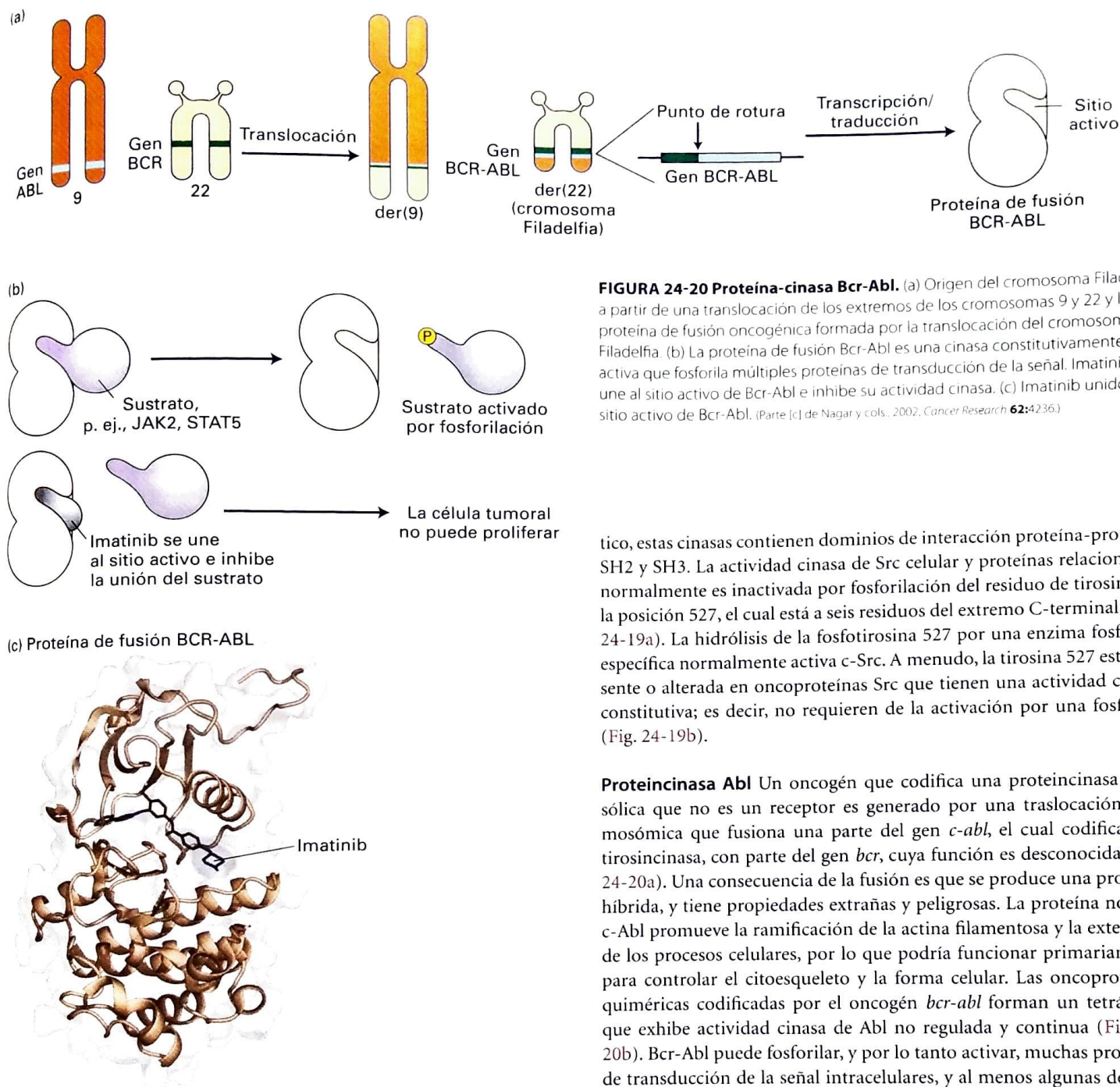


FIGURA 24-20 Proteína-cinasa Bcr-Abl. (a) Origen del cromosoma Filadelfia a partir de una translocación de los extremos de los cromosomas 9 y 22 y la proteína de fusión oncogénica formada por la translocación del cromosoma Filadelfia. (b) La proteína de fusión Bcr-Abl es una cinasa constitutivamente activa que fosforila múltiples proteínas de transducción de la señal. Imatinib se une al sitio activo de Bcr-Abl e inhibe su actividad cinasa. (c) Imatinib unido al sitio activo de Bcr-Abl. (Parte [c] de Nagar y cols., 2002; *Cancer Research* **62**:4236.)

tico, estas cinasas contienen dominios de interacción proteína-proteína SH2 y SH3. La actividad cinasa de Src celular y proteínas relacionadas normalmente es inactivada por fosforilación del residuo de tirosina en la posición 527, el cual está a seis residuos del extremo C-terminal (Fig. 24-19a). La hidrólisis de la fosfotirosina 527 por una enzima fosfatasa específica normalmente activa c-Src. A menudo, la tirosina 527 está ausente o alterada en oncoproteínas Src que tienen una actividad cinasa constitutiva; es decir, no requieren de la activación por una fosfatasa (Fig. 24-19b).

Proteincinasa Abl Un oncogén que codifica una proteincinasa citosólica que no es un receptor es generado por una traslocación cromosómica que fusiona una parte del gen *c-abl*, el cual codifica una tirosincinasa, con parte del gen *bcr*, cuya función es desconocida (Fig. 24-20a). Una consecuencia de la fusión es que se produce una proteína híbrida, y tiene propiedades extrañas y peligrosas. La proteína normal c-Abl promueve la ramificación de la actina filamentososa y la extensión de los procesos celulares, por lo que podría funcionar primariamente para controlar el citoesqueleto y la forma celular. Las oncoproteínas quiméricas codificadas por el oncogén *bcr-abl* forman un tetrámero que exhibe actividad cinasa de Abl no regulada y continua (Fig. 24-20b). Bcr-Abl puede fosforilar, y por lo tanto activar, muchas proteínas de transducción de la señal intracelulares, y al menos algunas de estas proteínas no son sustratos normales de Abl. Por ejemplo, Bcr-Abl puede activar la cinasa JAK2 y el factor de transcripción STAT5, los cuales normalmente son activados por la unión de factores de crecimiento (p. ej., eritropoyetina) a receptores de la superficie celular (véase Fig. 16-10). Bcr-Abl puede también proveer un sitio de anclaje para las proteínas de transducción de la señal a través de la parte Bcr, y de este modo estimular potencialmente la transducción de señales.

La translocación cromosómica que forma *bcr-abl* genera el diagnóstico *cromosoma Filadelfia*, descubierto en 1960 (véase Fig. 24-20a). Si esta traslocación ocurre en una célula hematopoyética en la médula ósea, la actividad del oncogén quimérico *bcr-abl* resulta en la fase inicial de la leucemia mielógena crónica humana, caracterizada por una expansión en el número de leucocitos. Una segunda muta-

bromatosis, al igual que el retinoblastoma hereditario, es heredada como un rasgo dominante autosómico.

Proteincinasa Src Varios oncogenes codifican proteincinasas citosólicas que normalmente transducen señales en una variedad de vías de señalización intracelulares. De hecho, el primer oncogén en ser descubierto, *v-src* del retrovirus del sarcoma de Rous, codifica una proteína tirosincinasa constitutivamente activa. Al menos ocho protooncogenes de mamíferos codifican una familia de tirosincinasas que no son receptores relacionados con la proteína v-Src. Además de un dominio catalítico

ción de pérdida de función en una célula que porta *bcr-abl* (p. ej., en *p53* o *RB*) lleva a leucemia aguda, la cual a menudo es fatal. La translocación del cromosoma de la leucemia mielógena crónica fue solo el primero de una larga serie de translocaciones cromosómicas distintivas, o “firmas”, vinculadas a formas particulares de leucemia. Muchas de las fusiones de genes involucran genes que codifican reguladores transcripcionales, particularmente reguladores transcripcionales de genes *Hox*, un grupo de factores de transcripción requerido para la proliferación celular y la diferenciación durante el desarrollo embrionario. Cada caso presenta una oportunidad para un mayor entendimiento de la enfermedad, un diagnóstico temprano y nuevas terapias. En el caso de la leucemia mielógena crónica, ese segundo paso hacia una terapia exitosa ya ha sido dado.



Después de una búsqueda esmerada, se identificó un inhibidor de la cinasa Abl llamado imatinib (Gleevec) como un posible tratamiento para la leucemia mielógena crónica a principios de la década de los años 1990. Imatinib, el cual se une directamente al sitio activo de la cinasa Abl e inhibe la actividad cinasa, es extremadamente letal para las células de la leucemia mielógena crónica, mientras que no afecta a las células normales (Fig. 24-20c). Después de ensayos clínicos que demostraron la efectividad del imatinib en el tratamiento de la leucemia mielógena crónica, a pesar de algunos efectos secundarios, fue aprobado por la FDA en 2001 como el primer agente contra el cáncer dirigida a una proteína de transducción de señales única de las células tumorales. Imatinib inhibe varias otras tirosincinasas que están implicadas en diferentes cánceres y ha sido exitoso en ensayos para el tratamiento de estas enfermedades, incluyendo también formas de tumores gastrointestinales. Existen 90 tirosincinasas funcionales codificadas en el genoma humano, de manera que los fármacos relacionados con imatinib podrían ser útiles para controlar las actividades de todas estas proteínas. Un desafío permanente es que las células tumorales pueden evolucionar para ser resistentes a imatinib y a otros agentes del mismo tipo, lo que requiere la invención de fármacos alternativos. ■

La producción inapropiada de factores de transcripción nucleares puede inducir la transformación

Eventualmente, las mutaciones oncogénicas que crean oncogenes o dañan genes supresores de tumores causan cambios en la expresión génica. Desde lo experimental, esto puede ser medido al comparar las cantidades de mRNA diferentes producidos en células normales en contraposición con células tumorales. Como se ha analizado antes, ahora podemos medir tales diferencias en la expresión de miles de genes con micromatrices de DNA (véase Fig. 24-10).

Puesto que el efecto más directo sobre la expresión génica es ejercido por factores de transcripción, no resulta sorprendente que muchos oncogenes codifiquen factores de transcripción. Dos ejemplos son *jun* y *fos*, los cuales en un inicio fueron identificados en retrovirus transformantes y más tarde se descubrió que se sobreexpresan en algunos tumores humanos. Los protooncogenes *c-jun* y *c-fos* codifican proteínas que algunas veces se asocian para formar un factor de transcripción heterodimérico, llamado *AP1*, que se une a una secuencia hallada en promotores y amplificadores de muchos genes (véanse Fig. 7-32a y Cap. 16). Ambos Fos y Jun también pueden actuar independientemente como factores de transcripción. Funcionan como oncoproteínas activando la transcripción de genes clave que

codifican proteínas que promueven el crecimiento o inhibiendo la transcripción de genes que reprimen el crecimiento.

Muchas proteínas de protooncogenes nucleares son producidas cuando las células normales son estimuladas para crecer, lo que indica su papel directo en el control del crecimiento. Por ejemplo, el tratamiento contra el factor de crecimiento derivado de plaquetas de células 3T3 quiescentes induce un incremento aproximadamente 50 veces mayor en la producción de *c-Fos* y *c-Myc*, los productos normales de los protooncogenes *fos* y *myc*. Inicialmente existe un aumento transitorio de *c-Fos* y más tarde un incremento más prolongado de *c-Myc* (Fig. 24-21). Los niveles de ambas proteínas declinan en pocas horas, un efecto regulador que podría, en células normales, contribuir para evitar el cáncer. Tanto *c-Fos* como *c-Myc* estimulan la transcripción de genes que codifican proteínas que promueven la progresión a través de la fase G_1 del ciclo celular y la transición de G_1 a S. En los tumores, las formas oncogénicas de estos u otros factores de transcripción con frecuencia son expresadas en niveles altos y desregulados.

En células normales, los mRNA de *c-Fos* y *c-Myc* y las proteínas que estos codifican son intrínsecamente inestables, lo que lleva a su rápida degradación después de que los genes son inducidos. Algunos de los cambios que convierten a *c-fos* de un gen normal en un oncogén involucran delecciones genéticas de las secuencias que hacen que el mRNA y la proteína Fos tengan una corta vida media (semivida). La conversión del protooncogén *c-myc* en un oncogén puede ocurrir por diferentes mecanismos. En células del tumor humano conocido como *linfoma de Burkitt*, el gen *c-myc* se transloca a un sitio cercano a los genes que codifican la cadena pesada de los anticuerpos, los cuales están normalmente activos en los leucocitos que producen anticuerpos (Fig. 24-22). La translocación de *c-myc* es una rara aberración de los reordenamientos de DNA normales que ocurren durante la maduración de las células productoras de anticuerpos. El gen *myc* translocado, ahora regulado por el amplificador del gen de anticuerpo, se expresa continuamente, y esto causa que la célula se vuelva cancerosa. La amplificación localizada de un segmento

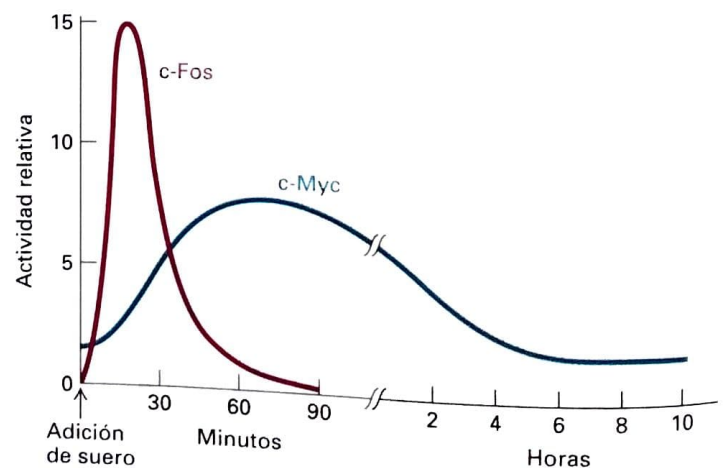


FIGURA EXPERIMENTAL 24-21 La adición de suero a células 3T3 quiescentes produce un aumento en la actividad de dos productos de protooncogenes, *c-Fos* y *c-Myc*. El suero contiene factores, tales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), que estimulan el crecimiento de células quiescentes. Uno de los primeros efectos de los factores de crecimiento es inducir la expresión de *c-fos* y *c-myc*, cuyas proteínas codificadas son factores de transcripción. (Véase M. E. Greenberg and E. B. Ziff, 1984, *Nature* 311:433).

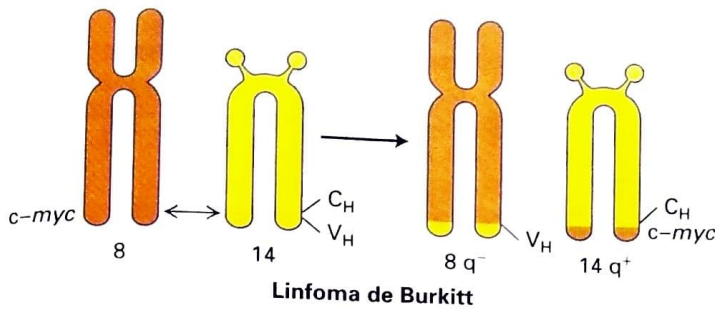


FIGURA 24-22 Traslocación cromosómica en el linfoma de Burkitt.

Como resultado de la translocación entre los cromosomas 8 y 14, el gen *c-myc* está ubicado adyacente al gen para una parte de la cadena pesada de anticuerpos (C_H), lo que lleva a la sobreproducción del factor de transcripción de Myc en los linfocitos y, por lo tanto, a su crecimiento hasta convertirse en un linfoma.

de DNA que contenga el gen *myc*, la cual ocurre en muchos tumores humanos, también causa una producción inapropiadamente elevada de la proteína Myc de otra manera normal.

El gen *c-myc* codifica una proteína de cremallera hélice-bucle-hélice básica que actúa como una parte de un conjunto de proteínas que interactúan y pueden formar dímeros en varias combinaciones, unirse al DNA y regular coordinadamente la transcripción de genes diana. Otros miembros del conjunto de proteínas incluyen a Mad, Max y Mnt. Max puede formar heterodímeros con Myc, Mad y Mnt. Los dímeros Myc-Max regulan genes que controlan la proliferación, como ciclinas. Las proteínas Mad inhiben las proteínas Myc, lo cual ha llevado a un interés en usar las proteínas Mad, o los fármacos que las estimulan, para refrenar la actividad excesiva de Myc que contribuye a la formación de tumores. Los complejos de proteína Myc afectan la transcripción al reclutar complejos de modificación de la cromatina que contienen acetiltransferasas de histonas (las cuales usualmente estimulan la transcripción; véase Cap. 7) a genes diana de Myc. Mad y Mnt trabajan con la proteína correpresora Sin3 para traer desacetilasas de histonas que ayuden a bloquear la transcripción. Juntas, todas estas proteínas forman una red reguladora que utiliza la asociación proteína-proteína, las variaciones en la unión al DNA y la regulación transcripcional para controlar la proliferación celular. La sobreproducción de la proteína Myc inclina la balanza a favor de la división y el crecimiento celulares.

Las aberraciones en las vías de señalización que controlan el desarrollo están asociadas con muchos cánceres

Durante el desarrollo normal, las señales secretadas como Hedgehog (Hh), Wnt y TGF- β frecuentemente son utilizadas para dirigir a las células hacia destinos particulares del desarrollo, lo cual podría incluir la propiedad de una rápida mitosis. Los efectos de tales señales deben estar regulados de manera que el crecimiento esté limitado al momento y lugar correctos. Entre los mecanismos disponibles para refrenar los efectos de señales del desarrollo poderosas están los antagonistas intracelulares inducibles, los bloqueadores de receptores y las señales de competencia. Probablemente, las mutaciones que impiden que tales mecanismos de restricción operen sean oncogénicas, lo que causaría crecimiento inapropiado o canceroso.

La señalización por Hh, la cual es utilizada repetidas veces durante el desarrollo para controlar los destinos celulares, es un buen ejemplo de una vía de señalización implicada en la inducción del cáncer. En la piel y el cerebelo, una de las proteínas Hh humanas, Sonic hedgehog, estimula la división celular uniéndose a una proteína de membrana llamada Patched1 (Ptc1, véase Fig. 16-33) e inactivándola. Las mutaciones de pérdida de función en *ptc1* permiten la proliferación de la célula en ausencia de una señal Hh; de este modo, *ptc1* es un gen supresor de tumores. Las personas que heredan una sola copia funcional de *ptc1* tienen una propensión a desarrollar cáncer de piel y de cerebro; cualquiera de estos casos puede ocurrir cuando el alelo remanente está dañado. Otras personas también pueden desarrollar estas enfermedades si sufren la pérdida de ambas copias del gen. Así, existen el caso familiar (heredado) y el esporádico (no heredado) de estas enfermedades, al igual que en el retinoblastoma. Las mutaciones en otros genes en la vía de señalización de Hh también están asociadas con el cáncer. Algunas de dichas mutaciones crean oncogenes que encienden los genes diana de Hh en forma inapropiada; otras son mutaciones recesivas que afectan reguladores negativos como Ptc1. Como es el caso para un número de otros genes supresores de tumores, la pérdida total de función de Ptc1 llevaría a una muerte fetal temprana, ya que es necesario para el desarrollo, de manera que solo las células tumorales son homocigotas *ptc1/ptc1*.

Muchas de las vías de señalización descritas en otros capítulos desempeñan funciones en el control del desarrollo embrionario y la proliferación celular en tejidos adultos. En los últimos años, las mutaciones que afectan los componentes de la mayoría de estas vías de señalización han sido vinculadas con el cáncer. De hecho, una vez que un gen en una vía de desarrollo ha sido vinculado a un tipo de cáncer humano, el conocimiento de la vía obtenido de organismos modelo como gusanos, moscas o ratones permite investigaciones centradas en la posible participación de genes adicionales de la vía en otros casos de cáncer. Por ejemplo ahora se sabe que APC, un gen crítico mutado en la vía del carcinoma de colon, es parte de la vía de señalización de Wnt (véase Cap. 16), lo cual llevó al descubrimiento de la participación de las mutaciones en β -catenina en el cáncer de colon. Las mutaciones en genes del desarrollo supresores de tumores promueven la formación de tumores en los tejidos en los que el gen afectado normalmente ayuda a refrenar el crecimiento. De este modo, las mutaciones en los genes supresores de tumores no causarán cánceres en tejidos en los que la función primaria del regulador del desarrollo sea controlar el destino celular (qué tipo de célula se desarrolla) pero no la división celular. Las mutaciones en protooncogenes del desarrollo podrían inducir la formación de tumores en tejidos en los que un gen afectado normalmente promueve la proliferación celular o en otro tejido en el que el gen se haya vuelto aberrantemente activo.

El factor de crecimiento transformador β (TGF- β), a pesar de su nombre, inhibe la proliferación de muchos tipos celulares, incluyendo la mayoría de las células epiteliales y del sistema inmunitario. La unión de TGF- β a su receptor induce la activación de factores de crecimiento Smad citosólicos (véase Fig. 16-28). Después de ser translocados al núcleo, los Smad pueden promover la expresión del gen que codifica p15, un inhibidor de la cinasa 4 dependiente de ciclina (CDK4), el cual hace que las células se detengan en G_1 . La señalización por TGF- β también promueve la expresión de genes que codifican proteínas de la matriz extracelular e inhibidor del activador de plasminógeno 1 (PAI-1), el cual reduce la degradación de la matriz catalizada por plamina. Las mutaciones de pérdida de función en los receptores TGF- β o en los

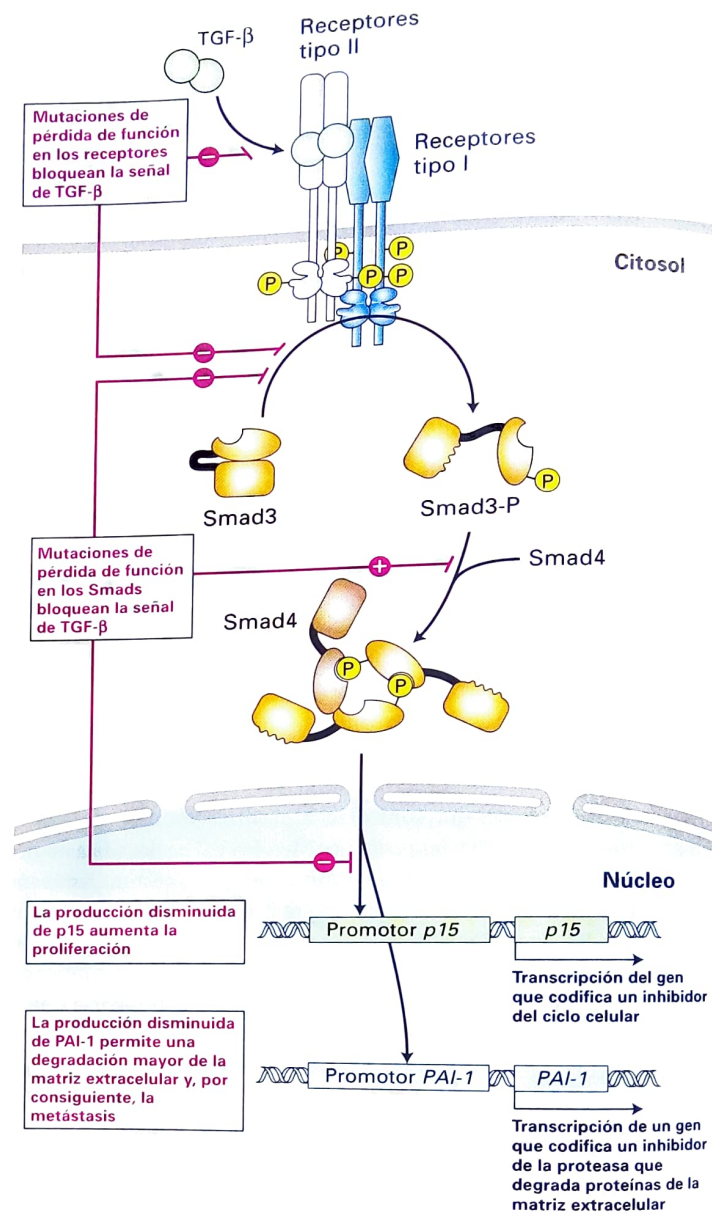
FIGURA 24-23 Efecto de la pérdida de la señalización por TGF- β . La unión de TGF- β , un antiproliferante, causa la activación de los factores de transcripción Smad. En ausencia de una señalización por TGF- β efectiva debido a la mutación del receptor o a una mutación en SMAD, la proliferación celular y la invasión de la matriz extracelular (MEC) aumentan. (Véase X. Hua y cols., 1998, *Genes & Dev* 12:3084)

Smad promueven así la proliferación celular y probablemente contribuyen a la invasividad y metástasis de las células tumorales (Fig. 24-23). De hecho, tales mutaciones han sido encontradas en una variedad de cánceres humanos. Por ejemplo, la delección del gen *Smad4* ocurre en muchos cánceres pancreáticos humanos; las células de retinoblastoma y de cáncer de colon carecen de receptores para TGF- β funcionales y, por lo tanto, son insensibles a la inhibición del crecimiento por TGF- β .

La biología celular molecular está cambiando la manera en que se trata el cáncer

La historia del imatinib descrita anteriormente ilustra cómo la genética (el descubrimiento del cromosoma Filadelfia y el oncogén crítico que este genera), en conjunto con la bioquímica (el descubrimiento de la acción molecular de la proteína Abl), puede llevar a una nueva terapia poderosa. En general, cada diferencia entre las células cancerosas y las células normales proporciona una nueva oportunidad de identificar un agente específico o un tratamiento que mate solo las células cancerosas o al menos detenga su crecimiento incontrolado. De este modo, el conocimiento de la biología celular molecular de los tumores es información crítica que puede ser explotada por los investigadores para desarrollar tratamientos contra el cáncer que ataquen con mayor precisión a las células cancerosas.

 El cáncer de mama es un buen ejemplo de cómo las técnicas de biología celular molecular han afectado los tratamientos tanto curativos como paliativos. Hasta el aumento de la incidencia de cáncer de pulmón, resultante de un incremento en las mujeres fumadoras, el cáncer de mama era el más mortal para las mujeres, y sigue siendo la segunda causa más frecuente de las muertes causadas por cáncer en mujeres. La causa del cáncer de mama es desconocida, pero la frecuencia aumenta si se portan ciertas mutaciones. A menudo, los cánceres de mama son diagnosticados durante exámenes de mamografía (rayos X) rutinarios. Típicamente, una biopsia de una masa de tejido de 1-2 cm se toma para controlar el diagnóstico y se estudia con anticuerpos para determinar si está presente un nivel alto del receptor de estrógenos o progesterona. Estos receptores de esteroides son capaces de estimular el crecimiento tumoral y a veces se expresan en altos niveles en las células de cáncer de mama. Si cualquiera de estos receptores está presente, es explotado en el tratamiento. Un agente llamado tamoxifeno, la cual inhibe el receptor de estrógenos, puede ser usada para privar a las células tumorales de una hormona estimuladora del crecimiento. La biopsia también es analizada para la amplificación del protooncogén HER2/NEU, el cual, como hemos visto, codifica el receptor 2 de EGF humano. Un anticuerpo monoclonal específico para Her2 ha sido un nuevo tratamiento sorprendentemente exitoso para el subconjunto de cánceres



de mama que producen Her2 en exceso. El anticuerpo de Her2 inyectado en la sangre reconoce a Her2, provoca su internalización y mata selectivamente a las células cancerosas sin ningún efecto aparente en las células de mama (y otras) normales que producen cantidades moderadas de Her2. En forma similar, muchos cánceres de pulmón contienen una amplificación del locus del receptor de EGF. El tratamiento con el inhibidor de EGFR erlotinib ha incrementado dramáticamente la expectativa de vida de pacientes con este tipo de cáncer de pulmón.

El cáncer de mama se trata con una combinación de cirugía, terapia de radiación y quimioterapia. El primer paso es la resección quirúrgica del tumor y el examen de los ganglios linfáticos en busca de evidencia de un tumor metastásico, principal factor de pronóstico adverso. El tratamiento subsiguiente involucra 6 semanas de radiación y 8 semanas

de quimioterapia con tres tipos distintos de agentes. Estos duros tratamientos son designados para matar a las células cancerosas en división; sin embargo, también causan una variedad de efectos secundarios, incluyendo supresión de la producción de glóbulos, pérdida del cabello, náuseas y neuropatía. Esto puede reducir la fuerza del sistema inmunitario, con el consiguiente riesgo de infección, y causar debilidad debido al suministro deficiente de oxígeno. Para ayudar a los pacientes, se les suministra factor de crecimiento G-SCF a fin de promover la formación de neutrófilos (un tipo de glóbulo blanco que combate las infecciones bacterianas y micóticas) y eritropoyetina (Epo) para estimular la formación de glóbulos rojos. A pesar de todo este tratamiento, una mujer con riesgo promedio (60 años de edad, tumor de 2 cm, 1 ganglio linfático positivo) tiene un 30-40% de riesgo de morir de cáncer en 10 años. Este riesgo puede ser reducido en un 10-15% con tratamiento de bloqueo hormonal tal como tamoxifeno, aprovechando los datos moleculares que muestran un receptor hormonal presente en las células cancerosas. La mortalidad es reducida otro 5-10% por tratamiento con anticuerpos contra la oncoproteína Her2/Neu. De este modo, la biología molecular está teniendo un enorme impacto en las tasas de supervivencia de las víctimas de cáncer de mama, aunque todavía mucho menos de lo deseable. ■

Para identificar más alteraciones genéticas únicas de un tumor que podrían ser explotadas para nuevas terapias, los investigadores ahora utilizan tecnologías de RNAi para identificar genes que, cuando están inactivados, causan que las células tumorales pero no las células normales mueran. Esta manera de identificar interacciones *letales sintéticas* entre alteraciones genéticas, las cuales por sí mismas no son letales, se introdujo por primera vez en levaduras de gemación. Con el desarrollo de las genotecas *short-hairpin* (sh)RNAi (una colección de constructos de RNAi cuya diana son todos los genes del genoma humano; véase Cap. 5), ahora este método también es factible en células humanas. Las células tumorales y las normales están infectadas con conjuntos de constructos de shRNAi, cada uno de los cuales contiene una etiqueta de secuencia única conocida como un código de barras. Después de un período de crecimiento, los constructos de RNAi pueden ser aislados y los shRNA que se perdieron del conjunto pueden ser identificados por secuenciación profunda de los constructos remanentes. Los shRNA perdidos están dirigidos al gen diana, que es esencial para la viabilidad en este tipo celular. Los constructos de shRNA que causan letalidad en células tumorales pero no en células normales sugieren que un gen es esencial para la supervivencia de una célula tumoral pero no para la de una célula normal. Por ejemplo, este enfoque ha sido usado para identificar genes que, cuando son inactivados, causan letalidad selectiva en las células cancerosas que contienen una forma oncogénica de *ras*, el oncogén *K-ras*. Se halló que los genes que codifican proteínas esenciales para la progresión mitótica como la ligasa de ubiquitina APC/C (véase Cap. 19) son letales sintéticos con el alelo *K-ras*. Estas proteínas podrían proveer dianas novedosas para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos para tumores que contienen formas oncogénicas de *ras*.

La visión para el futuro de la medicina es que la necesidad de radiación, quimioterapia, y quizá incluso de cirugía, sea sustancialmente reducida a fin de minimizar la toxicidad y el daño colateral. El mayor conocimiento de la biología celular molecular del cáncer permitirá la administración de fármacos más efectivos e inofensivos y, además, ajustados según las propiedades particulares de las células tumorales de un individuo. En el cáncer de mama y de pulmón, ya se observa que el tratamiento contra el tumor progresa en esta dirección.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 24.3

Cáncer y alteración de las vías reguladoras del crecimiento

- Los ratones en los cuales los oncogenes y los genes supresores de tumores pueden ser expresados en forma específica o temporal de un tejido nos enseñan sobre cómo surgen los cánceres y cómo contribuyen a la progresión de la enfermedad.
- Las mutaciones o translocaciones cromosómicas que permiten que los RTK para factores de crecimiento formen dímeros en ausencia de sus ligandos normales llevan a una actividad del receptor constitutiva (véase Fig. 24-17). En última instancia, tal activación induce cambios en la expresión génica que pueden transformar a las células. La sobreproducción de receptores de factores de crecimiento puede tener el mismo efecto y dar lugar a una proliferación celular anormal.
- Ciertas proteínas codificadas por virus pueden unirse y activar receptores de factores de crecimiento de la célula huésped, y estimular de este modo la proliferación celular en ausencia de señales normales.
- La mayoría de las células tumorales producen formas constitutivamente activas de una o más proteínas intracelulares de transducción de la señal, lo que causa una señalización que promueve el crecimiento en ausencia de factores de crecimiento normales.
- Una sola mutación puntual en Ras, una proteína clave de transducción en muchas vías de señalización que promueve la proliferación y diferenciación celular, reduce su actividad GTPasa y de este modo la mantiene en un estado activado.
- La actividad de Src, una proteína tirosinasa citosólica de transducción de la señal, normalmente está regulada por fosforilación y desfosforilación reversible de un residuo de tirosina cercano al extremo C-terminal (véase Fig. 24-19). La actividad no regulada de las oncoproteínas Src que carecen de esta tirosina promueve la proliferación anormal de muchas células.
- El cromosoma Filadelfia resulta a partir de una translocación cromosómica que produce el oncogén quimérico *bcr-abl*. La actividad cinasa no regulada de Abl de la oncoproteína Bcr-Abl es responsable de su efecto oncogénico. Un inhibidor de la cinasa Abl (imatinib, o Gleevec®) es efectivo en el tratamiento de la leucemia mielógena crónica y podría funcionar contra algunos otros cánceres que son impulsados por cinasas relacionadas (véase Fig. 24-20).
- La producción inapropiada de factores de transcripción nucleares como Fos, Jun y Myc puede inducir la transformación. En las células del linfoma de Burkitt, *c-myc* se transloca cerca de un gen de anticuerpo, y esto da lugar a la sobreproducción de c-Myc (véase Fig. 24-22).
- Muchos genes que regulan los procesos normales del desarrollo codifican proteínas que funcionan en varias vías de señalización. Sus funciones normales en la regulación de dónde y cuándo ocurre el crecimiento se reflejan en el carácter de los tumores que se originan cuando los genes están mutados.
- La pérdida de la señalización por TGF- β , un regulador negativo del crecimiento, promueve la proliferación celular y el desarrollo de la malignidad (véase Fig. 24-23).

- El análisis molecular preciso de tumores tempranos está permitiendo el uso de tratamientos con fármacos muy específicos que probablemente sean óptimos para un caso particular de un tumor particular. Estos refinamientos han permitido una reducción sustancial en la mortalidad por cáncer de mama. Hay buenas perspectivas para tratamientos aún más específicos basados en el continuo aumento en la comprensión de la regulación de las células tumorales.

- La llegada de técnicas moleculares para la caracterización de tumores individuales está permitiendo que se apliquen fármacos y tratamiento con anticuerpos que tienen como diana las propiedades de un tumor en particular. Esto permite un tratamiento más efectivo de pacientes individuales y reduce el uso de fármacos o anticuerpos que serán inefectivos y posiblemente tóxicos.

- Las metodologías novedosas de detección sistemática por shRNA permiten la identificación de genes específicamente requeridos para la supervivencia de las células cancerosas, lo que facilita de este modo el descubrimiento de nuevas dianas terapéuticas.

24.4 Cáncer y mutación de los reguladores de la división celular y los puntos de control

Los complejos mecanismos que regulan el ciclo celular eucariótico son las principales dianas de las mutaciones oncogénicas. Tanto las proteínas que actúan positivamente como las que lo hacen de manera negativa controlan en forma precisa la entrada de las células y su progresión a través de ciclo celular, el cual consta de cuatro fases principales: G_1 , S, G_2 y mitosis (véase Fig. 19-30). Además, las células contienen mecanismos de supervisión (conocidos como vías de los puntos de control) que aseguran que las células no entren en la siguiente fase del ciclo celular antes de que la previa haya sido completada. Por ejemplo, las células que tienen un daño sostenido en su DNA normalmente son detenidas antes de que su DNA sea replicado o en G_2 antes de la segregación cromosómica. Esta detención proporciona tiempo para que el daño en el DNA sea reparado; de manera alternativa, las células detenidas son dirigidas a "suicidarse" por medio de una muerte celular programada o, al menos, a no dividirse. El control de todo el ciclo celular y los sistemas de puntos de control funcionan para prevenir que las células se vuelvan cancerosas. Como podría esperarse, las mutaciones en este sistema a menudo conducen a un desarrollo anormal o contribuyen al cáncer.

En esta sección analizaremos el ciclo celular y las vías de los puntos de control afectadas en el cáncer. Primero describiremos cómo la vía que controla la entrada en el ciclo celular está mutada y su regulación alterada en la mayoría de los cánceres humanos. Luego estudiaremos cómo p53 impide la tumorigénesis ayudando a las células a responder al daño en el DNA. A continuación, describiremos cómo las mutaciones en las vías de la muerte celular programada contribuyen a la tumorigénesis y finalizaremos con un debate sobre un grupo emergente de oncogenes importantes y genes supresores de tumores: los micro-RNA.

Las mutaciones que promueven el paso no regulado de la fase G_1 a la S son oncogénicas

Una vez que una célula progresa pasado cierto punto en la fase G_1 tardía, llamado START, se compromete irreversiblemente a entrar en la

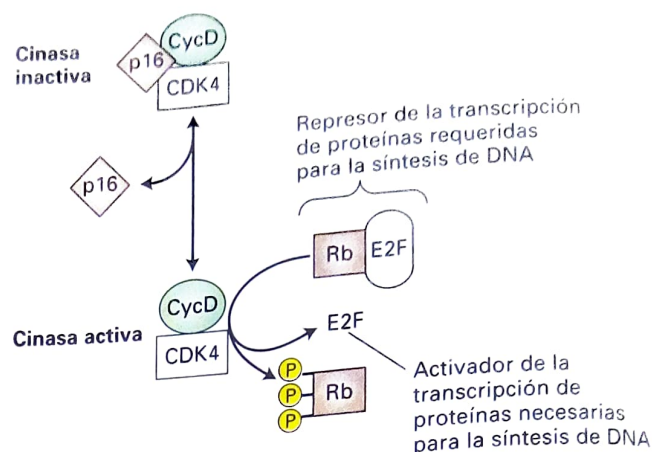


FIGURA 24-24 Control START. La proteína Rb no fosforilada se une a factores de transcripción llamados colectivamente E2F y de este modo previene la activación transcripcional mediada por E2F de muchos genes cuyos productos son requeridos para la síntesis de DNA (p. ej., DNA polimerasa). La actividad de la cinasa de la ciclina D-CDK4/6 fosforila a Rb, e inactiva así a Rb y activa a E2F; la actividad de la cinasa de la ciclina D-CDK4/6 es inhibida por p16. La sobreproducción de ciclina D, un regulador positivo, o la pérdida de los reguladores negativos p16 y Rb comúnmente ocurre en los cánceres humanos.

fase S y replicar su DNA (véase Fig. 19-15). Las **ciclinas** tipo D, **quinasas dependientes de ciclinas** (CDK), y la proteína Rb son todos elementos del sistema de control que regulan el paso a través de START.

La vía que controla la entrada en el ciclo celular es estimulada a ser mal regulada en aproximadamente el 80% de los cánceres humanos. En el corazón de esta vía están los complejos ciclina D-CDK4/6 y el inhibidor de la transcripción Rb (Fig. 24-24). La expresión de los genes de ciclina tipo D es inducida por muchos factores de crecimiento extracelulares, o **mitógenos**. Estas ciclinas se ensamblan con sus compañeros CDK4 o CDK6 para generar complejos ciclina-CDK catalíticamente activos, cuya actividad cinasa promueve la progresión a través de G_1 . La eliminación de los mitógenos previa al paso a través de START conduce a la acumulación de p15 o p16. Como se ha descrito en el Capítulo 19, p15 y p16 son inhibidores de CDK que se unen a los complejos de ciclina D-CDK4/6 e inhiben su actividad, lo que de este modo causa la detención en G_1 . El inhibidor de la transcripción Rb está controlado por fosforilación de ciclina D-CDK4/6. Rb no fosforilado se une a los factores de transcripción E2F en el citoplasma y los secuestra. Los factores de transcripción E2F estimulan la transcripción de genes que codifican proteínas requeridas para la síntesis de DNA. En circunstancias normales, la fosforilación de la proteína Rb es iniciada a medio camino a través de G_1 por complejos activos ciclina D-CDK4/6. La fosforilación de Rb se completa por complejos ciclina E-CDK2 en la fase G_1 tardía, lo que permite la liberación y la activación de los factores de transcripción E2F y la progresión G-S. La fosforilación completa de Rb y su disociación de E2F compromete irreversiblemente a la célula a la síntesis de DNA.

La mayoría de los tumores contienen una mutación oncogénica que causa la sobreproducción o pérdida de uno de los componentes de la vía que controla la entrada a la fase S de manera tal que las células son propulsadas a dicha fase en ausencia de las señales extracelulares de crecimiento apropiadas. Por ejemplo, niveles elevados de ciclina D1,

una de las tres ciclinas tipo D, se encuentran en muchos cánceres humanos. En ciertos tumores de linfocitos B que producen anticuerpos, el gen de *ciclina D1* es translocado de manera tal que su transcripción esté bajo el control del amplificador de un gen que codifica anticuerpos, lo que causa la producción elevada de ciclina D1 a través del ciclo celular independientemente de las señales extracelulares (este fenómeno es análogo a la translocación de *c-myc* en las células del linfoma de Burkitt estudiado previamente). El funcionamiento de la ciclina D1 como una oncoproteína fue demostrado mediante estudios con ratones transgénicos en los cuales el gen de la *ciclina D1* se colocó bajo el control de un amplificador específico para las células de los conductos mamarios. En un inicio, las células de los conductos experimentaron una hiperproliferación y, eventualmente, se desarrollaron tumores de mama en estos ratones transgénicos. La amplificación del gen de la *ciclina D1* y la sobreproducción concomitante de la proteína ciclina D1 es común en el cáncer de mama humano; la ciclina D1 extra ayuda a dirigir las células a través del ciclo celular.

Ya hemos visto que las mutaciones inactivantes en ambos alelos *RB* conducen a retinoblastoma infantil, un tipo de cáncer relativamente raro. Sin embargo, la pérdida de la función del gen *RB* también se encuentra en cánceres más comunes que surgen más tarde en la vida (p. ej., carcinomas de pulmón, mama y vejiga). Estos tejidos, a diferencia del tejido retinal, más probablemente producen otras proteínas (p. ej., p107 y p130, ambas relacionadas estructuralmente con Rb) cuya función es redundante con la de Rb, y así la pérdida de Rb no es tan crítica para el desarrollo de cáncer en estos tejidos. En la retina, sin embargo, la regulación de la entrada en el ciclo celular parece recaer con exclusividad en la proteína Rb, motivo por el cual los pacientes heterocigotos para el gen *Rb* primero desarrollan tumores en este tejido. Además de las mutaciones inactivantes, la función de Rb puede ser eliminada por la unión de una proteína inhibidora, designada E7, que es codificada por el virus del papiloma humano (HPV), otro truco viral para crear tejido productor de virus. En la actualidad, se sabe que este ocurre solo en el cáncer de cuello uterino.

Las proteínas que funcionan como inhibidores de ciclina-CDK tienen una función importante en la regulación del ciclo celular. En particular, las mutaciones de pérdida de función que impiden que p16 inhiba la actividad cinasa de ciclina D-CDK4/6 son comunes en varios cánceres humanos. Como la **Figura 24-24** deja en claro, la pérdida de p16 imita la sobreproducción de ciclina D1. Así, p16 normalmente actúa como un supresor de tumores. Aunque el gen supresor de tumores *p16* está eliminado en algunos cánceres humanos, en otros la secuencia *p16* es normal. En algunos de estos últimos tipos de cáncer (p. ej., cáncer de pulmón) el gen *p16*, o los genes que codifican otras proteínas relacionadas funcionalmente, es inactivado por hipermetilación de su región promotora, lo cual impide la transcripción. No se sabe qué es lo que promueve este cambio en la metilación de *p16*, pero impide la producción de esta importante proteína de control del ciclo celular.

El locus que codifica p16 es altamente inusual, ya que codifica no menos de tres genes supresores de tumores, lo cual lo torna el locus más vulnerable en el genoma humano. Además de albergar el gen que codifica p16, *INK4a*, inmediatamente corriente arriba está el locus *INK4b*, el cual codifica p15, otro inhibidor de ciclina D-CDK4/6 (**Fig. 24-25**). El locus codifica un activador clave del supresor de tumores p53 así como estos inhibidores de CDK. El supresor de tumores p53 así como estos inhibidores de CDK. El p14ARF (p19ARF en el ratón) es codificado por un exón corriente arriba del primer exón de *INK4a* y comparte el exón 2 y el exón 3 con *INK4a*. Como veremos en la siguiente sección, esta proteína

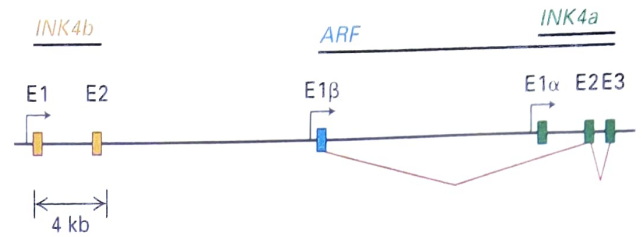


FIGURA 24-25 El locus *INK4b-ARF-INK4a*. Este locus codifica tres genes supresores de tumores. Los exones son designados como E. Los dos exones *INK4b* (naranja) están ubicados corriente arriba del locus *ARF/INK4a*. *ARF* (azul) está codificado por un exón *E1β* único pero comparte los exones *E2* y *E3* con *INK4a* (verde). *INK4b* e *INK4a* codifican p15 y p16, respectivamente. *ARF* codifica un activador de p53. (Adaptado de Sherr, 2006, *Nat. Rev. Cancer* 6:663-673.)

controla la estabilidad de p53. De este modo, las mutaciones en este locus afectarían simultáneamente las dos vías supresoras de tumores principales en la célula, las vías de Rb y de p53.

La pérdida de p53 suprime el punto de control de daño en el DNA

El p53 tiene un papel central en la tumorigénesis. Se cree que la mayoría, si no todos los tumores humanos, tiene mutaciones en el mismo p53 o en proteínas que regulan la actividad de p53. Las células con p53 funcional se detienen en G₁ cuando son expuestas a radiación que daña el DNA, mientras que las células que carecen de p53 funcional no lo hacen. A diferencia de otras proteínas del ciclo celular, p53 está presente en niveles muy bajos en las células normales debido a que es muy inestable y rápidamente degradado. Los ratones que carecen de p53 son en gran medida viables y saludables, excepto por una predisposición a desarrollar múltiples tipos de tumores.

En ratones normales, la cantidad de proteína p53 se intensifica, una respuesta postranscripcional, solo en situaciones estresantes como radiación ultravioleta o γ, calor y oxígeno bajo. La radiación por rayos γ crea lesiones en el DNA. Las serina-cinasas ATM y/o ATR son reclutadas a estos sitios de daño y luego activadas. Después fosforilan a p53 en un residuo de serina en el extremo N-terminal de la proteína. Esto causa que la proteína evada la degradación mediada por ubiquitina, lo que lleva a un incremento marcado en su concentración (**Fig. 24-26**). El p53 estabilizado activa la transcripción del gen que codifica p21^{CIP}, el cual se une e inhibe a la ciclina E-CDK2 de mamífero y a una variedad de otros genes. Como resultado, las células con DNA dañado están detenidas en G₁, y esto proporciona tiempo para la reparación del DNA por mecanismos estudiados en el **Capítulo 4**, o las células se detienen permanentemente, es decir, se vuelven senescentes. La actividad de p53 no está limitada a inducir la detención del ciclo celular. Adicionalmente, este supresor de tumores de propósitos múltiples estimula la producción de proteínas proapoptóticas (véase la siguiente sección) y enzimas de reparación del DNA (véase **Fig. 24-26**). De hecho, la senescencia y la apoptosis podrían ser los medios más importantes a través de los cuales p53 previene el crecimiento tumoral.

Por lo general, la actividad de p53 se mantiene baja por una proteína llamada *Mdm2*. Cuando *Mdm2* se une a p53, inhibe la habilidad de activación de la transcripción de p53 y al mismo tiempo, debido a que tiene actividad ligasa de ubiquitina E3, cataliza la ubiquitinación de p53, y de esta manera dispara la degradación proteosómica

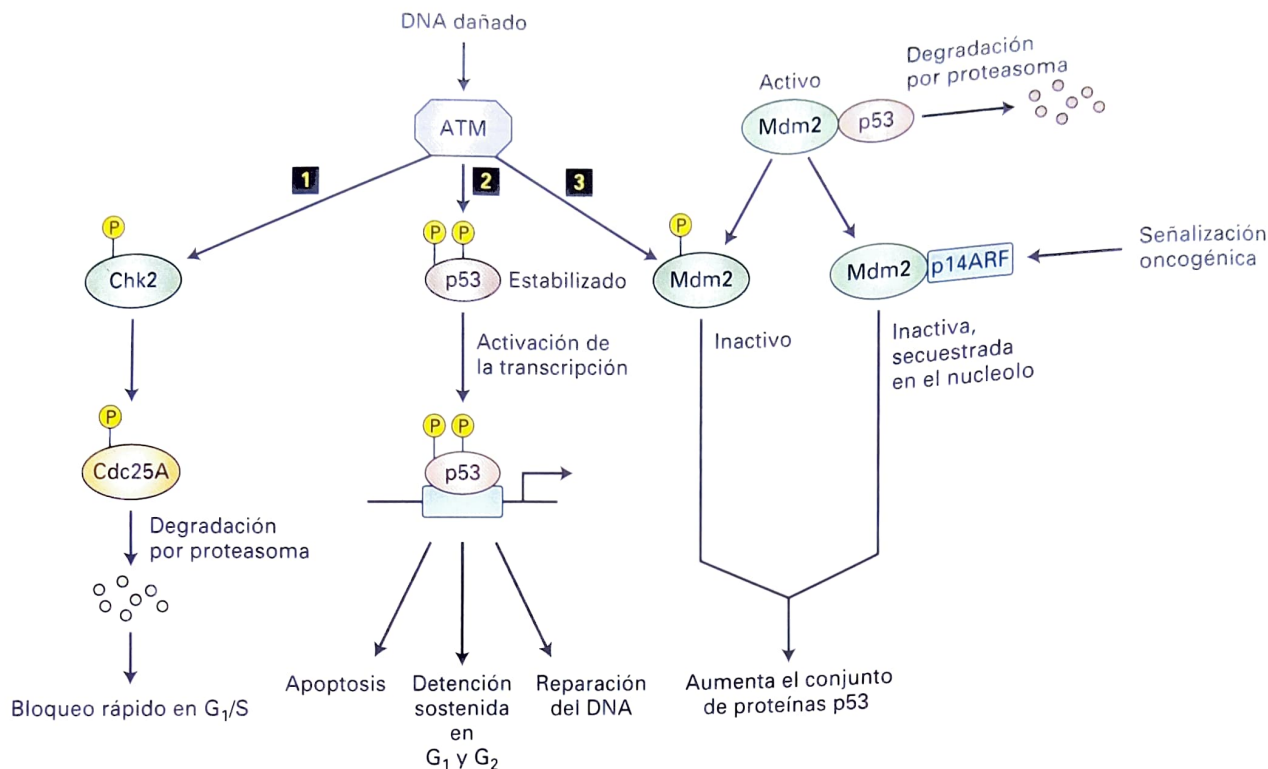


FIGURA 24-26 Detención en G₁ en respuesta a daño en el DNA. La actividad cinasa de ATM es activada en respuesta a daño en el DNA debido a varias situaciones de estrés (p. ej., radiación UV, calor). Luego, ATM activada dispara tres vías que conducen a la detención en G₁: **(1)** Chk2 es fosforilada y, a su vez, fosforila a Cdc25A, y la marca así para la degradación y bloquea su función en la activación de CDK2. **(2)** En una segunda vía, la fosforilación de p53 lo estabiliza, lo que permite la expresión activada por p53 de genes que codifican proteínas que causan la detención en G₁, promueven apoptosis o participan en la reparación del DNA. **(3)** La tercera vía es otra manera de controlar el conjunto de p53. La proteína Mdm2 en su forma activa puede formar un complejo con p53 e inhibir el factor de transcripción y causar la

ubiquitinación de p53 y la subsiguiente degradación por el proteasoma. ATM fosforila Mdm2 para inactivarlo, lo que causa una estabilización aumentada de p53. Además, los niveles de Mdm2 están controlados por p14ARF (p19ARF en ratones), el cual se une a Mdm2 y lo secuestra en el nucleolo, donde no puede acceder p53. El gen p14ARF es inducido por altos niveles de señalización mitogénica que es frecuentemente observada en células que portan mutaciones oncogénicas en las vías de señalización de factores de crecimiento. El gen *Mdm2* humano está frecuentemente amplificado en sarcomas, lo cual se presume causa la inactivación excesiva de p53. De manera similar, p14ARF también se halla mutado en algunos cánceres.

de p53. La fosforilación de p53 por ATM o ATR desplaza a Mdm2 unido de p53, y así lo estabiliza. Debido a que el gen *Mdm2* es en sí mismo activado transcripcionalmente por p53, Mdm2 funciona en un circuito de retroalimentación autorregulador con p53, quizá previniendo el exceso de la función de p53. El gen *Mdm2* está amplificado en muchos sarcomas y otros tumores humanos que contienen un gen *p53* normal. Incluso a pesar de que p53 normal es producido por dichas células tumorales, los niveles elevados de Mdm2 reducen la concentración de p53 lo suficiente como para suprimir la detención en G₁ inducida por p53 en respuesta a radiación. Un regulador clave de la ligasa de ubiquitina Mdm2 es la proteína p14ARF (p19 en el ratón), codificada por el locus supresor de tumores múltiple que también codifica las proteínas INK4. El p14ARF se une a Mdm2 en el nucleolo y la secuestra (de esta manera, causa la estabilización de p53). Los niveles normales de p14ARF son tan bajos en los tejidos que la proteína es apenas detectable. Esto es bueno porque, de otro modo, ocasionaría la acumulación de p53 y la consiguiente detención del ciclo celular o la apoptosis. Sin embargo, en respuesta a la señalización oncogénica, es decir, en presencia de altos niveles de señales mitogénicas, la transcripción de p14ARF es inducida por el factor de transcripción E2F (véase Fig. 24-26). Así, ARF es un inhibi-

dor importante de la tumorigénesis puesto que induce la activación de p53, cuando la señalización mitogénica alcanza niveles altos no fisiológicos, por medio de mutaciones hiperactivadoras en las vías de señalización. Por esa razón, por la cual las vías de señalización mitogénica causan proliferación incontrolada como se observa en el cáncer, esta regulación por exceso de p53 no debe ocurrir. Por lo tanto, no es sorprendente que p53 esté inactivo en la mayoría de los tumores humanos, ya sea a través de la pérdida de la función de p53 en sí mismo o mediante la regulación por defecto de reguladores positivos de la función de p53 como p14ARF o la regulación por exceso de reguladores negativos de p53 como Mdm2.

La actividad de p53 también es inhibida por una proteína del virus del papiloma humano (HPV) llamada E6. El HPV codifica tres proteínas que contribuyen a su habilidad de inducir una transformación estable y la mitosis en una variedad de células en cultivo. Dos de estas (E6 y E7) se unen a los supresores de tumores p53 y Rb, respectivamente, y los inhiben. Actuando en conjunto, E6 y E7 son suficientes para inducir la transformación en ausencia de mutaciones en proteínas reguladoras de la célula. Recordemos que la proteína E5 del HPV, la cual causa activación sostenida del receptor de PDGF, potencia la proliferación de las células transformadas.

La forma activa de p53 es un tetrámero de cuatro subunidades idénticas. Una mutación puntual de cambio de sentido en uno de los dos alelos de p53 en una célula puede suprimir casi toda la actividad de p53 debido a que virtualmente todos los oligómeros contendrán al menos una subunidad defectuosa, y dichos oligómeros tienen una habilidad reducida para activar la transcripción. Por lo tanto, las mutaciones oncogénicas en p53 actúan como **dominantes negativos**, con mutaciones en un solo alelo que causan una pérdida de la función. La pérdida de función es incompleta, de manera que para crecer más rápidamente, las células tumorales a veces pierden el alelo funcional remanente (pérdida de la heterocigosidad). Como hemos aprendido en el **Capítulo 5**, las mutaciones dominantes negativas pueden ocurrir en proteínas cuyas formas activas son multiméricas o cuya función depende de las interacciones con otras proteínas. En contraste, las mutaciones de pérdida de función en otros genes supresores de tumores (p. ej., *RB*) son recesivas debido a que las proteínas codificadas funcionan como monómeros y la mutación de un solo alelo tiene pocas consecuencias funcionales.

La proteína p53 es un mecanismo de defensa clave contra la transformación cancerosa. Esto se ilustra mejor por la alta frecuencia de pérdida de función de p53 en cánceres humanos. Las mutaciones de pérdida de función en el gen p53 ocurren en más del 50% de los cánceres humanos. ¿Contra qué nos protege? A diferencia de *Rb*, el cual previene la proliferación inapropiada, p53 protege a la célula de cambios genéticos. Cuando el punto de control en G₁ de p53 no opera correctamente, el DNA dañado puede replicarse y perpetuar las mutaciones y los reordenamientos de DNA que son transmitidos a las células hijas, lo que contribuye a la probabilidad de transformación a células metastásicas. Al mismo tiempo, la apoptosis es inhibida y esto contribuye a la evolución de las células transformadas. Debido a su función central en la prevención de la tumorigénesis, los investigadores están buscando intensamente compuestos que puedan restaurar la función de p53 como una nueva manera de tratar un amplio espectro de tumores humanos.

Los genes apoptóticos pueden funcionar como protooncogenes de genes supresores de tumores

Durante el desarrollo normal muchas células son designadas para la **muerte celular programada**, también conocida como apoptosis (véase **Cap. 21**). Muchas anomalías, incluyendo errores en la mitosis, daño en el DNA y un exceso anormal de células que no se necesitan para el desarrollo de un órgano funcional, pueden disparar la apoptosis. En algunos casos, la muerte celular pareciera ser la situación por defecto, con señales requeridas para asegurar la supervivencia celular. Las células pueden recibir instrucciones de vivir e instrucciones de morir, y un sistema regulador complejo integra los diversos tipos de información.

Si las células no mueren cuando deberían y en cambio continúan proliferando, podría formarse un tumor. Por ejemplo, la leucemia linfoblástica crónica ocurre debido a que las células sobreviven cuando deberían estar muriendo. Las células se acumulan con lentitud, y la mayoría no está dividiéndose activamente, pero no mueren. Las células de la leucemia linfoblástica crónica tienen translocaciones cromosómicas que activan un gen llamado *bcl-2*, que ahora sabemos es un bloqueador crítico de la apoptosis (véase **Fig. 21-37**). La sobreproducción inapropiada resultante de la proteína Bcl-2 impide la apoptosis normal y permite la supervivencia de estas células tumorales. Por lo tanto, los tumores de la leucemia linfoblástica crónica son atribuibles a fallas en la muerte celular. Otra docena de protooncogenes que nor-

malmente están involucrados en la regulación negativa de la apoptosis han sido mutados para volverse oncogenes. La sobreproducción de sus proteínas codificadas previene la apoptosis incluso cuando es necesaria para detener el crecimiento de las células cancerosas.

De manera inversa, los genes cuyos productos proteicos estimulan la apoptosis se comportan como supresores de tumores. Un ejemplo es el gen PTEN estudiado en el **Capítulo 16**. La fosfatasa codificada por este gen desfosforila el fosfatidilinositol 2,4,5-trifosfato, un mensajero secundario que funciona en la activación de Akt (véase **Fig. 16-26**). Las células que carecen de la fosfatasa PTEN tienen niveles elevados de fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato y Akt activa, la cual promueve la supervivencia de la célula, el crecimiento y la proliferación e impide la apoptosis por varias vías. De esta manera, PTEN actúa como un supresor proapoptótico de tumores al disminuir los efectos antiapoptóticos que promueven la proliferación de Akt.

El gen supresor de tumores proapoptótico más común implicado en cánceres humanos es p53. Entre los genes activados por p53, están varias proteínas codificantes proapoptóticas como Bax (véase **Fig. 21-38**). Cuando la mayoría de las células sufre daño extenso en el DNA u otras situaciones de estrés como hipoxia, la expresión inducida por p53 de proteínas proapoptóticas lleva a su rápida desaparición (véase **Fig. 24-26**). Mientras esto puede parecer una respuesta drástica frente al daño en el DNA, previene la proliferación de células propensas a acumular mutaciones múltiples. Cuando la función de p53 se pierde, la apoptosis no puede ser inducida y la acumulación de mutaciones requerida para que el cáncer se desarrolle se vuelve más probable.

Los micro-RNA son una nueva clase de factores oncogénicos

En los últimos años, se ha vuelto claro que los RNA no codificantes, en especial los micro-RNA (miRNA), cumplen una función crítica en la tumorigénesis. Típicamente, la generación de miRNA involucra la transcripción de un RNA precursor que, a través de una cantidad de pasos de procesamiento, es recortado a miRNA maduro de 20-22 nucleótidos de longitud. Por lo general, los micro-RNA maduros se unen en la región 3' no codificada (UTR, *untranslated region*) de su RNA diana e inhiben su traducción o, a veces, causan la degradación del mRNA diana. Hasta la fecha, aproximadamente 750 miRNA han sido identificados en seres humanos y han sido implicados en la regulación del 30% de los mRNA de la célula, con funciones fundamentales en la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis. Se ha demostrado que varios de ellos también funcionan como genes supresores de tumores u oncogenes.

La primera función de los miRNA en la tumorigénesis fue revelada mediante el análisis de la región cromosómica 13q14.3. Esta región genómica se halla eliminada en la mayoría de los casos de leucemia linfocítica crónica, la leucemia más común en seres humanos. La caracterización de la enfermedad que ocasiona la delección demostró que dos micro-RNA, miR-15-a y miR-16-1, causan la leucemia linfocítica crónica. Los ratones mutantes para ambos micro-RNA desarrollan leucemia linfocítica crónica o la leucemia linfocítica celular relacionada. Los dos micro-RNA parecen controlar los genes de proliferación celular. En su ausencia, la proliferación de las células B es mayor. La familia let7 de miRNA también ha sido implicada en la tumorigénesis. Los miRNA de Let-7 regulan por defecto la traducción de Ras. De esta manera, en ausencia de miRNA, Ras se produce en exceso constitutivamente, y esto contribuye a la tumorigénesis. Los miRNA de Let-7 también tienen

otras dianas en la célula, y generalmente se cree que cada micro-RNA tiene múltiples dianas, lo que provee una amplia oportunidad de contribuir a la tumorigénesis.

Debido a su función en inhibir la traducción, los miRNA pueden funcionar como genes supresores de tumores, como así también oncogenes. Los miR-15-a y miR-16-1 actúan como genes supresores de tumores; normalmente, ellos inhiben la proliferación celular, y su ausencia lleva a crecimiento celular. Sin embargo, se halló que algunos miRNA también se sobreexpresan en cáncer, y su análisis indica que funcionan como oncogenes. La sobreexpresión de miR-155 se halla en muchos cánceres y causa la expansión de células B grandes. El miR-21 es de un interés particular. Este micro-RNA es sobreexpresado en la mayoría de los tumores sólidos, incluyendo el glioblastoma, los tumores de mama, de pulmón, pancreáticos y de colon, y tiene como diana varios genes supresores de tumores, entre ellos la fosfatasa PTEN. Queda mucho por aprender acerca de cómo los micro-RNA contribuyen a la tumorigénesis, pero está claro que, por medio de su habilidad de regular muchos genes diferentes, pueden impactar en la progresión de la enfermedad en más de una forma.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 24.4

Cáncer y mutación de los reguladores de la división celular y los puntos de control

- La sobreexpresión del protooncogén que codifica ciclina D1 o la pérdida de los genes supresores de tumores que codifican p16 y Rb pueden causar un paso inadecuado y no regulado a través de STAR en la G₁ tardía. Tales anomalías son vistas en el 80% de los tumores humanos.
- El locus INK4-ARF representa el principal locus supresor de tumores en humanos, y controla ambas vías de Rb y de p53 (véase Fig. 24-25).
- La proteína p53 es un supresor de tumores multifuncional que promueve la detención en G₁ y G₂, la apoptosis y la reparación del DNA en respuesta a DNA dañado (véase Fig. 24-26).
- Las mutaciones de pérdida de función en el gen p53 ocurren en más del 50% de los cánceres humanos. La sobreproducción de Mdm2, una proteína que normalmente inhibe la actividad de p53, ocurre en varios cánceres (p. ej., sarcomas) que expresan la proteína p53 normal. Así, de una forma u otra, la vía de respuesta a estrés de p53 es inactivada para permitir el crecimiento tumoral.
- El virus del papiloma humano (HPV) codifica tres proteínas oncogénicas: E6 (inhibe a p53), E7 (inhibe a Rb) y E5 (activa el receptor de PDGF).
- La sobreproducción de proteínas antiapoptóticas (p. ej., Bcl-2) puede conducir a una supervivencia celular inapropiada y está asociada con la leucemia linfoblástica crónica y otros cánceres. La pérdida de las proteínas que promueven la apoptosis (p. ej., el factor de transcripción p53 y la fosfatasa PTEN) tienen un efecto oncogénico similar.
- Los micro-RNAs han sido implicados en la progresión de la enfermedad en muchos tipos diferentes de cáncer. Pueden funcionar como supresores de tumores o como oncogenes.

24.5 Carcinógenos y genes cuidadores en cáncer

Los carcinógenos, los cuales pueden ser naturales o hechos por el hombre, son químicos que causan cáncer. Provocan mutaciones que reducen la función de los genes supresores de tumores, crean oncogenes a partir de protooncogenes o dañan los sistemas de reparación del DNA. Como ya ha mostrado nuestro análisis previo, las alteraciones en el DNA que llevan al mal funcionamiento de las proteínas supresoras de tumores y oncoproteínas son la causa subyacente de la mayoría de los cánceres. Estas mutaciones oncogénicas en genes clave reguladores del crecimiento y del ciclo celular incluyen inserciones, deleciones y sustituciones de bases, así como amplificaciones cromosómicas y translocaciones. Además, el daño en los genes cuidadores que comprenden los sistemas de reparación del DNA (véase Cap. 4) lleva a un aumento en la tasa de mutación. De las muchas mutaciones que se acumulan, algunas afectan a los reguladores del ciclo celular, y las células que las portan podrían volverse cancerosas. Además, algunos de los mecanismos de reparación en sí mismos son propensos a errores (véase Fig. 4-40). Esas “reparaciones” también contribuyen a la oncogénesis. La incapacidad de las células tumorales de mantener la integridad del genoma conduce a la formación de una población heterogénea de células malignas. Por esta razón, la quimioterapia dirigida hacia un solo gen o incluso hacia un grupo de genes probablemente sea ineficaz para aniquilar todas las células malignas. Este problema se suma al interés en terapias que interfieran con el suministro de sangre a los tumores, que tengan como diana células aneuploides o que de otras formas actúen en múltiples tipos de células tumorales.

En general, las células normales en división utilizan varios mecanismos para prevenir la acumulación de mutaciones perjudiciales que puedan conducir al cáncer. Una forma de protección contra las mutaciones de las células madre es su velocidad de división relativamente baja, la cual reduce la posibilidad de daño en el DNA incurrido durante la replicación del DNA y la mitosis. Además, la progenie de células madre no tiene la capacidad de dividirse indefinidamente. Después de varias rondas de división salen del ciclo celular, lo que reduce la posibilidad de una regulación alterada de la división celular inducida por mutación asociada con tumores peligrosos. También, si se requieren múltiples mutaciones para que un tumor crezca, atraiga un suministro de sangre, invada tejidos vecinos y haga metástasis, una baja velocidad de replicación combinada con la tasa baja normal de mutaciones (10^{-9}) provee protección adicional contra el cáncer. Sin embargo, estos salvaguardias pueden ser superados si un mutágeno poderoso llega a las células o si la reparación del DNA está comprometida y la tasa de mutación aumenta. Cuando las células con propiedades de crecimiento similares a las de una célula madre son mutagenizadas por tóxicos del entorno y son incapaces de reparar eficazmente el daño, puede aparecer el cáncer.

En esta sección, exploramos las formas en las que varios carcinógenos actúan sobre el DNA para inducir cáncer; también, cómo las mutaciones en los genes cuidadores contribuyen al cáncer al comprometer la habilidad de la célula de reparar el daño en el DNA. Finalizamos el capítulo con un estudio de una enzima especial llamada telomerasa, otro guardián del genoma que protege contra el daño en el DNA, y su función en las células cancerosas.

Los carcinógenos inducen cáncer por daño al DNA

La habilidad de los carcinógenos químicos y físicos de inducir cáncer se debe al daño en el DNA que estos causan, así como a los errores

introducidos en el DNA durante los esfuerzos de la célula en reparar este daño. Así, los carcinógenos también son **mutágenos**. La evidencia más fuerte de que los carcinógenos actúan como mutágenos proviene de la observación de que el DNA celular alterado por la exposición de las células a carcinógenos puede cambiar a las células en cultivo, tal como las células 3T3, o las células implantadas en ratones en células de crecimiento rápido similares a las del cáncer (véase Fig. 24-4). El efecto mutagénico de los carcinógenos es apenas proporcional a su capacidad de transformar las células e inducir cáncer en modelos animales.

Aunque las sustancias identificadas como carcinógenos químicos tienen un amplio rango de estructuras sin características unificadoras obvias, pueden ser clasificadas en dos categorías generales. Los *carcinógenos de acción directa*, de los cuales solo hay unos pocos, son mayormente electrófilos reactivos (compuestos que buscan y reaccionan con centros ricos en electrones en otros compuestos). Reaccionando químicamente con átomos de nitrógeno y oxígeno en el DNA, estos compuestos pueden modificar las bases en el DNA de manera que distorsionan el patrón normal de apareamiento de las bases. Si estos nucleótidos modificados no son reparados, permiten que un nucleótido incorrecto sea incorporado durante la replicación. Este tipo de carcinógeno incluye el etilmetanosulfonato (EMS), el dimetilsulfato (DMS) y las mostazas nitrogenadas.

En contraste, los *carcinógenos de acción indirecta* por lo general no son reactivos, a menudo compuestos insolubles en agua que pueden actuar como potentes inductores del cáncer sólo después de la introducción de centros electrofílicos. En animales, las *enzimas del citocromo P-450* están ubicadas en el retículo endoplasmático de la mayoría de las células y alcanzan niveles especialmente altos en las células del hígado. En general, las enzimas P-450 funcionan para adicionar centros electrofílicos, como grupos OH, a químicos extraño no polares, como ciertos insecticidas y agentes terapéuticos, para solubilizarlo de manera que puedan ser excretados del cuerpo. Sin embargo, las enzimas P-450 también pueden convertir químicos inofensivos en carcinógenos. De hecho, la mayoría de los carcinógenos químicos tienen poco efecto mutagénico hasta que son modificados por enzimas celulares.

Algunos carcinógenos han sido vinculados con cánceres específicos

En los primeros días de la conciencia de cáncer, se hizo claro que al menos algunos se deben a tóxicos del entorno. Por ejemplo, en 1775 se informó que la exposición al hollín por deshollinar causaba cáncer de escroto, y en 1791 se dio a conocer que el uso de rapé (tabaco) estaba asociado con el cáncer nasal. Los químicos ambientales fueron originalmente asociados con el cáncer a través de estudios experimentales en animales. El experimento clásico consiste en pintar repetidas veces una sustancia de prueba en el lomo de un ratón y buscar el desarrollo de tanto tumores locales como sistémicos en el animal. Tales ensayos llevaron a la purificación de un carcinógeno químico puro de alquitrán de hulla en 1933, benzopireno. La función de la radiación en el daño de los cromosomas fue primero demostrada en la década de los años 1920 utilizando *Drosophila* irradiada con rayos X. Más tarde, la capacidad de la radiación de causar cáncer humano, en especial leucemia, fue dramáticamente demostrada por las tasas aumentadas de esta patología entre los sobrevivientes de las bombas atómicas arrojadas en la Segunda Guerra Mundial (radiación ionizante) y más recientemente, por el incremento en el melanoma (cáncer de piel) en individuos expuestos a demasiada luz solar (radiación UV).

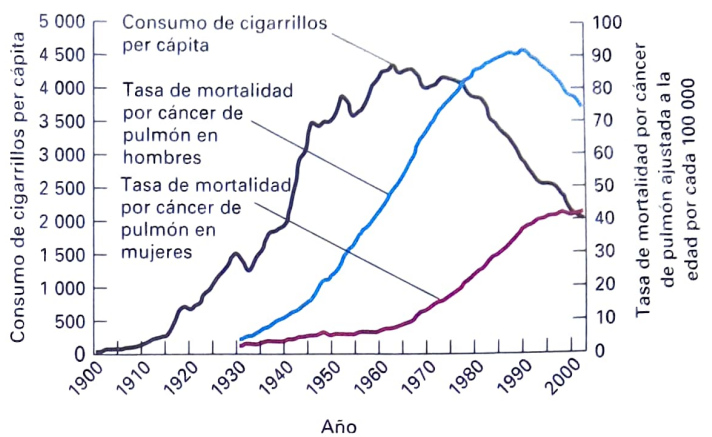


FIGURA 24-27 Carcinogénesis química por el humo del tabaco. El hábito de fumar cigarrillos proporciona un ejemplo claro de una forma mortal de carcinogénesis química. Las tasas de cáncer de pulmón siguen las tasas del tabaquismo, con aproximadamente 30 años de desfase. Las mujeres comenzaron a fumar en grandes cantidades a comienzos de la década de 1960, y a comienzos de la década de 1990, el cáncer de pulmón superó al cáncer de mama como la principal causa de muerte por cáncer en mujeres. Al mismo tiempo, un descenso gradual en las tasas de tabaquismo entre hombres a comienzos de la década de 1960 ha sido reflejado en un descenso en su tasa de cáncer de pulmón. (De la American Cancer Society.)

A pesar de que se cree que los carcinógenos químicos son factores de riesgo para muchos cánceres humanos, se ha establecido una vinculación directa con cánceres específicos solo en unos pocos casos, y los más importantes son el de pulmón y los otros cánceres (de laringe, faringe, estómago, hígado, páncreas, vejiga, cuello uterino, y más) asociados con el tabaquismo. Estudios epidemiológicos (Fig. 24-27) primero indicaron que fumar cigarrillos era la causa principal del cáncer de pulmón, pero la razón no estuvo clara hasta el descubrimiento de que cerca del 60% de los cánceres de pulmón humanos contienen mutaciones inactivantes en el gen *p53*. El químico *benzopireno*, que se halla en el humo de los cigarrillos así como en el alquitrán de hulla, sufre una activación metabólica en el pulmón (Fig. 24-28) a un potente mutágeno que principalmente causa la conversión de las bases guanina (G) a timina (T), una mutación de transversión. Cuando se aplica a células epiteliales bronquiales en cultivo, el benzopireno activado induce muchas mutaciones, incluyendo mutaciones inactivantes en los codones 175, 248 y 273 del gen *p53*. Estas mismas posiciones, todas dentro del dominio de unión al DNA de la proteína, son zonas calientes mutacionales centrales en el cáncer de pulmón humano. De hecho, la naturaleza de las mutaciones en *p53* (y en otros genes relacionados con el cáncer) proporciona pistas sobre el origen del cáncer. Por ejemplo, las transversiones de G a T causadas por el benzopireno están presentes en los genes *p53* de cerca de un tercio de los tumores de pulmón de los fumadores. Este tipo de mutación es relativamente raro entre las mutaciones en *p53* halladas en otros tipos de tumores. El carcinógeno deja su huella. De este modo, existe una fuerte correlación entre un carcinógeno químico definido en el humo del cigarrillo y el cáncer humano. Es probable que otros químicos en el humo del cigarrillo induzcan mutaciones en otros genes puesto que contiene más de

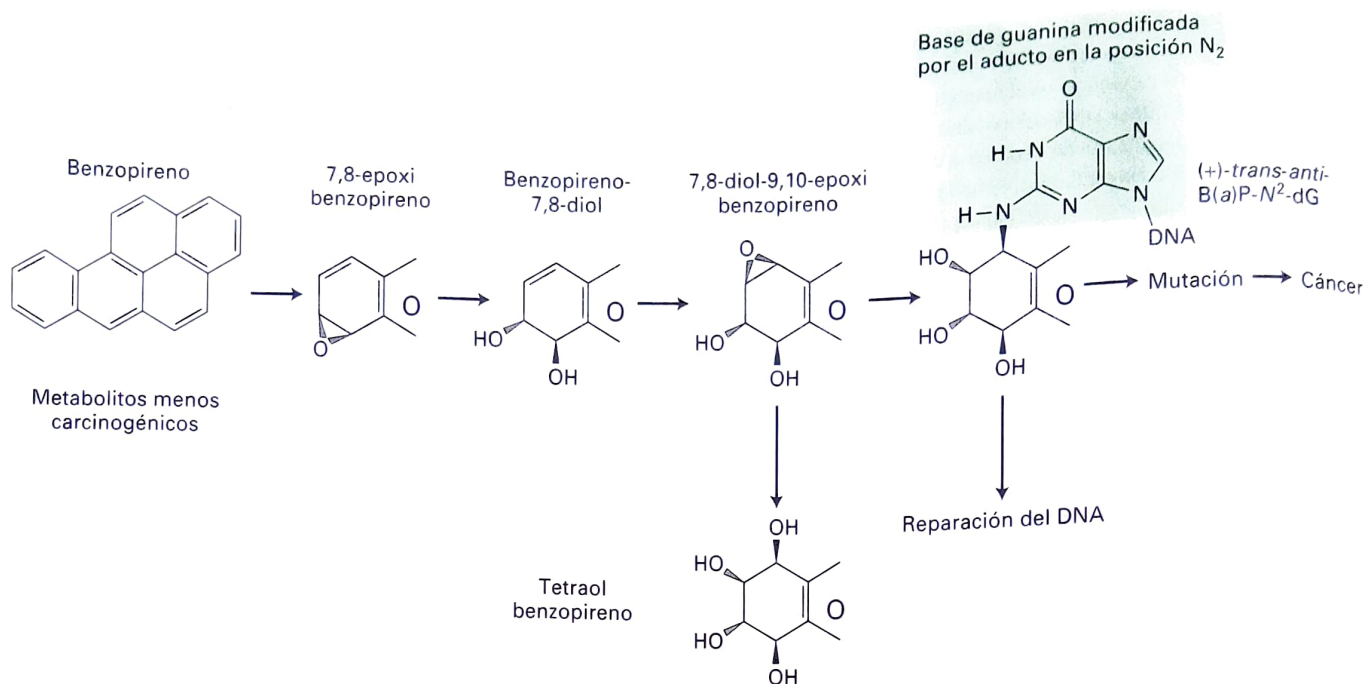


FIGURA 24-28 Procesamiento enzimático de benzopireno a un mutágeno y carcinógeno más potentes. Las enzimas hepáticas, particularmente las enzimas P-450, modifican el benzopireno en una serie de reacciones, lo que produce 7,8-diol-9,10-epóxido, una especie mutagénica altamente potente que reacciona con DNA primariamente en el átomo de N₂ de una base de guanina en el DNA. El aducto resultante, (+)-trans-anti-B(a)P-N²-dG, causa que la polimerasa inserte una A en vez de una C en el lado opuesto

a la base G modificada. La próxima vez que el DNA sea replicado, una T será insertada en el lado opuesto a la A, y la mutación estará completa. Las flechas horizontales indican alteraciones hacia una potencia mayor, mientras que las flechas verticales indican cambios en la dirección de una toxicidad reducida. El símbolo de la "O" grande representa el resto de la estructura de múltiples anillos mostrada en la molécula completa de benzopireno a la izquierda.

(Adaptado de E. L. Loechler, 2001, *Encyclopedia of Life Science*)

60 carcinógenos. De manera similar, la exposición a amiantos está claramente asociada con el mesotelioma, un tipo de cáncer epitelial.

El cáncer de pulmón no es el único cáncer humano principal para el cual un factor de riesgo claro ha sido identificado. La **aflatoxina**, un metabolito fúngico encontrado en granos enmohecidos, induce el cáncer de hígado (Fig. 24-29a). Después de la modificación química por enzimas del hígado, la aflatoxina se vincula con residuos G en el DNA e induce transversiones de G a T. La aflatoxina también causa una mutación en el gen *p53*. Por otra parte, cocinar carne a altas temperaturas causa reacciones químicas que forman **aminas heterocíclicas**, las cuales son mutágenos potentes y producen carcinomas de colon y de mama en modelos animales. Las aminas heterocíclicas reaccionan con las bases de desoxiguanosina para formar aductos mutagénicos (Fig. 24-29b). La exposición a otros químicos ha sido correlacionada con cánceres menores. Por lo general, falta una fuerte evidencia acerca de los factores de riesgo alimentarios y ambientales que nos pueda ayudar a evitar otros cánceres comunes (p. ej., cáncer de mama, de colon y de próstata y leucemias).

La pérdida de los sistemas de reparación del DNA puede producir cáncer

Incluso sin ningún carcinógeno externo o mutágeno, los procesos normales generan una gran cantidad de daño en el DNA. El daño se debe a reacciones de depuración, de alquilación y a la generación de especies reactivas como radicales del oxígeno, todos los cuales alteran el DNA. Ha sido estimado que, en cada célula, más de 20 000 alteraciones ocurren en el DNA cada día solo por las especies reactivas

del oxígeno y la despurinación. De este modo, la reparación del DNA es un sistema de defensa crucial.

La función normal de los genes cuidadores es prevenir o reparar el daño en el DNA. La pérdida de los sistemas de reparación del DNA de alta fidelidad que son descritos en el Capítulo 4 se correlaciona con el riesgo incrementado de cáncer. Por ejemplo, los seres humanos que heredan mutaciones en los genes que codifican una proteína crucial de reparación de un apareamiento erróneo o una de reparación de una escisión tienen una probabilidad enormemente aumentada de desarrollar ciertos cánceres (Cuadro 24-2). Sin una reparación del DNA apropiada, las personas con xeroderma pigmentosum o cáncer colorrectal no hereditario no polipósico (también conocido como síndrome de Lynch) son propensos a acumular mutaciones en muchos otros genes, incluyendo aquellos que son críticos en el control del crecimiento de la célula y la proliferación. El xeroderma pigmentosum causa que las personas afectadas desarrollen cáncer de piel con una frecuencia 1 000 veces mayor de lo normal. Siete de los 8 genes de xeroderma pigmentosum conocidos codifican componentes de la maquinaria de reparación de escisiones, y en ausencia de este mecanismo de reparación, los genes que controlan el ciclo celular o regulan el crecimiento celular y la muerte se mutan. Los genes del cáncer colorrectal no hereditario no polipósico codifican componentes del sistema de reparación de apareamiento erróneo, y las mutaciones en estos genes se hallan en el 20% de los cánceres de colon esporádicos. Los cánceres progresan de pólipos benignos a tumores maduros mucho más rápidamente de lo usual, presumiblemente debido a que las células cancerosas iniciales experimentan una mutagénesis continua de discordancias sin reparación.

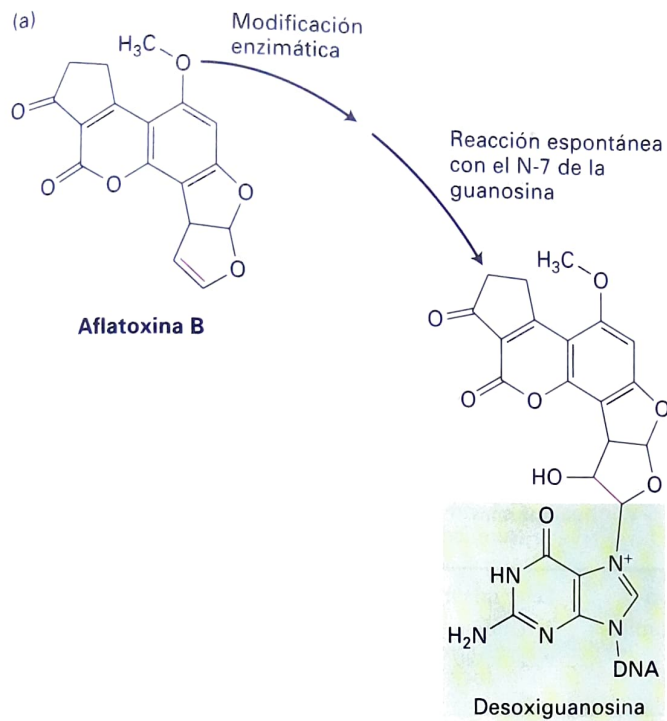
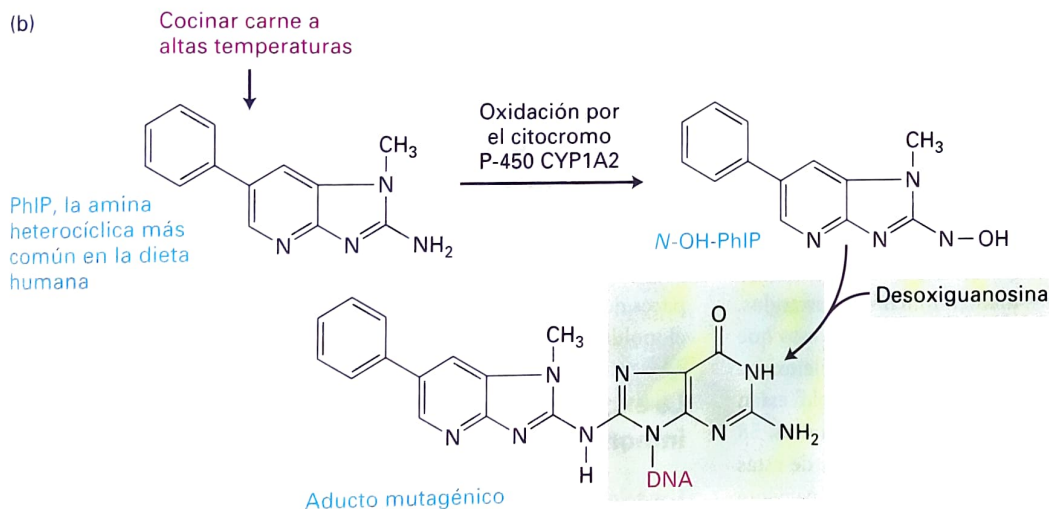


FIGURA 24-29 Acciones de dos carcinógenos químicos. (a) Como todos los carcinógenos de acción indirecta, la aflatoxina debe experimentar una modificación catalizada por enzimas antes de poder reaccionar con el DNA. En la aflatoxina, el enlace doble coloreado reacciona con un átomo de oxígeno y lo habilita para reaccionar químicamente con el átomo N-7 de una guanina en el DNA, lo que forma una gran molécula voluminosa que causa que la DNA polimerasa inserte una A en lugar de una C en el lado opuesto a la base G modificada durante la replicación. Este compuesto muta el gen supresor de tumores *p53*, causa así transversiones de G a T y es un factor de riesgo conocido de cáncer humano. (b) Reacciones químicas que ocurren en la comida humana elevada a alta temperatura, en especial carne roja, crean alrededor de 16 tipos diferentes de aminas heterocíclicas a partir de precursores tales como la creatinina y los aminoácidos. La amina heterocíclica mostrada aquí, PhIP, es la más común en la dieta humana. Las enzimas del citocromo P-450 la convierten en una forma químicamente muy reactiva, la cual reacciona con una base de guanina en el DNA para formar un aducto de DNA que es mutagénico. PhIP causa carcinomas de mama y de colon en roedores y podría estar involucrado en el cáncer de próstata humano. Aunque las conversiones por P-450 ocurren principalmente en células del hígado, las aminas heterocíclicas pueden migrar hacia otros tejidos.



Un gen frecuentemente mutado en los cánceres de colon debido a la ausencia de reparación de discordancias codifica el receptor tipo II de TGF- β (véase Fig. 24-23). El gen que codifica este receptor contiene una secuencia de 10 adeninas en una fila. Debido al “deslizamiento” de la DNA polimerasa durante la replicación, esta secuencia a menudo experimenta mutación en una secuencia que contiene 9 o 11 adeninas. Si la mutación no es solucionada por el sistema de reparación de discordancias, el corrimiento en el marco de lectura resultante de la proteína del receptor suprime la producción de la proteína del receptor normal. Como se vio previamente, tales mutaciones inactivantes hacen a las células resistentes a la inhibición del crecimiento por TGF- β , lo que de esta manera contribuye al crecimiento desregulado característico de estos tumores. Este hallazgo da fe de la importancia de la reparación de discordancias en la corrección del daño genético que podría de otra forma llevar a una proliferación celular incontrolada.

Todos los mecanismos de reparación del DNA utilizan una familia de DNA polimerasas para corregir el daño en el DNA. Nueve de estas polimerasas, incluyendo una llamada *DNA polimerasa β* , son capaces de utilizar moldes que contienen aductos de DNA y otras modificaciones químicas, incluso bases ausentes. Estas se llaman polimerasas de DNA lesión-tranlesión (*lesion-bypass DNA polymerases*). Cada miembro de la familia de polimerasas tiene distintas capacidades de colaborar con tipos particulares de lesiones en el DNA. Presumiblemente, tales polimerasas son toleradas debido a que a menudo cualquier reparación es mejor que ninguna. Son las polimerasas de última instancia, las que se utilizan cuando las polimerasas más convencionales y precisas no pueden actuar, y llevan a cabo un proceso de replicación mutagénico. La DNA Pol β no hace correcciones y se sobreexpresa en ciertos tumores, quizá debido a que se necesita a altos niveles para que las células sean capaces de dividirse absoluta-

Enfermedad	Sistema de reparación del DNA afectado	Sensibilidad	Susceptibilidad al cáncer	Síntomas
PREVENCIÓN DE MUTACIONES PUNTUALES, INSERCIONES Y DELECCIONES				
Cáncer colorrectal hereditario no polipósico	Reparación de discordancias en el DNA	Radiación UV, mutágenos químicos	Colon, ovario	Desarrollo temprano de tumores
Xeroderma pigmentosum	Reparación de escisiones de nucleótidos	Radiación UV, mutaciones puntuales	Carcinomas de piel, melanomas	Fotosensibilidad en piel y ojos, queratosis
REPARACIÓN DE DOBLES ROTURAS				
Síndrome de Bloom	Reparación de dobles roturas por recombinación homóloga	Agentes alquilantes suaves	Carcinomas, leucemias, linfomas	Fotosensibilidad, telangiectasia facial, alteraciones cromosómicas
Anemia de Fanconi	Reparación de dobles roturas por recombinación homóloga	Agentes de entrecruzamiento del DNA, químicos oxidantes reactivos	Leucemia mieloide aguda, carcinomas de las células escamosas	Anormalidades del desarrollo, incluyendo infertilidad y deformidades del esqueleto; anemia
Cáncer de mama hereditario, deficiencia en BRCA-1 y BRCA-2	Reparación de dobles roturas por recombinación homóloga		Cáncer de mama y ovárico	Cáncer de mama y ovárico

FUENTES: modificado de A. Kornberg y T. Baker, 1992, *DNA Replication*, 2d ed., W. H. Freeman and Company, p. 788; J. Hoeijmakers, 2001, *Nature* 411:366; y L. Thompson y D. Schild, 2002, *Mutation Res.* 509:49.

mente ante una carga creciente de mutaciones. Se cree que los sistemas de reparación propensos a errores median muchos, si no todos, los efectos carcinogénicos de los químicos y la radiación puesto que es sólo después de la reparación que una mutación heredable existe. Hay evidencia creciente de que las mutaciones en la DNA Pol β están asociadas con los tumores. Cuando se examinaron 189 tumores, 58 tenían mutaciones en el gen de la DNA Pol β , y la mayoría de estas mutaciones no se hallaron ni en el tejido normal del mismo paciente ni en el espectro normal de mutaciones halladas en personas diferentes. Expresar dos de las formas de la polimerasa mutante en células de ratón hizo que estas crecieran con una apariencia transformada, con formación de un foco e independencia de anclaje.

Las dobles roturas son lesiones particularmente graves debido a que la unión incorrecta de las dos hebras de DNA puede llevar a reordenamientos cromosómicos grandes y a translocaciones como las que producen un gen híbrido o traen un gen regulador del crecimiento bajo el control de un promotor diferente. A menudo, la reparación de tal daño depende de que se utilice el cromosoma homólogo como una guía (véase Fig. 4-42). Las células B y T del sistema inmunitario son particularmente susceptibles a los reordenamientos en el DNA causados por las dobles roturas creados durante el reordenamiento de su inmunoglobulina o sus genes de receptores de células T, lo que explica la participación frecuente de estos loci de genes en leucemias y linfomas. *BRCA-1* y *BRCA-2*, genes implicados en los cánceres de mama y de ovario humanos, codifican componentes importantes de los sistemas de reparación de corte del DNA.

Las células que carecen de una de las funciones de *BRCA* son incapaces de reparar DNA donde el cromosoma homólogo proporciona el molde para la reparación.

La expresión de la telomerasa contribuye a la inmortalización de las células cancerosas

Los **telómeros**, extremos físicos de los cromosomas lineales, consisten en repeticiones en tándem de una secuencia corta de DNA, TTA-GGG en vertebrados. Los telómeros proporciona la solución al problema de la replicación de los extremos (la incapacidad de las DNA polimerasas de replicar completamente el extremo de una molécula doble hebra de DNA; véase Cap. 6). La **telomerasa**, una transcriptasa inversa que contiene un molde de RNA, agrega reiteradamente repeticiones TTAGGG a los extremos de los cromosomas para alargarlos o mantener las regiones de 3 a 20 kb de repeticiones que cubren los extremos de los cromosomas humanos (véase Fig. 6-47). Las células embrionarias, las células de la línea germinal y las células madre producen telomerasa, pero la mayoría de las células somáticas humanas producen solo un nivel bajo de telomerasa cuando entran en la fase S. Como resultado de tener solo una modesta función de la telomerasa, sus telómeros se acortan con cada ciclo celular. El acortamiento excesivo de los telómeros es reconocido por la célula como un tipo de daño en el DNA, con la estabilización consecuente y la activación de la proteína p53, lo que lleva a la apoptosis disparada por p53. La Figura 24-30 resume los efectos de diferentes números de repeticio-

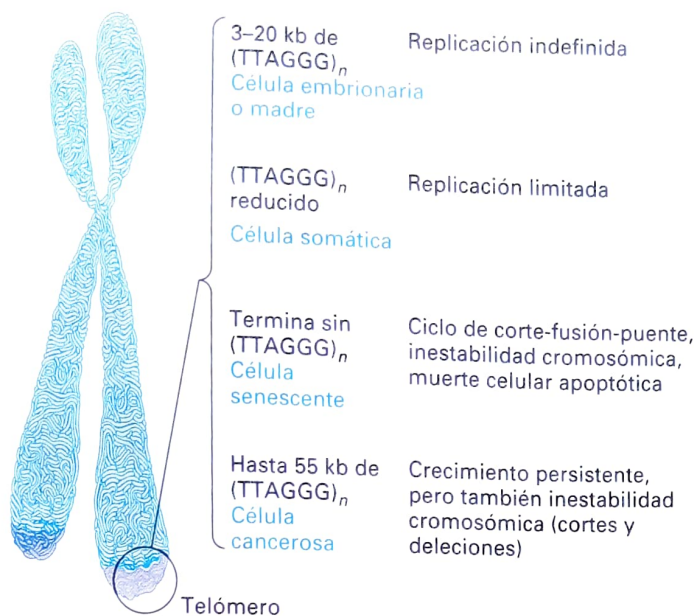


FIGURA 24-30 La pérdida de los telómeros normalmente limita el número de rondas de división celular. La replicación de los extremos de los cromosomas, los telómeros, requiere de una enzima especial llamada *telomerasa*. La telomerasa porta con ella un molde corto de RNA, el cual es utilizado para guiar el ensamblado de repeticiones de TTAGGG en los extremos de los cromosomas. Las células embrionarias humanas tienen 8–10 kb de estas repeticiones en cada extremo cromosómico. Debido a que la DNA polimerasa requiere de un cebador y no hay ninguno en el extremo de la hebra retrasada, no puede replicar el DNA completamente en los extremos (véase Cap. 6). Por lo tanto, la telomerasa es necesaria, y en su ausencia los cromosomas se encogen durante cada mitosis. La telomerasa está presente en las células madre y las células de la línea germinal, donde es necesaria para mantener los telómeros largos y permite esencialmente indefinidas rondas de división celular. En la mayoría de las células somáticas, la telomerasa está en niveles bajos o muy bajos y, en consecuencia, la longitud de los telómeros es gradualmente erosionada. La longitud de los telómeros, por lo tanto, proporciona un límite para la capacidad replicativa. La completa pérdida de las repeticiones de los telómeros dispara la reparación del DNA y la apoptosis. Las células cancerosas a menudo producen telomerasa, lo que les permite dividirse indefinidamente y evadir la muerte programada.

nes en los telómeros. La pérdida completa de los telómeros conduce a fusiones cromosómicas extremo con extremo y a la muerte celular.

La mayoría de las células tumorales, a pesar de su rápida velocidad de proliferación, superan este destino y producen telomerasa. Muchos investigadores creen que la expresión de la telomerasa es esencial para que una célula tumoral se vuelva inmortal, y los inhibidores específicos de la telomerasa han sido sugeridos como agentes terapéuticos contra el cáncer. La introducción de transgenes que producen telomerasa en células humanas en cultivo que de otra manera carecen de la enzima puede extender su vida útil por más de 20 duplicaciones y mantener la longitud del telómero. En forma inversa, tratar células tumorales humanas (células HeLa) en cultivo con RNA antisentido contra la telomerasa causó que dejaran de crecer en aproximadamente cuatro semanas. Las telomerasas dominantes negativas, como las que portan un molde de RNA modificado, pueden interferir con el crecimiento de las células cancerosas.



El pronóstico para el neuroblastoma, un tumor pediátrico del sistema nervioso periférico, puede ser comprobado evaluando el

nivel de actividad de la telomerasa en las células tumorales. Los niveles altos de telomerasa predicen una escasa respuesta a la terapia, mientras que bajos niveles predicen una buena respuesta. El nivel de proteína *N-myc*, un factor de transcripción que regula la expresión de la telomerasa, también es predictivo de la evolución de estos tumores. Los tumores que tienen el gen *N-myc* amplificado en un alto número de copias tienen un peor pronóstico. Estos resultados demuestran la importancia práctica de comprender los circuitos de la síntesis de telomerasa y su regulación. ■

Las aproximaciones genéticas han mejorado aún más nuestra comprensión del papel de la telomerasa en el cáncer. El descubrimiento inicial de que los ratones homocigotos para una deleción en la subunidad de RNA de la telomerasa son viables y fértiles fue sorprendente. Sin embargo, después de cuatro a seis generaciones empezaron a aparecer defectos en los ratones con la telomerasa anulada a medida que sus telómeros muy largos (40–60 kb) se hicieron significativamente más cortos. Los defectos incluyeron depleción de tejidos que requieren altas tasas de división celular, como piel e intestino, e infertilidad.

Cuando son tratados con carcinógenos, los ratones con la telomerasa anulada desarrollan tumores menos fácilmente de lo que lo hacen los ratones normales. Por ejemplo, los papilomas de piel inducidos por una combinación de carcinógenos químicos ocurren con una frecuencia 20 veces menor en ratones que carecen de una telomerasa funcional que en ratones normales, presumiblemente debido a que la apoptosis disparada por p53 es inducida en respuesta a los telómeros cada vez más cortos de las células que han comenzado a dividirse. Sin embargo, si ambos, la telomerasa y p53 están ausentes, hay una mayor proporción de tumores epiteliales como carcinoma de las células escamosas, cáncer de colon y de mama. Los ratones con una mutación en *APC* normalmente desarrollan tumores de colon, y estos también son reducidos si los ratones carecen de telomerasa. Algunos otros tumores se ven menos afectados por la pérdida de la telomerasa. Estos estudios demuestran la relevancia de la telomerasa para la división celular desenfrenada y hacen a la enzima un posible blanco para la quimioterapia.

CONCEPTOS CLAVE de la Sección 24.5

Carcinógenos y genes cuidadores en cáncer

- Los cambios en la secuencia del DNA son el resultado de errores de copia y de los efectos de varios agentes físicos y químicos, o carcinógenos. Todos los carcinógenos son mutágenos, es decir, alteran uno o más nucleótidos en el DNA.
- Los carcinógenos de acción indirecta, el tipo más común, deben ser activados antes de poder dañar el DNA. En los animales, la activación metabólica ocurre por medio del sistema del citocromo P-450, una vía generalmente utilizada por las células para deshacerse de químicos extraños nocivos. Los carcinógenos de acción directa tales como EMS y DMS no requieren tales modificaciones para poder dañar el DNA.
- El benzopireno, un componente del humo del cigarrillo, causa mutaciones inactivantes en el gen *p53*, y contribuye así a la iniciación de tumores de pulmón humanos.

- Los genes cuidadores codifican enzimas que reparan el DNA, mantienen de otro modo la integridad de los cromosomas o promueven la muerte de las células cuando ocurre un daño en el DNA. Las mutaciones en los genes cuidadores permiten la supervivencia de células que deberían morir y una mutagénesis continua del genoma que puede conducir a una proliferación celular incontrolada y, por consiguiente, al cáncer.
- Los defectos heredados en los procesos de reparación del DNA hallados en ciertas enfermedades humanas están asociados con una susceptibilidad aumentada para contraer ciertos cánceres (véase Cuadro 24-2).
- Las células cancerosas, al igual que las células de la línea germinal y las células madre pero a diferencia de la mayoría de las células diferenciadas, producen telomerasa, la cual previene el acortamiento de los cromosomas durante la replicación del DNA y podría contribuir a su inmortalización. La ausencia de telomerasa está asociada con la resistencia a la generación de ciertos tumores, debido a la respuesta protectora de p53.

Perspectivas para el futuro

El reconocimiento de que el cáncer es fundamentalmente una enfermedad genética ha abierto nuevas y enormes oportunidades para su prevención y tratamiento. Ahora, los carcinógenos pueden ser evaluados por sus efectos sobre los pasos conocidos en el control del ciclo celular. Los defectos genéticos en los controles de los puntos de control para la detección de DNA dañado y en los sistemas de reparación ya pueden ser reconocidos y utilizados para explorar los mecanismos del cáncer. Los múltiples cambios que deben ocurrir para que una célula se convierta en un tumor peligroso presentan múltiples oportunidades para la intervención. Identificar genes mutados asociados con el cáncer señala directamente proteínas hacia las cuales se pueden dirigir los fármacos.

La medicina de diagnóstico está siendo transformada por nuestra habilidad recientemente hallada de controlar grandes cantidades de características celulares y por métodos cada vez más sensitivos para detectar cantidades más pequeñas de células tumorales. Los métodos tradicionales para evaluar posibles células tumorales, principalmente microscopia de células teñidas, serán ampliados o reemplazados por técnicas para medir la expresión de decenas de miles de genes, centrándose en particular en los genes cuyas actividades son identificadas como indicadores poderosos de las propiedades de crecimiento celular y del pronóstico del paciente. En la actualidad, las micromatrices de DNA y los análisis de secuenciación profunda permiten medir la transcripción génica y el número de copias de DNA. En el futuro, las técnicas para medir sistemáticamente el contenido proteico así como las modificaciones en las proteínas y su localización, todas importantes mediciones de los estados celulares, nos darán retratos incluso más refinados de las células. Los tumores que ahora se ven como idénticos o muy similares serán en cambio reconocidos como claramente distintos y se les dará tratamientos apropiadamente diferentes. La detección temprana de los tumores, basada en la mejor supervisión de las propiedades celulares, debería permitir un tratamiento más exitoso. Concentrarse en el proceso particularmente destructivo de la metástasis debería tener éxito en la mayor identificación de los mecanismos usados por las células para migrar, anclarse e invadir. La manipulación de la angiogénesis sigue viéndose esperanzadora como un medio para sofocar los tumores.

La biología celular molecular del cáncer provee caminos para nuevas terapias, pero la prevención continúa siendo fundamental y preferible antes que la terapia. Evitar los carcinógenos obvios, en particular el humo del cigarrillo, puede reducir significativamente la incidencia del cáncer de pulmón y quizá otros tipos de cáncer. Más allá de minimizar la exposición a carcinógenos como el humo o la luz solar, ciertos acercamientos específicos son ahora factibles. El nuevo conocimiento de la participación del virus del papiloma humano 16 en la mayoría de los casos de cáncer de cuello de útero llevó al desarrollo y aprobación de la Administración Federal de Alimentos y Fármacos de una vacuna contra el cáncer que previene tres cuartos de todos los cánceres de cuello uterino. Los anticuerpos contra los marcadores de superficie celular que distinguen a las células cancerosas son una fuente de gran esperanza, en especial después de los éxitos con el uso clínico de anticuerpos monoclonales contra el receptor 2 de EGF humano (Her2), una proteína involucrada en algunos casos de cáncer de mama humano. Nuevos pasos deben involucrar a la medicina y a la ciencia. La comprensión de la biología celular del cáncer es un paso inicial fundamental hacia la prevención y la cura, pero los siguientes pasos son duros. El éxito con Gleevec® (imatinib) contra la leucemia es excepcional; muchos cánceres siguen siendo difíciles de tratar y causan un enorme sufrimiento. Dado que *cáncer* es un término para un grupo de enfermedades altamente diversas, las intervenciones exitosas para un tipo podrían no ser útiles para otros. A pesar de estas realidades desalentadoras, estamos comenzando a cosechar los beneficios de décadas de investigación explorando la biología molecular de la célula. Esperamos que muchos de los lectores de este libro contribuyan a superar los obstáculos que aún quedan.

Palabras clave

adición oncogénica 1132	mutágeno 1145
angiogénesis 1117	oncogén 1113
benigno 1115	pérdida de la
carcinógeno 1113	heterocigosidad 1129
carcinoma 1115	proteína del retinoblastoma
célula madre cancerosa 1116	(Rb) 1128
cromosoma Filadelfia 1135	proteína p53 1122
efecto Warburg 1122	proteína Ras 1118
gen cuidador 1113	protooncogén 1113
gen supresor de tumores 1113	retrovirus de acción lenta 1127
leucemia 1115	retrovirus de
linfoma de Burkitt 1136	transducción 1127
maligno 1115	sarcoma 1115
metástasis 1114	transformación 1118
microentorno del tumor 1117	transición epitelio
modelo de impacto múltiple	a mesénquima 1116
de inducción del cáncer 1120	tumorigénesis 1114

Revisión de los conceptos

1. ¿Qué características distinguen a los tumores benignos de los malignos? Con respecto a las mutaciones génicas, ¿qué distingue a los pólipos de colon benignos del carcinoma de colon maligno?
2. El 90% de las muertes por cáncer son causadas por tumores metastásicos más que por tumores primarios. Defina *metástasis*. Explique el

fundamento para los siguientes tratamientos: (a) batimastat, un inhibidor de metaloproteasas de la matriz y del receptor del activador del plasminógeno, (b) anticuerpos que bloquean la función de integrinas, proteínas integrales de membrana que median el anclaje de las células a la lámina basal y a las matrices extracelulares de varios tejidos, y (c) bisfosfonato, el cual inhibe la función de osteoclastos. Los osteoclastos son células que digieren los huesos, por ejemplo, en la remodelación durante el crecimiento o la curación. Pueden ser reclutados para una tarea de digestión de un hueso mediante señales de otras células. (d) ¿Cuál es la importancia de la transición epitelio a mesénquima durante la metástasis?

3. Debido a los requerimientos de oxígeno y nutrientes, las células en un tejido deben residir dentro de los 100 μm de un vaso sanguíneo. Basado en esta información, explique por qué muchos tumores malignos a menudo tienen mutaciones de ganancia de función en uno de los genes siguientes: *βFGF*, *TGFα* y *VEGF*.

4. Los oncogenes *Ras* han sido identificados en células tumorales humanas usando ensayos de transformación celular con una línea de fibroblastos de ratón en cultivo llamados células 3T3. ¿Cómo funciona el ensayo de transformación de las células 3T3? ¿Por qué puede la transfección con un gen *ras* transformar células 3T3 pero no células de fibroblastos normales en cultivo primario?

5. ¿Qué característica importante de las células tumorales descubrió Otto Warburg? ¿Cómo contribuye esta propiedad al proceso de formación de un tumor?

6. ¿Qué hipótesis explica las observaciones de que la incidencia de los cánceres en los seres humanos aumenta exponencialmente con la edad? Dé un ejemplo de datos que confirmen la hipótesis.

7. Distinga entre protooncogenes y genes supresores de tumores. Para volverse promotores del cáncer, ¿los protooncogenes y los genes supresores de tumores experimentan mutaciones de ganancia de función o de pérdida de función? Clasifique los siguientes genes como protooncogenes o genes supresores de tumores: *p53*, *ras*, *Bcl-2*, *jun*, *MDM2* y *p16*.

8. Explique cómo el análisis de micromatrices de DNA puede diagnosticar la evolución del cáncer de mama en un estadio temprano.

9. A pesar de las diferencias en el origen, las células cancerosas tienen varias características en común que las diferencian de las células normales. Describalas.

10. El retinoblastoma hereditario generalmente afecta a los niños en ambos ojos, mientras que el retinoblastoma espontáneo usualmente ocurre durante la edad adulta sólo en un ojo. Explique las bases genéticas para la distinción epidemiológica entre estas dos formas de retinoblastoma. Explique la paradoja aparente: las mutaciones de pérdida de función en los genes supresores de tumores actúan recesivamente; sin embargo, el retinoblastoma hereditario es heredado como un dominante autosómico.

11. Explique el concepto de pérdida de heterocigosidad. ¿Por qué la mayoría de las células cancerosas exhiben pérdida de heterocigosidad de uno o más genes? ¿Cómo lleva la falla en el punto de control del ensamblado del huso a la pérdida de la heterocigosidad?

12. Muchos tumores malignos son caracterizados por la activación de uno o más receptores de factores de crecimiento. ¿Cuál es la actividad catalítica asociada con los receptores de factores de crecimiento transmembrana como el receptor de EGF? Describa cómo

los siguientes eventos conducen a la activación del receptor de factor de crecimiento relevante: (a) expresión de la proteína viral gp55, (b) mutación puntual que convierte una valina en glutamina dentro de la región transmembrana del receptor Her2.

13. Describa el evento común de transducción de la señal que es perturbado por las mutaciones promotoras de cáncer en los genes que codifican Ras y NF-1. ¿Por qué las mutaciones en Ras son más comúnmente halladas en cánceres que las mutaciones en NF-1?

14. ¿Cuál es la distinción estructural entre las proteínas codificadas por *c-src* y *v-src*? ¿Cómo es que esta diferencia hace oncogénico a *v-src*?

15. Describa el evento mutacional que produce el oncogén *myc* en el linfoma de Burkitt. ¿Por qué el mecanismo particular para generar *myc* oncogénico resulta en un linfoma en lugar de otro tipo de cáncer? Describa otro mecanismo para generar *myc* oncogénico.

16. A menudo, los cánceres pancreáticos tienen mutaciones de pérdida de la función en el gen que codifica la proteína Smad4. ¿Cómo promueve esta mutación la inhibición de pérdida del crecimiento y el fenotipo altamente metastásico de los tumores pancreáticos?

17. ¿Por qué las mutaciones en el locus INK4 son tan peligrosas?

18. Describa dos mecanismos por medio de los cuales los virus que causan cáncer puedan transformar las células normales en cancerosas.

19. Explique cómo los cambios epigenéticos pueden contribuir a la tumorigénesis.

20. Varias cepas del virus del papiloma humano (HPV) pueden causar cáncer de cuello uterino. Estas cepas patógenas producen tres proteínas que contribuyen a la transformación de la célula huésped. ¿Qué son estas tres proteínas virales? Describa cómo cada una interactúa con su proteína huésped diana.

21. La pérdida de función de p53 ocurre en la mayoría de los tumores humanos. Nombre dos formas en las que la pérdida de función de p53 contribuye a un fenotipo maligno. Explique cómo el benzopireno puede causar la pérdida de la función de p53.

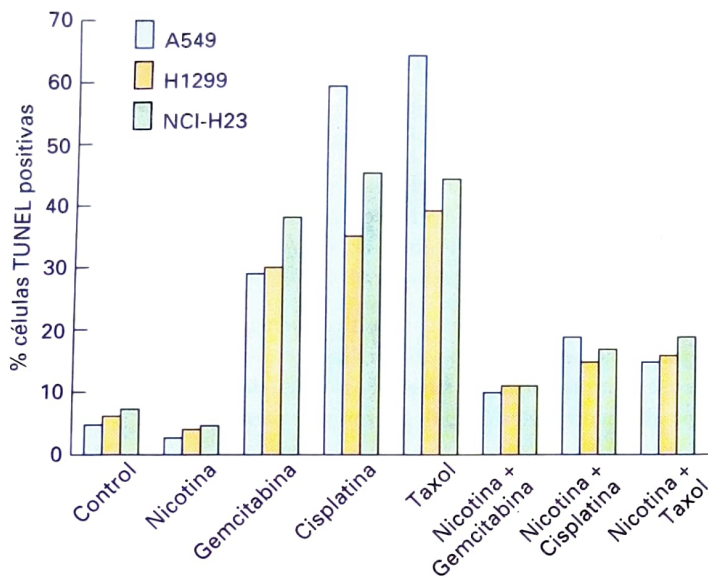
22. ¿Qué tipos de células humanas tienen actividad telomerasa? ¿Qué característica del cáncer es promovida por la expresión de la telomerasa? ¿Qué preocupaciones plantea esto para las terapias médicas que involucran células madre?

Análisis de los datos

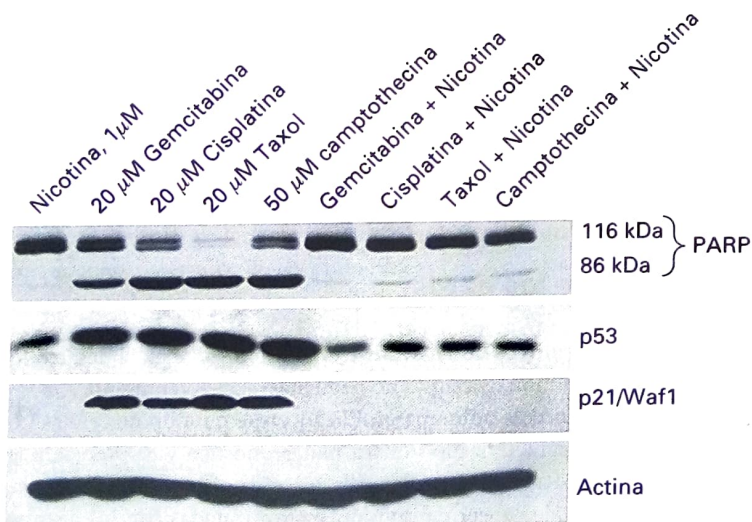
1. Fumar cigarrillos es un factor de riesgo importante en el desarrollo de cáncer de pulmón de células no pequeñas, el cual representa el 80% de todos los cánceres pulmonares. El cáncer de pulmón de células no pequeñas está caracterizado por un mal pronóstico y resistencia a la quimioterapia. Para comprender si la nicotina afecta esta resistencia, líneas celulares de cáncer de pulmón fueron tratadas con los agentes quimioterápicos gemcitabina, Cisplatina y Taxol en presencia y ausencia de nicotina (véase Dasgupta y cols., 2006, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 103:6332-6337).

a. Tres líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas, A549, NCI-H23 y H1299, fueron examinadas por el ensayo TUNEL, el cual detecta células que están experimentando apoptosis (muerte celular programada). Las células fueron tratadas o no tratadas con uno de

los tres agentes quimioterápicos en presencia o ausencia de nicotina. Se obtuvieron los siguientes datos. ¿Por qué estos agentes quimioterápicos son potencialmente útiles para el tratamiento del cáncer de pulmón, y cómo afecta la nicotina su potencial utilidad?

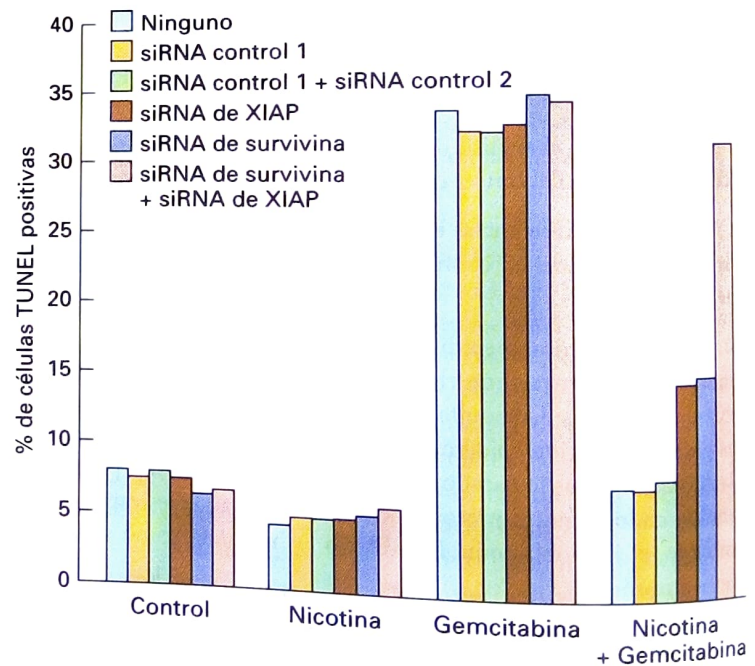
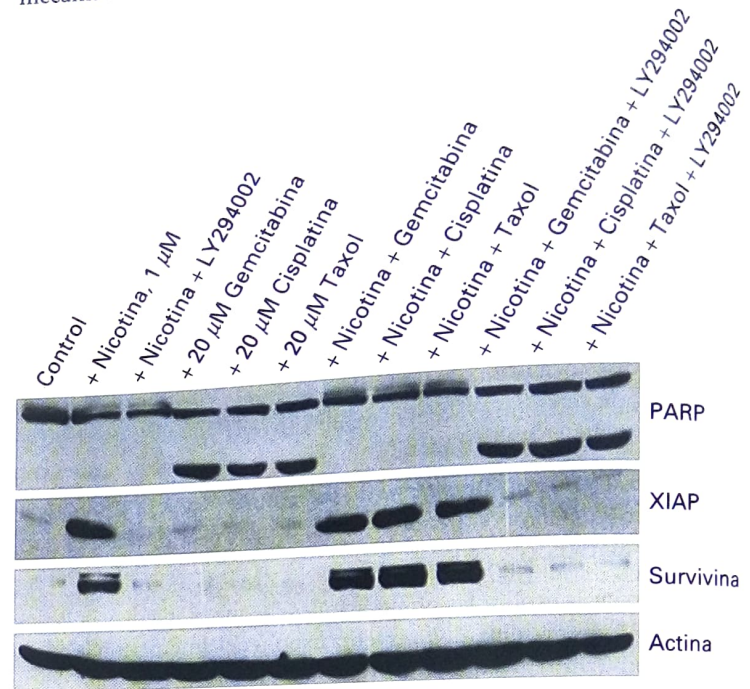


b. Las células A549 fueron incubadas con los fármacos como en la parte (a) y con un agente quimioterapéutico adicional, camptotecina, en presencia o ausencia de nicotina. Las células fueron lisadas, los extractos se corrieron en geles SDS, y luego los geles fueron transferidos y analizados con una sonda de anticuerpos contra las proteínas indicadas. PARP es una proteína que es escindida durante la apoptosis. ¿Qué puede usted deducir a partir de estos datos sobre los efectos de la nicotina? ¿Cuál es el propósito de evaluar los niveles de p53, p21 y actina?



c. La survivina y XIAP son miembros de la familia de inhibidores de la apoptosis, proteínas que protegen a las células contra la apoptosis. Las células A549 fueron tratadas con los fármacos quimioterapéuticos en presencia o ausencia de nicotina y en presencia o ausencia de LY294002, un inhibidor de la cinasa PI-3 (véase Cap. 16). Los niveles de PARP, XIAP, survivina y actina fueron evaluados, como se muestra en

los Western blots abajo. El gráfico muestra los resultados de un ensayo TUNEL en el cual células A549 han sido transfectadas con los siRNA indicados. "Ninguno" indica la cantidad de muerte celular sin RNA transfectado. Los siRNA control 1 y 2 son RNA irrelevantes agregados para el control de efectos no específicos de tener un RNA de interferencia entrando en las células. ¿Qué sugieren estos estudios acerca del mecanismo de acción de la nicotina?



d. ¿Puede usted dar una explicación biológica de por qué el pronóstico es peor para pacientes que fuman durante la quimioterapia comparado con aquellos que dejan de fumar antes del tratamiento? Se cree que la oncoproteína E7 de los virus del papiloma humano (HPV) de alto riesgo contribuye a la carcinogénesis de cuello uterino al menos en parte alterando la regulación del ciclo celular en las células.

las epiteliales del cuello del útero. E7 puede desregular el ciclo celular por medio de su interacción con varias proteínas celulares, incluyendo la proteína pRB supresora de retinoblastoma así como el inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas p21(Cip1).

a. ¿Cómo pueden los modelos hechos en ratones transgénicos ser utilizados para evaluar el impacto de p21 en la desregulación del ciclo celular?

b. Si la incidencia de la enfermedad de cuello uterino fuera significativamente mayor en ratones p21(−/−) comparada con ratones p21(+ / +), ¿apoyaría esto un papel de ganancia de función o de pérdida de función de p21 en el desarrollo de los cánceres de cuello uterino?

c. Si la habilidad de E7 de inducir cánceres de cuello de útero no estuviera significativamente potenciada en el contexto de p21 anulado, ¿sería esto consistente con la hipótesis de que la habilidad de E7 de inhibir a p21 contribuye a sus propiedades carcinogénicas?

d. Explique cómo la expresión de proteínas E7 mutantes en modelos en ratón de cáncer de cuello uterino puede ser utilizada para evaluar el impacto de estas mutaciones en p21 y en el desarrollo de carcinomas de cuello de útero.

Referencias

Células tumorales y aparición del cáncer

- Weinberg, R. A. 2006. *The Biology of Cancer*. Garland Science. Tumor Cells and the Onset of Cancer
- Clarke, M. F., and M. Fuller. 2006. Stem cells and cancer: two faces of Eve. *Cell* **124**:1111-1115.
- Desgrosellier, J. S., and D. A. Cheresh. 2010. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nature Rev. Cancer* **10**(1):9-22. Review.
- Egeblad, M., L. E. Littlepage, and Z. Werb. 2005. The fibroblastic coconspirator in cancer progression. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **70**:383-388.
- Fidler, I. J. 2002. The pathogenesis of cancer metastasis: the "seed and soil" hypothesis revisited. *Nature Rev. Cancer* **3**:1-6.
- Folkman, J. 2006. Angiogenesis. *Annu. Rev. Med.* **57**:1-18.
- Grivnickov, S. I., F. R. Greten, and M. Karin. 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* **140**(6):883-899.
- Hanahan, D., and R. A. Weinberg. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**:646-674.
- Huber, M. A., N. Kraut, and H. Beug. 2005. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr. Opin. Cell Biol.* **17**:548-558.
- Jain, M., et al. 2002. Sustained loss of a neoplastic phenotype by brief inactivation of MYC. *Science* **297**:102-104.
- Joyce, J. A., and J. W. Pollard. 2009. Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **9**(4):239-252.
- Kinzler, K. W., and B. Vogelstein. 1996. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* **87**:159-170.
- Ludwig, T. 2005. Local proteolytic activity in tumor cell invasion and metastasis. *BioEssays* **27**:1181-1191.
- Matsui, W., et al. 2004. Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. *Blood* **103**:2332-2336.
- Maheswaran, S., and D. A. Haber. 2010. Circulating tumor cells: a window into cancer biology and metastasis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **20**(1):96-99.
- Nguyen, D. X., P. D. Bos, and J. Massagué. 2009. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat. Rev. Cancer* **9**(4):274-284.
- Olsson, A. Y., and C. S. Cooper. 2005. The molecular basis of prostate cancer. *Brit. J. Hosp. Med. (Lond.)* **66**:612-616.
- Ramaswamy, S., et al. 2003. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nature Genet.* **33**:49-54.
- Thiery, J. P., H. Acloque, R. Y. Huang, and M. A. Nieto. 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* **139**(5):871-890.
- Trusolino, L., and P. M. Comoglio. 2002. Scatter-factor and semaphorin receptors: cell signalling for invasive growth. *Nature Rev. Cancer* **2**:289-300.
- Vander Heiden, M. G., L. C. Cantley, and C. B. Thompson. 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **324**(5930):1029-1033.
- Williams, B. R., and A. Amon. 2009. Aneuploidy: cancer's fatal flaw? *Cancer Res.* **69**(13):5289-5291.
- Zakarija, A., and G. Soff. 2005. Update on angiogenesis inhibitors. *Curr. Opin. Oncol.* **17**:578-583.

La base genética del cáncer

- Bertucci, F., et al. 2004. Gene expression profiling of colon cancer by DNA microarrays and correlation with histoclinical parameters. *Oncogene* **23**:1377-1391.
- Clark, J., et al. 2002. Identification of amplified and expressed genes in breast cancer by comparative hybridization onto microarrays of randomly selected cDNA clones. *Genes Chrom. Cancer* **34**:104-114.
- Chen, H. Z., S. Y. Tsai, and G. Leone. 2009. Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control. *Nat. Rev. Cancer* **9**(11):785-797.
- Fogarty, M. P., J. D. Kessler, and R. J. Wechsler-Reya. 2005. Morphing into cancer: the role of developmental signaling pathways in brain tumor formation. *J. Neurobiol.* **64**:458-475.
- Grisendi, S., and P. P. Pandolfi. 2005. Two decades of cancer genetics: from specificity to pleiotropic networks. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **70**:83-91.
- Lau, J., H. Kawahira, and M. Hebrok. 2006. Hedgehog signaling in pancreas development and disease. *Cell Mol. Life Sci.* **63**:642-652.
- Pollack, J. R., et al. 2002. Microarray analysis reveals a direct role of DNA copy number alteration in the transcriptional program of human breast tumors. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* **99**:12963-12968.
- Sasaki, T., et al. 2000. Colorectal carcinomas in mice lacking the catalytic subunit of PI(3)Kgamma. *Nature* **406**:897-902.
- Scambia, G., S. Lovergine, and V. Masciullo. 2006. RB family members as predictive and prognostic factors in human cancer. *Oncogene* **25**:5302-5308.
- Sherr, C. J., and F. McCormick. 2002. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* **2**:103-112.
- van't Veer, L. J., et al. 2002. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* **415**:530-536.
- West, M., et al. 2001. Predicting the clinical status of human breast cancer by using gene expression profiles. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* **98**:11462-11467.

Cáncer y alteración de las vías regulatorias del crecimiento

- Bachman, K. E., and B. H. Park. 2005. Dual nature of TGF-beta signaling: tumor suppressor vs. tumor promoter. *Curr. Opin. Oncol.* **17**:49-54.
- Beachy, P. A., S. S. Karhadkar, and D. M. Berman. 2004. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. *Nature* **432**:324-331.
- Capdeville, R., et al. 2002. Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nature Rev. Drug Discov.* **1**:493-502.
- Downward, J. 2003. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature Rev. Cancer* **3**:11-22.
- Gregorieff, A., and H. Clevers. 2005. Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev.* **19**:877-890.

Heyer, J., et al. 2010. Non-germline genetically engineered mouse models for translational cancer research. *Nat. Rev. Cancer* 10:470-480.

Meenakshi, J., et al. 2002. Sustained loss of a neoplastic phenotype by brief inactivation of MYC. *Science* 297:102-104.

Rowley, J. D. 2001. Chromosome translocations: dangerous liaisons revisited. *Nat. Rev. Cancer* 1:245-250.

Sahai, E., and C. J. Marshall. 2002. RHO-GTPases and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2:133-142.

Shaulian, E., and M. Karin. 2002. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nature Cell Biol.* 4:E131-E136.

Shawver, L. K., D. Slamon, and A. Ullrich. 2002. Smart drugs: tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Cancer Cell* 1:117-123.

Cáncer y mutación de los reguladores de la división celular y los puntos de control

Bardeesy, N., et al. 2006. Both pl6(Ink4a) and the pl9(Arf)-p53 pathway constrain progression of pancreatic adenocarcinoma in the mouse. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 103:5947-5952.

Burkhardt, D. L., and J. Sage. 2008. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat. Rev. Cancer* 8(9):671-682.

Croce, C. M. 2009. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat. Rev. Genet.* 10(10):704-714.

Jiang, J., and C. Hui. 2008. Hedgehog signaling in development and cancer. *Dev. Cell.* 15(6):801-812.

Lane, D. P. 2005. Exploiting the p53 pathway for the diagnosis and therapy of human cancer. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 70:489-497.

Malumbres, M., and M. Barbacid. 2001. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 1:222-231.

Massagué, J. 2008. TGF β in cancer. *Cell* 134:215-229.

Mooi, W. J., and D. S. Peeper. 2006. Oncogene-induced cell senescence—halting on the road to cancer. *N. Engl. J. Med.* 355:1037-1046.

Moon, R. T., et al. 2002. The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin. *Science* 296:1644-1646.

Polakis, P. 2000. Wnt signaling and cancer. *Genes Devel.* 14:1837-1851.

Zhang, L., et al. 2000. Role of BAX in the apoptotic response to anticancer agents. *Science* 290:989-992.

Carcinógenos y genes cuidadores en cáncer

Bailey, S. M., and J. P. Murnane. 2006. Telomeres, chromosome instability and cancer. *Nucl. Acids Res.* 34:2408-2417.

Batty, D., and R. Wood. 2000. Damage recognition in nucleotide excision repair of DNA. *Gene* 241:193-204.

Blackburn, E. H. 2005. Telomerase and cancer: Kirk A. Landon— AACR prize for basic cancer research lecture. *Mol. Cancer Res.* 3:477-482.

Cleaver, J. E. 2005. Cancer in xeroderma pigmentosum and related disorders of DNA repair. *Nat. Rev. Cancer* 5:564-573.

D'Andrea, A., and M. Grompe. 2003. The Fanconi anemia/ BRCA pathway. *Nat. Rev. Cancer* 3:23-34.

Flores-Rozas, H., and R. Kolodner. 2000. Links between replication, recombination and genome instability in eukaryotes. *Trends Biochem. Sci.* 25:196-200.

Friedberg, E. 2003. DNA damage and repair. *Nature* 421:436-440.

Hoeijmakers, J. 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411:366-374.

Jiricny, J. 2006. The multifaceted mismatch-repair system. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 7:335-346.

Ju, Z., and K. L. Rudolph. 2006. Telomeres and telomerase in cancer stem cells. *Eur. J. Cancer* 42:1197-1203.

Kitagawa, R., and M. B. Kastan. 2005. The ATM-dependent DNA damage signaling pathway. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 70:99-109.

Loechler, E. L. 2002. Environmental carcinogens and mutagens. In *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing.

Muller, A., and R. Fishel. 2002. Mismatch repair and the hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome (HNPCC). *Cancer Invest.* 20:102-109.

O'Driscoll, M., and P. A. Jeggo. 2006. The role of double-strand break repair—insights from human genetics. *Nature Rev. Genet.* 7:45-54.

Sahin, E., and R. A. Depinho. 2010. Linking functional decline of telomeres, mitochondria and stem cells during ageing. *Nature* 464(7288):520-528.

Schärer, O. 2003. Chemistry and biology of DNA repair. *Angewandte Chemie* 42:2946-2974.

Somasundaram, K. 2002. Breast cancer gene 1 (BRCA-1): role in cell cycle regulation and DNA repair—perhaps through transcription. *J. Cell Biochem.* 88:1084-1091.

Sweasy, J. B., T. Lang, and D. DiMaio. 2006. Is base excision repair a tumor suppressor mechanism? *Cell Cycle* 5:250-259.

Thompson, L., and D. Schild. 2002. Recombinational DNA repair and human disease. *Mut. Res.* 509:49-78.

van Gant, D., J. Hoeijmakers, and R. Kanaar. 2001. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nature Rev. Genet.* 2:196-205.

Wogan, G. N., et al. 2004. Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin. Cancer Biol.* 14:473-486.

GLOSARIO

Los términos en **negrita** dentro de una definición también están definidos en este glosario.

Las figuras y los cuadros que ilustran los términos definidos se remiten entre paréntesis.

Acetil CoA Metabolito pequeño hidrosoluble compuesto de un grupo acetilo unido a una coenzima A (CoA). El grupo acetilo es transferido al citrato en el **ciclo del ácido cítrico** y se utiliza como fuente de carbono en la síntesis de los ácidos grasos, esteroides, y otras moléculas. (Fig. 12-9)

Acetilcolina (ACh) Neurotransmisor que actúa en las uniones neuromusculares de los vertebrados y en varias sinapsis entre neuronas del cerebro y el sistema nervioso periférico. (Fig. 22-19)

Ácido Cualquier compuesto que puede donar un protón (H^+). Los grupos carboxilo y fosfatos son los principales grupos ácidos en las macromoléculas biológicas.

Ácido desoxirribonucleico Véase **DNA**

Ácido graso Cualquiera de las largas cadenas de carbonos que tienen un grupo carboxilo en un extremo; fuente principal de energía durante el metabolismo y precursor para la síntesis de fosfolípidos, triglicéridos y ésteres de colesterol. (Fig. 2-21; Cuadro 2-4)

Ácido nucleico Polímero de nucleótidos unidos mediante enlaces **fosfodiéster**. El DNA y el RNA son los principales ácidos nucleicos en las células.

Ácido ribonucleico (RNA) Véase **RNA**.

Actina Proteína estructural abundante en las células eucariontes que interactúa con muchas otras proteínas. La forma globular monomérica (*G-actina*) se polimeriza para formar filamentos de actina (*F-actina*). En las células musculares, la *F-actina* interactúa con **miosina** durante la contracción. Véase también **Microfilamentos**. (Fig. 17-5)

Activador **Factor de transcripción** específico que estimula la transcripción.

Acuaporinas Familia de **proteínas de transporte de membrana** que permiten que el agua y algunas otras moléculas pequeñas sin carga como el glicerol, atraviesen las biomembranas. (Fig. 11-8)

Adenilciclase Una de las varias enzimas que se activa por unión de ciertos ligandos a sus receptores de superficie celular y cataliza la formación del **AMP cíclico (cAMP)** a partir de ATP; también llamada *adenilato ciclase*. (Figs. 15-27 y 15-28)

Adenosina trifosfato (ATP) (también puede verse la forma **adenosín**) Véase **ATP**

Adición oncogénica Describe la observación de que algunos cánceres, a pesar de contener numerosas anomalías genéticas, dependen solo de unas pocas alteraciones genéticas para mantener su fenotipo maligno. Se dice que estos cánceres son "adictos" a ciertas mutaciones oncogénicas.

ADP (adenosina difosfato) Producto, junto con fosfato inorgánico, de la hidrólisis del ATP por parte de las ATPasas.

Adrenalina Catecolamina secretada por la glándula suprarrenal y por algunas neuronas en respuesta al estrés; como fármaco se conoce en algunos sitios como *epinefrina*. Funciona tanto como una hormona y como un neurotransmisor, y media la respuesta de "lucha o huida" (p. ej., aumenta las concentraciones de glucosa sanguínea y la frecuencia cardíaca).

Aerobio Referente a una célula, organismo o proceso metabólico que utiliza oxígeno gaseoso (O_2) o que puede desarrollarse en presencia de O_2 .

Agonista Molécula, a menudo sintética, que imita la función biológica de una molécula natural (p. ej., una hormona).

Agrina Glucoproteína sintetizada por neuronas motoras en desarrollo que aumenta la actividad cinasa de MuSK en una célula muscular, facilitando el desarrollo de una unión neuromuscular. (Fig. 22-17)

Akt Serina/treonina cinasa citosólica que es activada por la unión al PI 3,4-bisfosfato y PI 3,4,5-trifosfato; también denominada *protein-cinasa B*.

Alelo Una o más formas alternativas de un gen. Las células diploides contienen dos alelos de cada gen, localizados en el sitio correspondiente (locus) en los **cromosomas homólogos**.

Almidón Polisacárido ramificado muy largo compuesto exclusivamente por unidades de glucosa, que es el principal hidrato de carbono de almacenamiento en las células vegetales. (Fig. 12-30)

Allostérico Referente a proteínas y procesos celulares que se regulan mediante **alosterismo**.

Alosterismo Cambio en la estructura terciaria o cuaternaria de una proteína inducido por la unión de una molécula pequeña a un sitio regulatorio específico, y que causa un cambio en la actividad proteica.

Aminoácido Compuesto orgánico que contiene al menos un grupo amino y un grupo carboxilo. En los aminoácidos que son los monómeros

ros que permiten sintetizar proteínas, un grupo amino y uno carboxilo están unidos a un átomo de carbono central, el carbono α , al cual se une una cadena lateral variable. (Figs. 2-4 y 2-14)

Aminoacil-tRNA Forma activada de un aminoácido, usada en la síntesis proteica, que contiene un aminoácido unido mediante un enlace éster de alta energía a un grupo 3'-hidroxilo de una molécula de tRNA. (Fig. 4-19)

AMP cíclico (cAMP) Segundo mensajero producido por la estimulación hormonal de ciertos receptores asociados con proteína G que activa la **proteincinasa A**. (Fig. 15-8; Cuadro 15-2)

Anaerobio Referente a una célula, organismo o proceso metabólico que funciona en ausencia de oxígeno gaseoso (O_2).

Anafase Estadio mitótico durante el cual las **cromátidas** hermanas (o los homólogos duplicados en la meiosis I) se separan y se alejan (segregan) hacia los polos de los husos. (Fig. 18-36)

Aneuploidia Cualquier derivación del número **diploide** normal de cromosomas en el cual hay copias extra de uno o más cromosomas presentes o faltan **uno o** más cromosomas.

Anfipática Referente a una molécula o estructura que tiene tanto una parte **hidrófoba** como una **hidrófila**.

Anillo contráctil Compuesto de actina y miosina; localizado debajo de la membrana plasmática. Durante la citocinesis, su contracción tira de la membrana hacia el interior, cerrando finalmente la conexión entre las dos células hijas.

Anión Ion con carga negativa.

Antagonista Molécula, a menudo sintética, que bloquea la función biológica de una molécula natural (p. ej., hormona).

Anticodón Secuencia de tres nucleótidos en un tRNA que es complementaria de un **codón** en un mRNA. Durante la síntesis de proteínas, el apareamiento de bases entre un codón y un anticodón alinea el tRNA portador del aminoácido correspondiente para agregarlo a la cadena polipeptídica en crecimiento. (Fig. 4-20)

Anticuerpo Proteína (inmunoglobulina), producida normalmente como respuesta a un **antígeno**, que interactúa con un sitio particular (**epítipo**) en el mismo antígeno y facilita su eliminación del cuerpo. (Fig. 3-19)

Anticuerpo monoclonal Anticuerpo producido por una progenie de una célula B única, y por lo tanto una proteína homogénea que reconoce un único antígeno (epítipo). Puede producirse experimentalmente usando un **hibridoma**. (Fig. 9-6)

Antígeno Cualquier sustancia (en general extraña) que provoca una respuesta inmunitaria. Para las células B, un antígeno provoca la formación de un anticuerpo que se une de manera específica al mismo antígeno; para las células T, un antígeno provoca una respuesta proliferativa, seguida por la producción de **citocinas** o la activación de actividad citotóxica.

Antiporte Tipo de **cotransporte** en el cual una proteína de membrana transporta dos moléculas o iones diferentes a través de la membrana en direcciones opuestas. Llamado también **cotransporte bidireccional**. Véase también el **Simporte**. (Fig. 11-2[3C])

Apical Referente a la punta (ápice) de una célula, un órgano u otra estructura celular. En el caso de las células epiteliales, la superficie apical queda expuesta hacia el exterior del cuerpo o hacia un espacio inter-no abierto (p. ej., luz intestinal, conducto). (Fig. 20-9)

Apoptosis Proceso regulado genéticamente, que se produce en tejidos específicos durante el desarrollo y las enfermedades, por el cual una célula se autodestruye; está marcado por la degradación de la mayoría de los componentes celulares y una serie de cambios morfológicos bien definidos; también se conoce como *muerte celular programada*. Véase también **Caspasas** (Figs. 21-30 y 21-38)

Apoptosoma Heptámero grande con forma de disco de la Apaf-1 de mamíferos, una proteína que se ensambla en respuesta a señales de apoptosis y sirve como maquinaria de activación para las **caspasas** iniciadoras y efectoras. (Fig. 21-39)

Archaea Clase de **procariontes** que constituye uno de los tres linajes evolutivos distintivos de los organismos actuales; también llamados *arqueobacterias* y *archaeans*. En cierta forma, estos archaeas son más parecidos a los **eucariontes** que a las **bacterias** (eubacterias). (Figs. 1-1)

Áster Estructura compuesta de microtúbulos (fibras astrales) que se irradian hacia afuera desde un **centrosoma** durante la mitosis. (Fig. 18-37)

Astrocitos Células gliales con forma de estrella presentes en el cerebro y la médula espinal que realizan varias funciones, incluidos el mantenimiento de las células endoteliales que forman la barrera hematoencefálica, la conservación de la composición de iones extracelulares y el aporte de nutrientes a las neuronas.

ATM/ATR Dos proteínas relacionadas con las cinasas que son activadas por el daño al DNA. Una vez activadas, fosforilan a otras proteínas para iniciar la respuesta celular al DNA dañado.

Átomo de carbono asimétrico Átomo de carbono unido a cuatro átomos o grupos químicos diferentes; también llamado *átomo de carbono quiral*. Los enlaces se pueden disponer de dos formas diferentes y producir **estereoisómeros** que son imágenes especulares entre sí. (Fig. 2-4)

ATP (adenosina 5'-trifosfato) Nucleótido que es la molécula más importante para la captación y transferencia de **energía libre** en las células. La hidrólisis de cada uno de los dos **enlaces fosfoanhidridos** en el ATP libera una gran cantidad de energía que se puede usar para alimentar los procesos celulares que requieren energía. (Fig. 2-31)

ATP sintasa Complejo proteico multimérico en la membrana mitocondrial interna, las membranas tilacoides de los cloroplastos y la membrana plasmática bacteriana que cataliza la síntesis de ATP durante la fosforilación oxidativa y la fotosíntesis; también llamada *complejo F_0F_1* . (Fig. 12-26a)

ATPasa Uno de los grupos grandes de enzimas que catalizan la hidrólisis del ATP para producir ADP y fosfato inorgánico con liberación de energía libre. Véase también **ATPasa de Na⁺/K⁺** y **Bomba activada por ATP**.

ATPasa de Na⁺/K⁺ Bomba activada por ATP clase P que usa la hidrólisis de una molécula de ATP para exportar iones Na⁺ e importar iones K⁺; es responsable en gran parte del mantenimiento de las concentraciones intracelulares normales de Na⁺ (bajo) y K⁺ (alto) en las células animales; comúnmente llamada *bomba de sodio-potasio*. (Fig. 11-13)

ATR Véase **ATM/ATR**

Aurora B Cinasa Cinasa que desestabiliza las interacciones defectuosas microtúbulo-cinetocoro fosforilando los componentes unidos a los microtúbulos dentro del cinetocoro.

Aurora Cinasa Serina/treonina cinasas que cumplen una función crítica en la división celular porque controlan la segregación de las cromátidas. La **Aurora B cinasa** desestabiliza las interacciones defectuosas microtúbulo-cinetocoro al fosforilar los componentes a los microtúbulos dentro del cinetocoro. También se conocen como *Aurora cinasas* o *Aurora quinasas*.

Autocrino Referido al mecanismo de señalización por el cual una célula produce una molécula de señalización (p. ej., factor de crecimiento) y luego responde a ella.

Autofagia Literalmente “comerse a sí mismo”; proceso por el cual las proteínas citosólicas y los orgánulos son llevados a los lisosomas, degradados y reciclados. La autofagia implica la formación de una vesícula de doble membrana llamada autofagosoma o vesícula autofágica. (Fig. 14-35)

Autorradiografía Técnica para la visualización de moléculas radioactivas en una muestra (p. ej., un corte de tejido o gel electroforético) mediante su exposición a una película electrofotográfica (emulsión) o a un detector electrónico bidimensional. La película expuesta también se conoce como *autorradiograma*.

Autosoma Cualquier cromosoma diferente de los cromosomas sexuales.

Axón Prolongación larga que se extiende desde el cuerpo celular de una neurona que es capaz de conducir un impulso eléctrico (**potencial de acción**), generado en la unión con el cuerpo celular, hacia su extremo distal ramificado (la terminal axónica). (Fig. 22-1)

Axonema Haz de **microtúbulos** y proteínas asociadas presentes en los **cilios** y **flagelos** y responsables de sus estructuras y movimientos. (Fig. 18-30)

Bacteria Clase de **procariontes** que constituyen uno de los tres linajes evolutivos distintivos de los organismos actuales, también llamadas *eubacterias*. Filogenéticamente distinto de las *archaea* y los **eucariontes**. (Fig. 1-1)

Bacteriófago (fago) Cualquier virus que infecta células bacterianas. Algunos fagos son ampliamente utilizados como **vectores** en la **clonación de DNA**.

Balsa lipídica Microdominio en la membrana plasmática rico en colesterol, esfingomielina y ciertas proteínas.

Basal Véase **Basolateral**

Base Cualquier compuesto, que generalmente contiene nitrógeno, que puede aceptar un protón (H⁺) de un ácido. También, suele usarse para nombrar a las **purinas** y las **pirimidinas** en el DNA y el RNA.

Basolateral En referencia a la base y la cara lateral de una célula polarizada, un órgano u otra estructura corporal. En el caso de las células epiteliales, la superficie basolateral linda con las células adyacentes y la **lámina basal** subyacente (Fig. 20-9)

Benigno Referido a un tumor, que contiene células que se asemejan a las normales. Los tumores benignos permanecen en el tejido donde se originan pero pueden dañar debido a su crecimiento continuo. Véase también **Maligno**.

Biblioteca de DNA Colección de moléculas de DNA clonado que consiste de fragmentos de todo el genoma (*biblioteca genómica*) o de copias de DNA de todos los mRNA producidos por un tipo celular (*biblioteca de cDNA*) insertados dentro de un **vector** de clonación adecuado.

Bicapa fosfolipídica Estructura similar a una hoja de dos capas en la cual los grupos de cabeza polar de los fosfolípidos están expuestos al medio acuoso a cada lado y las cadenas no polares de los ácidos grasos están en el centro; la base de todas las membranas. (Fig. 10-3a, b)

Biorientado Indica que los cinetocoros de las **cromátidas hermanas** se han unido a los microtúbulos que surgen de los husos de los polos opuestos.

Blastocisto Estadio embrionario de los mamíferos compuesto de ≈64 células que se han separado en dos tipos celulares: el **trofoectodermo**, que formará los tejidos extra embrionarios, y la **masa celular interna**, que dará lugar al embrión propiamente dicho; estadio que se implanta en la pared uterina y se corresponde con la blástula de otros embriones animales. (Fig. 21-3)

Blastoporo La primera abertura que se forma durante la embriogénesis de los animales con simetría bilateral, que luego se convierte en intestino. Esta abertura puede convertirse en la boca o en el ano.

Bomba activada por ATP Cualquier proteína transmembrana con actividad ATPasa y que asocia la hidrólisis de ATP con el transporte activo de uno o pequeña molécula a través de una biomembrana en contra de su gradiente electroquímico; suele llamarse simplemente *bomba*. (Fig. 11-9)

Cadena de transporte de electrones Complejo de cuatro complejos multiproteicos en la membrana mitocondrial interna más el citocromo c y la coenzima Q difusibles a través de los cuales fluyen los electrones desde los donantes de electrones reducidos (p. ej., NADPH) al O₂. Cada miembro de la cadena contiene uno o más **transportadores de electrones** unidos. (Fig. 12-16)

Cadena lateral En los aminoácidos, grupo sustituyente variable unido al **átomo de carbono alfa** que determina en gran medida las propiedades particulares de cada aminoácido; también denominado *grupo R*. (Fig. 2-14)

Cadherinas Familia de **moléculas de adhesión celular** diméricas que se agrupan en las uniones de adherencia y los desmosomas y median interacciones homofílicas intercelulares dependientes de Ca^{2+} . (Fig. 20-2)

Caja de destrucción Motivo de reconocimiento en los sustratos APC/C.

Caja TATA Secuencia conservada en el **promotor** de muchos genes que codifican proteínas en los eucariontes, donde se ensambla el complejo de inicio de la transcripción. (Fig. 7-14)

Calmodulina Proteína reguladora citosólica pequeña que une cuatro iones Ca^{2+} . El complejo Ca^{2+} /calmodulina se une a muchas proteínas y las activa o las inhibe. (Fig. 3-31)

Canales Proteínas de membrana que transportan agua, iones, o pequeñas moléculas hidrófilas a través de la membrana a favor de sus gradientes de concentración o potenciales eléctricos.

Canales de K^+ en reposo Canales de ion K^+ no regulados en la membrana plasmática, que junto con la elevada concentración de K^+ producida por la **ATPasa Na^+/K^+** son los principales responsables de la generación de un **potencial de membrana** en reposo negativo en el interior en las células animales.

Cáncer Término general para cualquiera de los diversos tumores malignos, cuyas células crecen y se dividen más rápidamente de lo normal, invaden los tejidos circundantes, y se disemina (metástasis) hacia otros tejidos.

Cápside Cubierta proteica exterior de un virus formada por múltiples copias de una o más subunidades proteicas y que rodean el ácido nucleico viral.

Cara citosólica La cara de una membrana celular dirigida hacia el citosol. (Fig. 10-5)

Cara exoplasmática Cara de una membrana celular dirigida hacia afuera del citosol. (Fig. 10-5)

Carbono alfa ($\text{C}\alpha$) En los aminoácidos, el átomo de carbono central que está unido a cuatro grupos químicos diferentes (excepto en la glicina) incluida la **cadena lateral**, o grupo *R*. (Fig. 2-4)

Carcinógeno Cualquier sustancia química o agente físico que puede causar cáncer cuando las células u organismos son expuestos a ellos.

Carga energética Medida de la fracción de adenosina fosfato total que tiene enlaces fosfoanhídridos de "alta energía", que es igual a $([\text{ATP}] + 0,5 [\text{ADP}])/([\text{ATP}] + [\text{ADP}] + [\text{AMP}])$.

Carioferina Parte de una familia de proteínas de transporte nuclear que funciona como una **importina** o una **exportina**. Cada carioferina

se une a una secuencia de señalización específica en las proteínas de carga que se mueven hacia adentro o afuera del núcleo.

Cariotipo Número, tamaño y forma de un conjunto completo de cromosomas en metafase de una célula eucarionte. (Capítulo 6, figura de apertura)

Cascada de señalización Vía activada por un acontecimiento intra o extracelular que luego transmite la señal a un **efector**.

Caspasas Clase de enzimas de vertebrados que degradan proteínas (proteasas) que funcionan en la **apoptosis** y actúan en una cascada en la que cada tipo activa al siguiente. (Figs. 21-33 y 21-38)

Catabolismo Degradación celular de moléculas complejas a unas simples acompañada de liberación de energía. El **anabolismo** es el proceso inverso, en el que la energía se usa para sintetizar moléculas complejas a partir de otras más simples.

Catalizador Sustancia que aumenta la velocidad de una reacción química sin sufrir un cambio permanente en su estructura. Las enzimas son proteínas con actividad catalítica, y las ribozimas son moléculas de RNA que funcionan como catalizadores. (Fig. 3-20)

Catión Ion con carga positiva

CDK de la fase G_1/S Complejo ciclinas-CDK que promueve la entrada en el ciclo celular junto con el CDK G_1 .

CDK de la fase S Complejos CDK-ciclina que promueven la iniciación de la replicación del DNA.

CDK G_1 Complejo ciclinas-CDK que promueve la entrada en el ciclo celular.

CDK mitóticas Complejos de ciclina-CDK que estimulan el inicio y la progresión a la mitosis.

cDNA (DNA complementario) Molécula de DNA copiada a partir de una molécula de mRNA por la **transcriptasa inversa** y, por lo tanto, carece de los **intrones** presentes en el DNA del genoma.

Cebador (*primer*) Secuencia corta de ácido nucleico que contiene un grupo 3' hidroxilo libre que forma **pares de bases** con una hebra molde complementaria y actúa como el punto de inicio para la adición de nucleótidos para copiar la hebra molde.

Célula B Linfocito que madura en la médula ósea y expresa receptores antígeno-específicos (**inmunoglobulinas** unidas a la membrana). Después de interactuar con el antígeno, una célula B prolifera y se diferencia en una **célula plasmática** secretora de **anticuerpos**.

Célula dendrítica Células fagocíticas especializadas **presentadoras de antígenos** que residen en diversos tejidos y pueden detectar patrones globales de marcadores de patógenos mediante sus **receptores tipo Toll**. Después de internalizar al antígeno en un sitio de lesión o infección del tejido, migran hacia los ganglios linfáticos e inician la activación de las **células T**. (Fig. 23-6)

Célula germinal En los organismos de reproducción sexual, cualquier célula que potencialmente puede contribuir a la formación de la descendencia, incluidos gametos y sus precursores inmaduros; también llamada *célula de línea germinal*. Véase también **Célula somática**.

Célula madre (*stem cell*) Célula que se autorrenueva, capaz de dividirse *simétricamente* para dar origen a dos células hijas cuyos potenciales de desarrollo son idénticos al de la célula madre progenitora o *asimétricamente* para generar células hijas con diferentes potenciales de desarrollo. (Fig. 21-8)

Célula madre embrionaria (*embryonic stem cell*) Línea de células cultivadas derivadas de embriones muy tempranos que pueden diferenciarse en una amplia variedad de tipos celulares ya sea in vitro o después de la reinserción dentro de un embrión huésped. (Fig. 21-5)

Célula madre mesenquimatosa Clase de célula madre de la médula ósea que puede diferenciarse en adipocitos, osteoblastos (células formadoras de hueso) y células productoras de cartilago; algunas también pueden producir músculo y otros tipos de células diferenciadas.

Célula madre pluripotente inducida (iPS, *induced pluripotent stem cell*) Célula de los mamíferos con propiedades de una célula madre embrionaria que se forma a partir de un tipo celular diferenciado por expresión de uno o más factores de transcripción u otros genes que confieren pluripotencialidad.

Célula natural killer (NK) Componente del sistema inmunitario innato que detecta de manera inespecífica y mata células infectadas por virus y células tumorales. (Fig. 23-5)

Célula presentadora de antígenos (APC) Cualquier célula que puede digerir un antígeno en péptidos pequeños y desplegarlos junto con las moléculas MHC clase II sobre la superficie celular donde pueden ser reconocidos por las células T. Las APC *profesionales* (células dendríticas, macrófagos, y linfocitos B) expresan las moléculas MHC clase II de manera constitutiva. (Figs. 23-25 y 23-26)

Célula progenitora Tipo de célula indiferenciada que, ante las señales adecuadas, se dividirá y diferenciará en uno o unos pocos tipos celulares.

Célula somática Cualquier célula animal o vegetal diferente a una **célula germinal**.

Célula T Linfocito que madura en el timo y expresa receptores antígeno-específicos que se unen a péptidos antigénicos que forman complejos con las **moléculas del MHC**. Existen dos clases principales: las células T *citotóxicas* (marcador de superficie CD8, restringidas para MHC clase I, que eliminan células infectadas por virus y células tumorales) y células T *helper* (marcador CD4, restringidas para MHC clase II, que producen citocinas, requeridas para la activación de células B). (Figs. 23-32 y 23-25)

Celulosa Polisacárido estructural compuesto de unidades de glucosa unidas por **enlaces glucosídicos** $\beta(1 \rightarrow 4)$. Forma microfibrillas largas, que son los principales componentes de la **pared celular** en las plantas.

Centríolo Cualquiera de dos estructuras especializadas dentro del centrosoma de las células animales y que contienen nueve grupos de tripletes de microtúbulos; estructuralmente similar a un **cuerpo basal**. (Fig. 18-6)

Centro organizador de microtúbulos Véase MTOC

Centrómero Secuencia de DNA necesaria para la **segregación** adecuada de cromosomas durante la mitosis y la meiosis; la región de los cromosomas mitóticos donde se forma el **cinetocoro** y que parece una constricción. (Fig. 6-39)

Centrosoma (centro celular) Estructura localizada cerca del núcleo de las células animales que es el **centro organizador de microtúbulos** primario (MTOC); contiene un par de **centríolos** inmersos en una matriz proteica y se duplica antes de la mitosis, cuando cada centrosoma se convierte en un huso. (Figs. 18-6 y 18-35)

Cepa celular Población de células cultivadas, de origen animal o vegetal, que tienen un período de vida finito y finalmente mueren, en general después de 25-30 generaciones. (Fig. 9-1a)

Chaperona Término colectivo para dos tipos de proteínas (**chaperonas moleculares** y **chaperoninas**) que evitan el plegamiento incorrecto de proteínas diana o facilitan activamente el adecuado plegamiento de una proteína diana plegada de forma incompleta, respectivamente. (Figs. 3-16 y 3-17)

Chaperonas moleculares Véase **Chaperonas**.

Chaperonina Véase **Chaperona**

Ciclina Cualquiera de las diversas proteínas relacionadas cuyas concentraciones se elevan y descienden durante el transcurso del ciclo celular eucarionte. Las ciclinas forman complejos con las **quinasas dependientes de ciclinas**, y así activan y determinan la especificidad de sustrato de estas enzimas.

Ciclo del ácido cítrico Conjunto de nueve reacciones acopladas que tienen lugar en la matriz de las **mitocondrias** donde se oxidan los grupos acetilos, generando CO_2 e intermediarios reducidos usados para producir ATP; también denominado *Ciclo de Krebs* y *ciclo de los ácidos tricarboxílicos* (TCA). (Fig. 12-10)

Ciclo celular Secuencia ordenada de acontecimientos en los que una célula eucarionte duplica sus cromosomas y se divide en dos. El ciclo celular normalmente consiste de cuatro fases: G_1 antes de que se produzca la síntesis del DNA; S cuando se produce la replicación del DNA; G_2 después de la síntesis del DNA; y M cuando se produce la **división celular** para dar dos células hijas. Bajo ciertas condiciones, la célula abandona el ciclo celular durante G_1 y permanece en la etapa G_0 como célula que no se divide. (Figs. 1-16 y 19-1)

Ciclo de Calvin Principal vía metabólica para fijar el CO_2 en los hidratos de carbono durante la fotosíntesis; también se conoce como *fijación del carbono*. Depende indirectamente de la luz pero puede producirse tanto en la oscuridad como en la luz. (Fig. 12-46)

Cilio Estructura corta rodeada por una membrana que se extiende desde la superficie de las células eucariontes y contiene un haz central

de **microtúbulos**. Los cilios suelen encontrarse en grupos y golpean rítmicamente para mover una célula (p. ej., un microorganismo unicelular) o para mover partículas pequeñas o líquidos a lo largo de una superficie (p. ej., células traqueales). Véase también **Axonema** y **Flagelo**.

Cinasa Enzima que transfiere el grupo fosfato (γ) terminal desde el ATP hasta un sustrato. Las proteinquinasas, que fosforilan residuos específicos de serina, treonina o tirosina, cumplen un papel crítico en la regulación de la actividad de muchas proteínas celulares. Véase también **Fosfatasas**. (Fig. 3-33)

Cinasa activadora de CDK (CAK, *CDK-activating kinase*) Fosforila las CDK en un residuo de treonina cerca del sitio activo. Esta fosforilación es esencial para la actividad CDK.

Cinasa dependiente de ciclina (CDK) Proteinquinaasa que es catalíticamente activa solo cuando se une a una ciclina. Varios complejos ciclina-CDK desencadenan la progresión a través de diferentes etapas del ciclo celular eucarionte mediante la fosforilación de proteínas diana específicas. (Cuadro 19-1)

Cinasa JAK Clase de proteínas tirosinquinasa unidas al dominio citosólico de los receptores de citocinas y activadas por la unión de la citocina.

Cinasa de polo Familia de proteinquinasas que son críticas para muchos aspectos de mitosis, como la duplicación de centrosomas y la eliminación de la cohesina de los cromosomas.

Cinesinas Clase de **proteínas motoras** que usan la energía liberada por la hidrólisis del ATP para moverse hacia el extremo (+) de un **microtúbulo**. Las cinesinas pueden transportar vesículas u orgánulos, y cumplir un papel en el movimiento de cromosomas durante la mitosis. (Fig. 18-8 a 18-20)

Cinetocoro Estructura proteica multicapa localizada en o cerca del **centrómero** de cada cromosoma mitótico a partir del cual se extienden los microtúbulos hacia los polos del huso de la célula; cumple un papel activo en el movimiento de cromosomas hacia los polos durante la anafase. (Fig. 18-39)

Cisterna Compartimiento aplanado rodeado por una membrana, como se encuentra en el complejo de Golgi y el retículo endoplasmático.

Citocina Cualquiera de las numerosas pequeñas proteínas secretadas (p. ej., eritropoyetina, G-CSF, interferones, interleucinas) que se unen a los receptores de la superficie celular en las células sanguíneas y del sistema inmunitario para desencadenar su diferenciación o proliferación.

Citocinesis División del citoplasma después de la **mitosis** realizada para generar dos células hijas, cada una con un núcleo y los orgánulos citoplasmáticos. (Fig. 17-36)

Citocromo Grupo de proteínas coloreadas que contienen hemo, algunas de las cuales actúan como **transportadores de electrones** durante la respiración celular y la fotosíntesis. (Fig. 12-14a)

Citoesqueleto Retículo de elementos fibrosos formado principalmente por **microtúbulos**, **microfilamentos** y **filamentos intermedios**, hallados en el citoplasma de las células eucariontes. El citoesqueleto proporciona organización y soporte estructural a la célula y permite el movimiento dirigido de los orgánulos, los cromosomas y la célula misma. (Figs. 17-1, 17-2 y 18-1)

Citoplasma Contenido viscoso de una célula que se encuentran dentro de la membrana pero, en las células eucariontes, fuera del núcleo.

Citosol Fase acuosa desestructurada del citoplasma excluidos los orgánulos, las membranas y los componentes citoesqueléticos insolubles.

Clatrina Proteína fibrosa que, con la ayuda de proteínas de ensamblaje, se polimeriza y produce un retículo similar a un enrejado en regiones específicas sobre la cara citosólica de una membrana, de manera que forma una invaginación o fosa recubierta de clatrina que por gemación forma una vesícula. (Fig. 14-18; Cuadro 14-1)

Clon (1) Población de células, virus o microorganismos genéticamente idénticos que descienden de un ancestro común. (2) Múltiples copias idénticas de un gen o fragmento de DNA generado y mantenido por **clonación de DNA**.

Clonación de DNA Técnica de DNA recombinante en la cual cDNA específicos o fragmentos de DNA genómico se insertan en un **vector** de clonación, que luego se incorpora a células huésped cultivadas y se mantienen durante el crecimiento de las células huésped; también llamada **clonación génica**. (Fig. 5-14)

Clorofilas Grupo de pigmentos de porfirinas que absorben luz y que son críticos para la **fotosíntesis**. (Fig. 12-33)

Cloroplasto Orgánulo especializado de las células de las plantas que está rodeado por una membrana doble, contiene membranas internas con clorofila (**tilacoides**) donde se producen las reacciones de fotosíntesis que absorben luz. (Fig. 12-31)

Código genético Conjunto de reglas por las cuales los tripletes nucleotídicos (**codones**) en el DNA o el RNA especifican aminoácidos en las proteínas. (Cuadro 4-1)

Codón Secuencia de tres nucleótidos en el DNA o mRNA que especifica un aminoácido en particular durante la síntesis proteica; también llamado **tripleto**. De los 64 codones posibles, 3 son codones de detención, que no especifican aminoácidos y provocan la terminación de la síntesis. (Cuadro 4-1)

Colágeno Glucoproteína de triple hélice rica en glicina y prolina que es un componente de la **matriz extracelular** y los tejidos conjuntivos (conectivos). Los numerosos subtipos difieren en su distribución tisular y en los componentes extracelulares y las proteínas de la superficie celular con los cuales se asocian. (Fig. 20-24; Cuadro 20-4)

Colesterol Lípido que contiene una estructura de cuatro anillos esteroideos con un grupo hidroxilo en uno de ellos; componente de muchas membranas eucariontes y el precursor de las hormonas esteroideas, los ácidos biliares y la vitamina D. (Fig. 10-8c)

Combinación de exones (*exon shuffling*) Proceso evolutivo para la creación de nuevos genes (o sea, nueva combinación de exones) a partir de unos preexistentes mediante recombinación entre intrones de dos genes separados o por transposición de elementos móviles del DNA. (Figs. 6-18 y 6-19)

Comienzo de la transcripción Proceso por el cual una RNA polimerasa separa las hebras de DNA y sintetiza el primer enlace fosfodiéster de una hebra de RNA tomando como molde la hebra de DNA que entra en el sitio activo de la RNA polimerasa. (Fig. 4-11)

Complejo de cohesina Complejo de proteínas que establece cohesión entre las **cromátidas hermanas**.

Complejo condensina Complejo proteico relacionado con las cohesinas que compacta cromosomas y es necesario para su segregación durante la mitosis.

Complejo de corte/poliadenilación Gran complejo multiproteico que cataliza el corte del **pre-mRNA** en el sitio 3' poli(A) y la adición inicial de residuos de adenilato para formar la cola de poli(A). (Fig. 8-15)

Complejo del factor de transcripción E2F Factor de transcripción que promueve la transcripción de ciclinas de fase G₁/S y muchos otros genes cuya función es necesaria para la fase S.

Complejo F₀F₁ Véase **ATP sintasa**

Complejo de Golgi Apilamiento de compartimientos de membrana aplanados (cisternas) interconectados en las células eucariontes que actúan en el procesamiento y la clasificación de proteínas y lípidos destinados a otros compartimientos celulares o para la secreción; también llamado *aparato de Golgi*. (Fig. 9-28)

Complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) Conjunto de genes adyacentes que codifican las moléculas del MHC clase I y clase II y otras proteínas requeridas para la presentación del antígeno, y también algunas proteínas del complemento; llamado *complejo H-2* en ratón y *complejo HLA* en los seres humanos. (Fig. 23-19)

Complejo monopolina Complejo proteico que promueve la coorientación de las **cromátidas hermanas** durante la meiosis I en la gemación de levaduras.

Complejo de poro nuclear (CPN) Estructura multiproteica grande compuesta en su mayor parte de nucleoporinas, que se extienden a través de la envoltura nuclear. Los iones y las pequeñas moléculas difunden libremente a través de los CPN; las proteínas grandes y las partículas de ribonucleoproteínas se transportan de manera selectiva a través de los CPN con la ayuda de proteínas solubles. (Fig. 13-33a y b)

Complejo promotor de la anafase o ciclosoma (APC/C) Una ubiquitina ligasa que marca a la securina, las ciclinas mitóticas y otras proteínas para la degradación proteosómica del inicio de la anafase hasta la entrada en el subsiguiente ciclo celular.

Complejo de reconocimiento a través del exón Gran ensamblaje que incluye proteínas SR de unión al RNA y otros componentes que

ayuda a reconocer a los exones en los **pre-mRNA** de los eucariontes superiores y asegura el correcto **corte y empalme del RNA**. (Fig. 8-13)

Complejo de ribonucleoproteína (RNP) Término general para cualquier complejo compuesto por proteínas y RNA. La mayoría de las moléculas de RNA están presentes en la célula en la forma de RNP.

Complejo silenciador inducido por RNA (RISC, *RNA-induced silencing complex*) Complejo multiproteico grande asociado con un RNA hebra simple corto (**siRNA** o **miRNA**) que media la degradación o la represión traduccional de un mRNA complementario o casi complementario.

Complejo sinaptonémico Estructura proteica que media la asociación (sinapsis) entre cromosomas homólogos durante la profase de la meiosis I.

Complementación funcional Procedimiento de búsqueda de una genoteca de DNA para identificar el gen de tipo silvestre que restablece la función de un gen defectuoso en un mutante en particular. (Fig. 5-18)

Complementación genética Restauración de una función de tipo silvestre en las células heterocigotas diploides generadas a partir de células haploides, cada una de ellas portadora una mutación en un gen diferente cuya proteína codificada es requerida para la misma vía bioquímica. El análisis por complementación puede determinar si las mutaciones recesivas de dos mutantes con el mismo fenotipo están en el mismo gen o en genes diferentes. (Fig. 5-7)

Complementariedad molecular Ajuste del tipo cerradura y llave entre las formas, las cargas, la hidrofobicidad u otras propiedades físicas de dos moléculas o fragmentos de ellas que permiten la formación de múltiples **interacciones no covalentes** a corta distancia. (Fig. 2-12)

Complementario (1) Referido a dos secuencias de ácido nucleico o hebras, que pueden formar **pares de bases** perfectos una con otras. (2) Describe regiones en dos moléculas que interactúan (p. ej., una enzima y su sustrato) y que encajan entre sí en un ajuste del tipo llave y cerradura.

Complemento Grupo de proteínas séricas constitutivas que se unen directamente a las superficies de los microbios y de los hongos, activando de esta forma una cascada proteolítica que culmina en la formación del *complejo citolítico de ataque a la membrana*. (Fig. 23-4)

Conexinas Familia de proteínas transmembrana que forman **uniones de hendidura** en los vertebrados. (Fig. 20-20)

Conformación La forma tridimensional precisa de una proteína u otra macromolécula que resulta de la localización espacial de los átomos en la molécula. (Fig. 3-8)

Constante de asociación (K_a) Véase **Constante de equilibrio**

Constante de disociación (K_d) Véase **Constante de equilibrio**

Constante de equilibrio (K_{eq}) Cociente de las constantes de velocidad directa e inversa para una reacción. Para una reacción de unión, $A + B \leftrightarrow AB$, la constante de asociación (K_a) es igual a K , y la constante de disociación (K_d) es igual a $1/K$.

Constante de Michaelis Véase K_m .

Constante de velocidad Constante que relaciona las concentraciones de los reactivos con la velocidad de una reacción química.

Constitutivo Referido a la producción o actividad continuas de una molécula celular o al funcionamiento continuo de un proceso celular (p. ej., secreción constitutiva) que no está regulado por señales internas o externas.

Control génico Todos los mecanismos involucrados en la regulación de la **expresión génica**. El más común es la regulación de la transcripción, aunque los mecanismos que influyen en el procesamiento, la estabilización, y la traducción de los mRNA contribuyen a controlar la expresión de algunos genes.

Control respiratorio Dependencia de la oxidación mitocondrial del NADH y el FADH al ADP y el P_i para la síntesis de ATP.

Conversión génica Tipo de recombinación del DNA en el que una secuencia de DNA es convertida en la secuencia de un segundo DNA homólogo en la misma célula.

Coorientado Indica que los cinetocoros hermanos se unen a los microtúbulos que nacen del *mismo* huso de los polos en lugar de los polos opuestos.

COPI Clase de proteínas que recubren las vesículas de transporte en la **vía secretora**. Las vesículas cubiertas con COPI mueven proteínas desde el aparato de Golgi hacia el retículo endoplasmático y desde las cisternas tardías hacia las cisternas tempranas del Golgi.

COPII Clase de proteínas que recubren las vesículas de transporte en la **vía secretora**. Las vesículas cubiertas con COPII mueven proteínas desde el retículo endoplasmático hacia el aparato de Golgi.

Corriente abajo Eventos que se producen en una etapa posterior en una cascada de pasos (p. ej., vía de señalización). Véase también **Corriente arriba**.

Corriente arriba Eventos que se producen en una etapa temprana en una cascada de pasos (p. ej., vía de señalización). Véase también **Corriente abajo**.

Corte y empalme (procesamiento) del RNA Proceso que produce la eliminación de intrones y la unión de exones en los pre-mRNA. Véase también **Espliceosoma**. (Figs. 8-8 y 8-9)

Corte y empalme alternativo (*alternative splicing*) Proceso por el cual los exones de un pre-mRNA son empalmados en diferentes combinaciones, generando dos o más mRNA maduros diferentes a partir de un único pre-mRNA. (Fig. 4-16). También llamado procesamiento alternativo.

Cotransporte Movimiento mediado por proteínas de un ion o molécula pequeña a través de una membrana en contra de su gradiente de concentración e impulsado por su acoplamiento al movimiento de una segunda molécula a favor de su gradiente de concentración en la misma dirección (cotransporte **unidireccional** o **simporte**) o en la dirección opuesta (cotransporte **bidireccional** o **antiporte**). (Fig. 11-2, [3b, c]; Cuadro 11-1)

Cremallera de leucina (*leucine zipper*) Tipo de **motivo estructural** de enrollamiento al azar compuesto por dos hélices que forman homodímeros específicos; motivo común en muchos factores de transcripción eucariontes. Véase **Espiral enrollada**. (Figs. 7-29c y 3-9)

Cristalografía de rayos X Técnica que suele usarse para determinar la estructura tridimensional de macromoléculas (en particular proteínas y ácidos nucleicos) al pasar rayos X a través de un cristal de las moléculas purificadas y analizar el patrón de difracción de los puntos resultantes. (Fig. 3-43)

Cromátida Copia de un cromosoma replicado, formada durante la fase S del ciclo celular, que está unida a la otra copia; también llamadas **cromátidas hermanas**. Durante la mitosis, las dos cromátidas hermanas se separan y cada una se convierte en un cromosoma de una de las dos células hijas. (Fig. 6-39)

Cromátidas hermanas Las dos moléculas de DNA idénticas creadas durante la replicación del DNA y las proteínas cromosómicas asociadas. Después de la replicación del DNA, cada cromosoma está compuesto de dos cromátidas hermanas.

Cromatina Complejo de DNA, histonas y proteínas no histonas a partir de las cuales se forman los cromosomas eucariontes. La condensación de la cromatina durante la mitosis produce los cromosomas visibles en la **metafase**. (Figs. 6-28 y 6-30)

Cromatografía líquida Grupo de técnicas bioquímicas para separar mezclas de moléculas (p. ej., proteínas diferentes) sobre la base de sus masas (**cromatografía de filtración en gel**), sus cargas (**cromatografía de intercambio iónico**) o la capacidad de unirse a otras moléculas específicas (**cromatografía de afinidad**). (Fig. 3-38)

Cromosoma En los eucariontes, la unidad estructural del material genético que consiste en una única molécula lineal de DNA doble hebra y las proteínas asociadas. En la mayoría de los procariontes, una molécula circular de DNA doble hebra constituye el grueso del material genético. Véase también **Cromatina** y **Cariotipo**.

Cromosoma homólogo Una de las dos copias de cada tipo morfológico de cromosoma presente en una célula **diploide**. Cada homólogo deriva de un progenitor diferente.

Cromosoma politénico Cromosoma gigante compuesto por muchas copias paralelas de sí mismo formada por múltiples ciclos de replicación del DNA sin separación cromosómica; se encuentra en las glándulas salivales y algunos otros tejidos de la mosca *Drosophila* y otros insectos dípteros. (Fig. 6-43)

Cuerpo basal Estructura en la base de un **cilio** o un **flagelo** desde donde se irradian los microtúbulos que forman el **axonema**; estructuralmente similar al centriolo. (Fig. 18-30)

Cuerpo nuclear Región en el núcleo aproximadamente esférica, funcionalmente especializada, que contiene proteínas específicas y RNA; cumple funciones en el ensamblaje de los complejos de ribonucleoproteínas (RNP). El tipo más prominente es el **nucléolo**.

Cuerpo P Dominio citoplasmático denso, que no contiene ribosomas ni factores de traducción y actúa en la represión de la traducción y la degradación del mRNA asociado; también denominado *cuerpo de procesamiento del RNA citoplasmático*.

Cuerpos polares del huso Estructuras funcionalmente análogas a los centrosomas en las levaduras.

DAG Véase **Diacilglicerol**

Dalton Unidad de masa molecular equivalente a la masa de un átomo de hidrógeno ($1,66 \times 10^{-24}$ g).

Dedos de cinc Diversos **motivos** estructurales de unión al DNA relacionados compuestos de estructuras secundarias plegadas alrededor de un ion de cinc; presente en numerosos **factores de transcripción** eucariontes. (Figs. 3-9b, 7-29 a y b).

Dendrita Prolongación que se extiende desde el cuerpo celular de una neurona, es relativamente corta, suele ramificarse y recibe señales provenientes de los axones de otras neuronas. (Fig. 22-1)

Desacoplante Cualquier sustancia natural (p. ej., la proteína termogenina) o agente químico (p. ej., 2,4-dinitrofenol) que disipa la **fuerza protón-motriz** a través de la membrana mitocondrial interna o la membrana de tilacoide de cloroplastos, inhibiendo así la síntesis de ATP.

Desnaturalización Alteración drástica en la **conformación** de una proteína o ácido nucleico debido a la rotura de varios enlaces no covalentes causada por calentamiento o exposición a ciertos compuestos químicos; en general produce la pérdida de función biológica.

Despolarización Reducción en el potencial eléctrico negativo en la cara citosólica que normalmente existe a través de la membrana plasmática de una célula en reposo, que da como resultado un **potencial de membrana** positivo en el interior o un interior menos negativo.

Determinante En el contexto del reconocimiento de un antígeno por un anticuerpo, es una región en una proteína a la cual se une el anticuerpo. En este contexto, es un sinónimo de **epítipo**.

Deuterostoma Grupo de animales bilateralmente simétricos cuyo ano se desarrolla cerca del blastoporo y tienen un cordón nervioso dorsal. Este grupo incluye todos los cordados (peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos) y los equinodermos (estrellas de mar, erizos de mar).

Diacilglicerol (DAG) **Segundo mensajero** unido a la membrana que puede ser producido por la rotura de **fosfoinosítidos** en respuesta a la estimulación de ciertos receptores de la superficie celular. (Figs. 15-8 y 15-35)

Difusión simple Movimiento neto de una molécula a través de una membrana a favor de su **gradiente de concentración** a una velocidad proporcional al gradiente y a la permeabilidad de la membrana; también llamada *difusión pasiva*.

Dineínas Clase de **proteínas motoras** que usan la energía liberada por la hidrólisis de ATP para moverse hacia el extremo (-) de los **microtúbulos**. Las dineínas pueden transportar vesículas y orgánulos, son las responsables del movimiento de los cilios y flagelos, y cumplen un papel en el movimiento de cromosomas durante la mitosis. (Figs. 18-23 y 18-34)

Diploide En referencia a un microorganismo o una célula, que tienen dos juegos completos de **cromosomas homólogos** y por ende dos copias (**alelos**) de cada gen o locus genético. Las células somáticas contienen el número diploide de cromosomas ($2n$) característico de una especie. Véase también **Haploide**.

Disacárido Hidrato de carbono pequeño (azúcar) compuesto de dos monosacáridos unidos de forma covalente por un enlace glucosídico. (Fig. 2-19)

Diversidad Conjunto de receptores específicos de antígenos codificado por el sistema inmunitario.

División celular Separación de una célula en dos células hijas. En los eucariontes superiores incluye la división del núcleo (**mitosis**) y del citoplasma (**citocinesis**); a menudo se usa el término mitosis para referirse tanto a la división nuclear como a la citoplasmática.

División celular asimétrica Cualquier división celular en la que las dos células hijas reciben los mismos genes pero que heredan componentes diferentes (p. ej., mRNA, proteínas) a partir de la célula progenitora. (Fig. 21-21a)

DNA (ácido desoxirribonucleico) Polímero lineal grande, compuesto de cuatro clases de **nucleótidos** de desoxirribosa, que es el portador de la información genética. Véase también **DNA doble hélice**. (Fig. 4-3)

DNA complementario Véase **cDNA**

DNA de secuencia simple Secuencias cortas repetidas en tándem que se encuentran en los **centrómeros** y los **telómeros** y también en otras localizaciones cromosómicas y no se transcriben; también llamado *DNA satélite*.

DNA ligasa Enzima que une el extremo 3' de un fragmento de DNA con el extremo 5' del otro y forma una cadena continua.

DNA polimerasa Enzima que copia una hebra de DNA (la hebra molde) para sintetizar la hebra complementaria, que compone una nueva molécula de DNA doble hebra. Todas las DNA polimerasas añaden desoxirribonucleótidos de a uno por vez en la dirección 5' $\rightarrow$ 3' a un cebador de hebra de DNA o RNA corto preexistente.

DNA recombinante Cualquier molécula de DNA formada in vitro por la unión de fragmentos de DNA de diferentes fuentes.

DNA satélite Véase **DNA de secuencia simple**

Doble hélice de DNA Estructura tridimensional más común para el DNA celular en el cual las dos cadenas de polinucleótidos son antiparalelas y se enrollan una alrededor de la otra con bases complementarias unidas por enlaces de hidrógeno. (Fig. 4-3)

Dominante En genética, se refieren al alelo de un gen expresado en el **fenotipo** de un heterocigoto; el alelo no expresado es **recesivo**. También se refiere al fenotipo asociado con un alelo dominante. Las mutaciones que producen alelos dominantes en general dan como resultado una ganancia de función. (Fig. 5-2)

Dominante negativo En genética, un alelo que actúa de manera **dominante** pero produce un efecto similar a la pérdida de función; en general es un alelo que codifica una proteína mutante que bloquea el funcionamiento de una proteína normal al unirse a ella o a una proteína **corriente arriba** o **corriente abajo** en su vía de señalización.

Dominio de activación Región de un factor de transcripción que estimulará la transcripción cuando se fusione a un dominio de unión al DNA.

Dominio de represión Región de un factor de transcripción represor que inhibirá la transcripción cuando se fusione al dominio de unión al DNA.

Dominio de unión al DNA Dominio de un factor de transcripción que se une de manera específica a secuencias de DNA estrechamente relacionadas.

Dominio proteico Distintas regiones de la estructura tridimensional de una proteína. Un dominio **funcional** muestra una actividad particular característica de la proteína; un dominio **estructural** tiene ≈ 40 o más aminoácidos de longitud, dispuestos en una estructura secundaria o terciaria; un dominio **topológico** tiene una relación espacial distintiva al resto de la proteína.

Ectodermo La más externa de las tres capas celulares primarias de los embriones animales; da origen a los tejidos epidérmicos, el sistema nervioso y los órganos sensoriales externos. Véase también **Endodermo** y **Mesodermo**.

Edición del RNA Tipo inusual de procesamiento de RNA en el cual la secuencia de un pre-mRNA está alterada.

Efecto hidrófobo Tendencia de las moléculas o partes de moléculas no polares para asociarse unas con otras en soluciones acuosas para minimizar sus interacciones directas con el agua; se suele denominar **interacción o enlace hidrófobo**. (Fig. 2-11)

Efecto Warburg Nombrado en honor a su descubridor, Otto Warburg, describe la observación de que la mayoría de las células cancerosas producen predominantemente energía por glucólisis, seguida por la fermentación de piruvato a ácido láctico. Mientras que las células normales usan esta forma de producción de energía solo bajo condiciones limitantes de oxígeno (anaeróbicas), las células cancerosas metabolizan la glucosa de esta manera incluso en presencia de suficiente oxígeno. Por eso el proceso también se conoce como **glucólisis aeróbica**.

Efector Componente final de una vía de transducción de las señales que provoca una respuesta a la señal transmitida.

Electroforesis Cualquiera de las diversas técnicas para separar macromoléculas según su migración en un gel u otro medio sometido a un campo eléctrico fuerte. (Fig. 3-36)

Elemento móvil del DNA Véase **Elemento transponible del DNA**

Elemento proximal al promotor Cualquier secuencia reguladora del DNA eucarionte que se encuentra dentro de ≈ 200 pares de bases del sitio de inicio de la transcripción. La transcripción de muchos genes está controlada por varios elementos proximales al promotor. (Fig. 7-22)

Elemento transponible del DNA Cualquier secuencia de DNA que no está presente en el mismo lugar del cromosoma en todos los individuos de una especie y puede moverse a una posición nueva mediante **transposición**; también denominado **elemento móvil del DNA** y **repetición dispersa**. (Cuadro 6-1)

Elongación de la transcripción Adición de nucleótidos a una cadena polipeptídica creciente, como molde se usa una cadena codificante de DNA complementario. (Fig. 4-11)

En dirección 3' Para un gen, dirección en que se mueve la RNA polimerasa durante la transcripción, la cual es hacia el extremo con un grupo hidroxilo 5' de la hebra molde de DNA. Los nucleótidos corriente abajo a partir de la posición +1 (el primer nucleótido Transcrito) se designan +2, +3, etc.

En dirección 5' Para un gen, la dirección opuesta a la cual se mueve la RNA polimerasa durante la transcripción. Los nucleótidos corriente arriba a partir de la posición +1 (el primer nucleótido Transcrito) se designan -1, -2, etc.

Endergónico Referente a las reacciones y procesos que tienen una G positiva y por lo tanto requieren un aporte de **energía libre** para producirse; opuesto a **exergónico**.

Endocitosis Término general para la incorporación de un material extracelular por invaginación de la membrana plasmática, que incluye **endocitosis mediada por receptores**, **fagocitosis** y **pinocitosis**.

Endocitosis mediada por receptor Incorporación de materiales extracelulares unidos a receptores de la superficie celular específicos por invaginación de la membrana plasmática para formar una pequeña vesícula unida a la membrana (endosoma temprano). (Fig. 14-29)

Endocrino Referente al mecanismo de señalamiento en el que las células diana unen y responden a una hormona liberada en la circulación sanguínea por células secretoras especializadas que en general se encuentran en una glándula (p. ej., hipófisis o tiroides).

Endodermo La más interna de las tres capas celulares primarias de un embrión animal; da origen al intestino y la mayor parte del aparato respiratorio. Véase **Ectodermo** y **Mesodermo**.

Endosimbionte Bacteria que reside dentro de una célula eucarionte en una relación mutuamente beneficiosa. De acuerdo con la hipóte-

sis endosimbionte, las mitocondrias y los cloroplastos evolucionaron a partir de endosimbiontes. (Fig. 6-20)

Endosoma Uno de dos tipos de compartimientos rodeados por membrana: endosomas *tempranos* (o vesículas endocíticas), que invaginán hacia adentro desde la membrana plasmática en la endocitosis mediada por receptor, y los endosomas tardíos, que tienen un pH interno ácido y actúan en la clasificación de proteínas en los **lisosomas**. (Figs. 14-1 y 14-29)

Endotelio Capa delgada de células que recubre la superficie interior de los vasos sanguíneos y linfáticos.

Endotérmico Referente a las reacciones y procesos que tienen un cambio positivo en la **entalpía**, ΔH , y por lo tanto deben absorber calor para poder producirse; opuesto a **exotérmico**.

Energía de activación Suministro de energía requerido para que, superadas las barreras energéticas, se inicie una reacción química. Al reducir la energía de activación, una **enzima** incrementa la velocidad de una reacción. (Fig. 2-30).

Energía cinética Energía del movimiento, como el movimiento de las moléculas.

Energía libre (G) Medida de la energía potencial de un sistema, que es una función de la **entalpía (H)** y la **entropía (S)**.

Energía potencial Energía almacenada. En los sistemas biológicos, las formas primarias de energía potencial son los enlaces químicos, los gradientes de concentración y los potenciales eléctricos a través de membranas celulares.

Energía química potencial Energía almacenada en los enlaces que conectan los átomos en las moléculas.

Enlace de alta energía Enlace covalente que libera una gran cantidad de energía cuando es hidrolizado en las condiciones intracelulares normales. Los ejemplos incluyen los enlaces fosfoanhídridos en el ATP, el enlace tioéster en el acetilCoA y diversos enlaces ésteres fosfato.

Enlace covalente Fuerza química estable que mantiene unidos a los átomos en las moléculas al compartir uno o más pares de electrones. Véase también **interacción no covalente**. (Figs. 2-2 y 2-6)

Enlace disulfuro (–S–S–) Unión covalente común entre átomos de azufres en dos residuos de cisteína en diferentes polipéptidos o en diferentes partes del mismo polipéptido.

Enlace de hidrógeno **Interacción no covalente** entre un átomo (en general oxígeno o nitrógeno) que porta una carga parcial negativa y un átomo de hidrógeno que porta una carga parcial positiva. Importante en la estabilización de la conformación de proteínas y en la formación de pares de bases entre hebras de ácido nucleicos. (Fig. 2-8)

Enlace fosfoanhídrido Tipo de **enlace de alta energía** formado entre dos grupos fosfatos, como los fosfatos γ y β y los fosfatos β y α en el ATP. (Fig. 2-31)

Enlace fosfodiéster Enlace químico entre nucleótidos adyacentes en el DNA y el RNA; consiste en dos enlaces fosfoéster, uno en el lado 5' del fosfato y otro en el lado 3'. (Fig. 4-2)

Enlace glucosídico Unión covalente entre dos residuos de monosacáridos formados cuando un átomo de carbono en un azúcar reacciona con un grupo hidroxilo en un segundo azúcar con la liberación neta de una molécula de agua (deshidratación). (Fig. 2-13)

Enlace peptídico Enlace amida covalente entre aminoácidos formado entre el grupo amino de un aminoácido y el grupo carboxilo de otro con liberación neta de una molécula de agua (deshidratación). (Fig. 2-13)

Ensayo de placa Técnica para la determinación del número de partículas virales infecciosas en una muestra mediante el cultivo de una muestra diluida en una capa de células huésped susceptibles y posterior recuento de las zonas claras de las células lisadas (placas) que se desarrollan. (Fig. 4-45)

Entalpía (H) Calor; en una reacción química, la entalpía de los reactivos o productos es igual a sus energías de enlace totales.

Entrecruzamiento (crossing-over) Intercambio de material genético entre las cromátidas maternas y paternas de dos cromosomas homólogos durante la meiosis para producir cromosomas recombinados. Véase también **Recombinación**. (Fig. 8-13)

Entropía (S) Medida del grado de desorden o aleatoriedad en un sistema; a mayor entropía, mayor es el desorden.

Envoltura nuclear Estructura de doble membrana que rodea el núcleo; la membrana externa se continua con el retículo endoplasmático y las dos membranas están perforadas por **complejos de poro nuclear**. (Fig. 9-32)

Enzima proteína que cataliza una reacción química particular que involucra un **sustrato** específico o número pequeño de sustratos relativos.

Enzima de restricción (enzima de restricción) Cualquier enzima que reconoce y escinde una secuencia específica corta, el *sitio de restricción*, en las moléculas de DNA de hebra doble; usadas extensivamente para producir DNA recombinante in vitro; también llamada *endonucleasa de restricción*. (Fig. 5-11; Cuadro 5-1)

Epigenético Referido a un proceso que afecta la expresión de genes específicos y es heredado por las células hijas pero no involucra un cambio en la secuencia del DNA.

Epitelio Cubierta similar a una lámina, compuesta de una o más capas de células fuertemente adheridas, en las superficies corporales externas o internas. (Fig. 20-9)

Epítipo Parte de una molécula de antígeno que se une a un receptor específico de ese antígeno en las células B o T, o a un anticuerpo. Los antígenos proteicos grandes suelen tener varios epítipos que se unen a anticuerpos de diferente especificidad.

Equilibrio químico Estado de una reacción química en la cual la concentración de todos los productos y reactantes es constante debido a que las velocidades de las reacciones directa e inversa son iguales.

Eritropoyetina (Epo) Citocina que desencadena la producción de eritrocitos al inducir la proliferación y diferenciación de células progenitoras eritroides en la médula ósea. (Figs. 16-8 y 21-23)

Esfingolípidos Principal grupo de lípidos de membrana, derivados de la esfingosina, que contienen dos cadenas hidrocarbonadas largas y un grupo cabeza fosforilado (esfingomielina) o un grupo cabeza de hidrato de carbono (cerebrósidos, ganglósidos). (Fig. 10-8b)

Especificidad Capacidad de las células inmunitarias o sus productos para distinguir entre moléculas relacionadas muy parecidas estructuralmente.

Espermatozoide Gameto masculino, una célula haploide móvil que puede unirse y fusionarse con un óvulo, formando un cigoto.

Espiral enrollada (coiled coil) Motivo estructural de proteínas marcado por regiones α anfipáticas que pueden autoasociarse para formar estructuras estables en forma de cilindro en las proteínas; por lo general se encuentra en las proteínas fibrosas y en ciertos factores de transcripción. (Fig. 3-9a)

Espliceosoma Complejo ribonucleoproteico grande que ensambla un pre-mRNA y realiza el corte y empalme del RNA. (Fig. 8-11)

Estado estable (de equilibrio dinámico) En las vías metabólicas celulares, condición en la que la velocidad de formación y la velocidad de consumo de una sustancia son iguales, de manera tal que su concentración permanece constante. (Fig. 2-23)

Estado de transición Estado de los reactivos durante una reacción química cuando el sistema está en su nivel de energía más alto; también llamado **estado de transición intermedio**.

Estereoisómeros Dos compuestos con fórmulas moleculares idénticas cuyos átomos están unidos en el mismo orden, pero con disposiciones espaciales diferentes. En los *isómeros ópticos*, designados D y L, los átomos unidos a un **átomo de carbono asimétrico** están dispuestos en un esquema de imagen especular. Los *isómeros geométricos* incluyen las formas *cis* y *trans* de las moléculas que contienen enlaces dobles.

Esteroides Grupo de hidrocarburos de cuatro anillos que incluyen el colesterol y compuestos relacionados. Muchas hormonas importantes (p. ej., los estrógenos y la progesterona) son esteroides. Los *esteroles* son esteroides que contienen uno o más grupos hidroxilos. (Fig. 10-8c)

Estructura cuaternaria Número y posiciones relativas de las cadenas polipeptídicas en las proteínas multiméricas (multisubunidad). (Fig. 3-10b)

Estructura de Holliday Intermediario en la recombinación del DNA con cuatro hebras de DNA. (Fig. 4-43)

Estructura primaria En las proteínas, disposición lineal (secuencia) de aminoácidos dentro de una cadena polipeptídica.

Estructura secundaria En las proteínas, plegamiento local de una cadena polipeptídica en estructuras regulares que incluye la hélice α , la lámina β y el giro β .

Estructura terciaria En las proteínas, forma tridimensional global de una cadena polipeptídica que está estabilizada por múltiples interacciones no covalentes entre cadenas laterales. (Fig. 3-10a)

Eucariontes Clase de microorganismos compuestos por una o más células que contienen un núcleo y orgánulos rodeados por una membrana, que constituye uno de los tres linajes evolutivos diferentes de los microorganismos modelos; también llamados *eucaria*. Incluyen todos los microorganismos excepto los **virus** y los **procariontes**. (Fig. 1-1)

Eucromatina Porciones de **cromatina** menos condensadas presente en los cromosomas interfásicos; incluye las regiones más activas desde el punto de vista de la transcripción. Véase también **Heterocromatina**. (Fig. 6-33a)

Exergónico Referido a las reacciones y procesos que tienen un ΔG negativo y por ende liberan **energía libre** a medida que progresan; opuesto a **endergónico**.

Exocitosis Liberación de moléculas intracelulares (p. ej., hormonas, proteínas de la matriz) contenidas dentro de vesículas rodeadas por membrana mediante fusión de la vesícula con la membrana plasmática de la célula.

Exón Segmento de un gen eucarionte (o de su **transcrito primario**) que alcanza el citoplasma como parte de un mRNA maduro, un rRNA o una molécula de tRNA. Véase también **Intrón**.

Exosoma Complejo grande que contiene exonucleasas que degradan los intrones descartados por procesamiento y los pre-mRNA procesados inapropiadamente en el núcleo o los mRNA con colas de poli(A) acortadas en el citoplasma. (Fig. 8-1)

Exotérmico Referente a las reacciones y procesos que tienen cambio negativo en la **entalpía**, ΔH , y por lo tanto liberan calor a medida que ellas proceden; opuesto de **endotérmico**.

Exportador de mRNP Proteína heterodimérica que se une a las partículas ribonucleoproteicas que contienen mRNA (mRNP, *mRNA containing ribonucleoprotein particles*) y dirige su salida del núcleo hacia el citoplasma mediante interacción transitoria con las **nucleoporinas** en el complejo de poro nuclear. (Fig. 8-22)

Expresión génica Proceso global por el cual la información codificada en un gen es convertida a un **fenotipo** observable (normalmente para la producción de una proteína).

Factor de crecimiento Molécula polipeptídica extracelular que se une a un receptor de superficie celular y dispara una vía de señalización intracelular que en general conduce a la proliferación celular.

Factor de crecimiento epidérmico (EGF) Miembro de una familia de proteínas de señalización secretadas (la *familia EGF*) involucrada en el desarrollo de casi todos los tejidos en la mayoría o en todos los animales. Las señales EGF están unidas por **receptores tirosincinasa**. Las mutaciones en los componentes de transducción de señales del EGF están implicadas en el cáncer humano, incluido el cáncer de cerebro. Véase **Familia HER**.

Factor de crecimiento transformador beta (TGF β) Familia de proteínas de señalización secretadas usadas en el desarrollo de muchos tejidos en la mayoría o todas las células animales. Los miembros de la familia TGF β inhiben el crecimiento con más frecuencia de lo que lo activan. Las mutaciones en los componentes de transducción de la señal TGF β están implicadas en algunos cánceres humanos, incluido el cáncer de mama. (Figs. 16-27 y 16-28)

Factor de elongación (FE) Una de un grupo de proteínas no ribosómicas requeridas para la **traducción** continua de mRNA (síntesis proteica) después de la iniciación. (Fig. 4-25)

Factor de iniciación (FI) Uno de un grupo de proteínas no ribosómicas que estimulan la asociación adecuada de los ribosomas y mRNA y son necesarias para la iniciación de la **traducción** (síntesis proteica). (Fig. 4-24)

Factor de iniciación de la traducción eucarionte (eIF) Grupo de proteínas necesarias para iniciar la síntesis proteica en las células eucariontes. (Fig. 4-24)

Factor de liberación (RF, *release factor*) Uno de los dos tipos de proteínas no ribosómicas que reconoce codones de terminación en el mRNA y promueve la liberación de la cadena polipeptídica completada, terminando así la **traducción** (síntesis de proteína). (Fig. 4-27)

Factor promotor de la maduración (MPF) Complejo ciclina-CDK que tiene la capacidad de inducir la entrada en la meiosis cuando se inyecta en los oocitos detenidos en G₂.

Factor de transcripción Término general para cualquier proteína, diferente a la RNA polimerasa, necesaria para iniciar o regular la transcripción en células eucariontes. Los factores *generales*, necesarios para la transcripción de todos los genes, participan en la formación del complejo de preiniciación de la transcripción cerca del sitio de inicio. Los factores *específicos* estimulan (**activadores**) o inhiben (**represores**) la transcripción de genes particulares mediante la unión a sus secuencias reguladoras.

Factor trófico Cualquiera de las numerosas proteínas de señalización requeridas para la supervivencia de las células en los organismos multicelulares; cuando faltan esas señales, las células comienzan con la **apoptosis**.

FAD (flavina adenina dinucleótido) Molécula orgánica pequeña que funciona como un transportador de electrones al aceptar dos electrones de una molécula dadora y dos H⁺ de la solución. (Fig. 2-33b)

Fagocitos Cualquier célula que puede ingerir y destruir patógenos y otros antígenos particulados. Los principales fagocitos son los neutrófilos, los macrófagos y las células dendríticas.

Fagocitosis Proceso por el cual partículas relativamente grandes (p. ej., células bacterianas) son internalizadas por ciertas células eucariontes en un proceso que involucra la remodelación extensa del citoesqueleto de actina; distinto de la **endocitosis mediada por receptor**. (Fig. 17-19)

Familia de ATPasa AAA Grupo de proteínas que se acoplan a la hidrólisis del ATP con movimientos de moléculas grandes en general asociadas con el desplegamiento de proteínas sustrato o el desensamblaje de complejos de proteínas (multiméricas u oligoméricas).

Familia de genes Conjunto de genes que surgen por duplicación de un gen ancestral común y luego diverge debido a pequeños cambios en la secuencia nucleotídica. (Fig. 6-26)

Familia HER Grupo de receptores que pertenecen a la clase de **receptores tirosincinasa (RTK)**, que se une a miembros de la familia de factores de crecimiento epidérmicos (EGF) de moléculas de señalización en los seres humanos. La sobreexpresión de la proteína HER2 se asocia con la aparición de ciertos cánceres de mama. (Fig. 16-7)

Familia de proteínas Conjunto de proteínas homólogas codificadas por una **familia génica**.

Fase G₀, G₁, G₂ Véase **Ciclo celular**

Fase M (mitótica) Véase **Ciclo celular**

Fase S (síntesis) Véase **Ciclo celular**

Fenotipo Características físicas y fisiológicas detectables de una célula u organismo determinadas por su **genotipo**; también, rasgo específico asociado con un **alelo** en particular.

Fermentación Conversión en ATP de parte de la energía presente en las moléculas orgánicas nutrientes, como la glucosa, a través de su oxidación y conversión en productos moleculares orgánicos de “desperdicio” como el ácido láctico o el etanol; en general implica la reducción cíclica simultánea y la oxidación de NAD⁺/NADH.

Feromona Molécula señal liberada por un individuo que puede alterar el comportamiento o expresión génica de otros individuos de la misma especie. Los factores del tipo de apareamiento α y γ de las levaduras son ejemplos bien estudiados.

Fibroblasto Tipo común de célula del tejido conectivo que secreta **colágeno** y otros componentes de la **matriz extracelular**; migra y prolifera durante la cicatrización de las heridas y en cultivo de tejidos.

Fibronectina **Proteína multiadherente de la matriz** abundante que tiene varias isoformas, generadas por corte y empalme alternativo en varios tipos celulares. Se une a muchos otros componentes de la matriz extracelular y a los receptores de adhesión integrinas. (Fig. 20-32)

Fijación del carbono Véase **Ciclo de Calvin**

Fijación de membranas (*patch clamping*) Técnica para la determinación del flujo de iones a través de un solo canal iónico o a través de

la membrana de toda una célula mediante una micropipeta cuya punta se aplica a una porción pequeña de la membrana celular. (Fig. 11-22)

Filamento intermedio Fibra del citoesqueleto (de 10 nm de diámetro) formada por la polimerización de subunidades proteicas relacionadas específicas de tejido, que incluyen **queratinas**, **laminas** y **neurofilamentos**. (Fig. 18-47; Cuadro 18-1)

FISH Véase **Hibridación in situ con fluorescencia**

Flagelo Estructura locomotora larga (en general una por célula) que se extiende desde la superficie de algunas células eucariontes (p. ej., **espermatozoides**), cuyos movimientos de flexión impulsan la célula a través del medio líquido. Los flagelos bacterianos son estructuras más pequeñas y mucho más simples. Véase también **Axonema** y **Cilio**. (Fig. 18-31)

Flavina adenina dinucleótido Véase **FAD**

Flipasa Proteína que facilita el movimiento de lípidos de membrana de una hoja a la otra de la bicapa lipídica. (Fig. 11-15)

Fosfatasa Enzima que elimina un grupo fosfato de un sustrato por hidrólisis. Las fosfoproteínofosfatasas actúan con las proteínasas para controlar la actividad de muchas proteínas celulares. (Fig. 3-33)

Fosfatasa Cdc25 Proteína fosfatasa que desfosforila las CDK (*cyclin-dependent kinases*) en la treonina 14 y la tirosina 15, activando de esta forma las CDK.

Fosfoglicéridos Derivados anfipáticos del glicerol 3 fosfato que en general están formados por dos cadenas de ácidos grasos hidrófobos esterificados a los grupos hidroxilo en el glicerol y un grupo cabeza polar adherido al fosfato; los lípidos más abundantes en las biomembranas. (Figs. 2-20 y 10-8a)

Fosfoinosítidos Grupo de lípidos unidos a membrana que contienen derivados fosforilados del inositol; algunos actúan como **segundos mensajeros** en varias vías de transducción de la señal. (Fig. 15-35 y 16-25)

Fosfolipasa Una de varias enzimas que escinden diferentes enlaces en el extremo hidrófilo de los **fosfolípidos** (Fig. 10-12)

Fosfolipasa C (PLC) Fosfolipasa asociada con la membrana y activada por G_{aq} o por G_{ao} , que escinde el lípido de membrana fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato y produce dos segundos mensajeros, **DAG** e **IP₃**. (Figs. 15-35 y 15-36a)

Fosfolípido La principal clase de lípidos presente en las biomembranas, incluye los **fosfoglicéridos** y los **esfingolípidos**. (Figs. 10-8a, b y 2-20)

Fosforilación Adición covalente de un grupo fosfato a una molécula como un azúcar o una proteína. La hidrólisis del ATP suele acompañar a la fosforilación, lo que proporciona energía para la reacción, y el grupo fosfato es añadido de forma covalente a la molécula. Las enzimas que catalizan la fosforilación se denominan **quinasas**.

Fosforilación a nivel de sustrato Formación de ATP a partir de ADP y P_i catalizada por enzimas citosólicas en reacciones que no depende de una fuerza protón motriz o de oxígeno molecular.

Fosforilación oxidativa Fosforilación de ADP para formar ATP debida a la transferencia de electrones al oxígeno (O_2) en bacterias y mitocondrias. Implica la generación de una **fuerza protón-motriz** durante el transporte de electrones y su uso subsecuente para impulsar la síntesis de ATP.

Fotorrespiración Vía de reacciones que compete con la fijación de CO_2 (**ciclo de Calvin**) consumiendo ATP y generando CO_2 , lo que reduce la eficiencia de la fotosíntesis. (Fig. 12-47)

Fotosíntesis Serie de reacciones complejas que se producen en algunas bacterias y en los **cloroplastos** de las plantas, en la cual se utiliza la energía lumínica para generar hidratos de carbono a partir de CO_2 , en general con consumo de H_2O y liberación de O_2 .

Fotosistemas Complejos multiproteicos presentes en todos los organismos fotosintéticos, que consiste en complejos secuestradores de luz que contienen **clorofilas** y un centro de reacción donde se produce el **transporte de fotoelectrones**. (Fig. 12-44a)

Fragmentos de Okazaki Fragmentos cortos de DNA hebra simple (< 1 000 bases) que se forman durante la síntesis de la **hebra retardada** en la replicación del DNA y son unidos rápidamente por la DNA ligasa para formar una hebra de DNA continua. (Fig. 4-30)

Fragmoplasto En las plantas, estructura temporal formada durante la telofase, cuyas membranas se convierten en membranas plasmáticas de las células hijas y cuyos contenidos desarrollan la nueva pared celular entre ellas. (Fig. 18-45)

Fuerza protón motriz Energía equivalente del gradiente de concentración de protones (H^+) y el gradiente de potencial eléctrico a través de la membrana; usada para iniciar la síntesis de ATP por la **ATP sintasa**, transportar moléculas en contra de sus gradientes de concentración, y mover los flagelos bacterianos. (Fig. 12-2)

Gameto Célula **haploide** especializada (en animales, un espermatozoide o un óvulo) producida en la **meiosis** de las **células germinales** precursoras; en la reproducción sexual, la unión de un espermatozoide y un óvulo inicia el desarrollo de un nuevo individuo.

Gen Unidad física y funcional de herencia que lleva la información de una generación a la siguiente. En términos moleculares, es la secuencia de DNA (incluidos **exones**, **intrones** y **regiones de control de la transcripción**) necesaria para la producción de un polipéptido funcional o RNA. Véase también **Unidad de transcripción**.

Gen cuidador o de mantenimiento (caretaker) Cualquier gen cuya proteína codificada ayuda a proteger la integridad del genoma mediante la participación en la reparación del DNA dañado. La pérdida de función de un gen cuidador incrementa las tasas de mutación y promueve la carcinogénesis.

Gen indicador (informador) Gen que codifica una proteína que se mide fácilmente (p. ej., la β -galactosidasa, la luciferasa). Los genes indi-

cadores suelen utilizarse en varios tipos de experimentos para indicar la activación del promotor al cual el gen informador está unido.

Gen patrón Genes involucrados en el desarrollo de los metazoos que determinan la organización general del animal, incluidos el eje corporal principal y la segmentación.

Gen regulado coordinadamente Genes cuyas expresiones son inducidas y reprimidas al mismo tiempo, como los genes en un único operón bacteriano.

Gen supresor de tumores Cualquier gen cuya proteína codificada inhibe directa o indirectamente la progresión a través del ciclo celular y en el cual una mutación con pérdida de la función es oncogénica. La herencia de un solo alelo mutante de muchos genes supresores de tumores (p. ej., *RB*, *APC*, y *BRCA1*) aumenta en gran medida el riesgo de desarrollar cáncer colorrectal y otros tipos de cáncer. (Figs. 24-8 y 24-11)

Genoma Toda la información genética que porta una célula o microorganismo.

Genómica Análisis comparativo de toda la secuencia genómica de diferentes organismos y determinación de los patrones globales de expresión génica; se usa para evaluar relaciones evolutivas entre especies y para predecir el número y los tipos generales de RNA producidos por un organismo.

Genotipo Constitución genética total de una célula individual o un organismo, en general con énfasis en los alelos particulares en uno o más locus específicos.

Giro beta (β) Estructura secundaria de las proteínas con forma de U corta. (Fig. 3-6)

Glía Células de sostén del tejido nervioso que, a diferencia de las neuronas, no conducen los impulsos eléctricos; también llamadas *células gliales*. De los cuatro tipos, las *células de Schwann* y los *oligodendrocitos* producen *vainas de mielina*, los *astrocitos* actúan en la formación de la *sinapsis* y la *microglía* sintetiza **factores tróficos** y actúa en la respuesta inmunitaria. (Fig. 22-14)

Glucagón Hormona peptídica producida en las células de los islotes pancreáticos que desencadena la conversión de glucógeno en glucosa en el hígado; actúa junto con la **insulina** para controlar los niveles de glucosa en sangre.

Glucógeno Polisacárido ramificado muy largo compuesto exclusivamente por unidades de glucosa; es el hidrato de carbono de almacenamiento más importante en los animales, y se encuentra principalmente en los hepatocitos y las células musculares.

Glucolípido Cualquier lípido al cual está unida de forma covalente una cadena corta de hidrato de carbono; en general se encuentra en la membrana plasmática.

Glucólisis Vía metabólica en la que los azúcares son degradados anaeróbicamente y convertidos en lactato o piruvato en el citosol con producción de ATP. (Fig. 12-3)

Glucoproteína Cualquier proteína a la cual está unida de forma covalente una o más cadenas de oligosacáridos. La mayoría de las proteínas secretadas y muchas proteínas de membrana son glucoproteínas.

Glucosaminoglucano (GAG) Polímero grande lineal, extremadamente cargado, formado por disacáridos en los que muchos residuos suelen estar sulfatados. Los GAG son uno de los componentes principales de la matriz extracelular, en general como componentes de **proteoglucanos**. (Fig. 20-28)

GMP cíclico (cGMP) Segundo mensajero que abre canales de cationes en los bastones de la retina y activa la proteína cinasa G en las células del músculo liso vascular y varios otros tipos. (Fig. 15-8, 15-23 y 15-37)

Gradiente de concentración En biología celular, diferencia en la concentración de una sustancia en regiones distintas de una célula o embrión, o en diferentes lados de una membrana celular.

Gradiente electroquímico Fuerza conductora que determina la dirección energéticamente favorable de transporte de un ion (o molécula cargada) a través de la membrana. Representa la influencia combinada del **gradiente de concentración** a través de la membrana y del **potencial de membrana**.

Grupo R Porción de una molécula, o un grupo químico dentro de una molécula grande, que está covalentemente unido como un apéndice al cuerpo principal o núcleo de la molécula. En un aminoácido, el grupo R es la cadena lateral que está unida al átomo de carbono alfa y le confiere las características distintivas del aminoácido.

Grupo sulfhidrilo (—SH) Grupo sustituyente presente en el aminoácido cisteína y otras moléculas formado por un átomo de hidrógeno unido covalentemente a un átomo de azufre; también llamado *grupo tiol*.

Haces contráctiles Haces de **actina** y **miosina** en las células no musculares que actúan en la adhesión celular (p. ej., las *fibras de tensión*) o el movimiento celular (*anillo contráctil* en las células en división).

Haploide Referente a un organismo o una célula, que tiene solo un miembro de cada par de **cromosomas homólogos** y por lo tanto solo una copia (**alelo**) de cada gen o locus genético. Los gametos y las células bacterianas son haploides. Véase también **Diploide**.

Hebra conductora (*leading strand*) Una de las dos hebras de DNA hijas formadas en una **horquilla de replicación** por la síntesis continua en la dirección 5' → 3'. La dirección de síntesis de la hebra conductora es la misma que el movimiento de la horquilla de replicación. Véase también **Hebra rezagada**. (Fig. 4-30)

Hebra retardada (*lagging strand*) Una de las dos hebras de DNA formadas en la **horquilla de replicación** como segmentos cortos discontinuos (fragmentos de Okazaki), sintetizados en la dirección 5' → 3' y luego unidos. Véase también **Hebra conductora**. (Fig. 4-30)

Hedgehog (Hh) Familia de proteínas de señalización secretadas que son reguladores importantes del desarrollo en la mayoría de los tejidos y órganos en diversas especies animales. Las mutaciones en los compo-

nentes de transducción de señales Hh están implicados en algunos cánceres humanos y en defectos de nacimiento. El receptor es la proteína transmembrana Patched. (Figs. 16-31, 16-32 y 16-33)

Helicasa (1) Cualquier enzima que se desplaza a lo largo de un dúplex de DNA usando la energía liberada por la hidrólisis del ATP para separar (desenrollar) las dos cadenas; necesaria para la replicación del DNA. (2) Actividad de ciertos factores de iniciación que pueden desenrollar las estructuras secundarias en el mRNA durante la iniciación de la traducción.

Hélice alfa (α) Estructura secundaria frecuente en las proteínas en las cuales la secuencia lineal de aminoácidos se pliega en una espiral con giro hacia la derecha estabilizada mediante enlaces de hidrógeno entre los grupos carboxilos y amida del esqueleto aminoacídico. (Fig. 3-4)

Hélice-bucle-hélice básico (bHLH, basic helix-loop-helix) Motivo estructural conservado de unión al DNA, que consiste en dos hélices α conectadas por un bucle corto, que se encuentra en muchos factores de transcripción eucariontes. (Fig. 7-29d)

Hélice-giro-hélice (helix-turn-helix) Motivo estructural en el cual dos hélices alfa están conectadas por un segmento corto de residuos conectores, a veces denominado "bucle". Los motivos estructurales Hélice-giro-hélice/hélice-bucle-hélice pueden llevar a cabo diversas funciones, incluidas la unión al calcio y la unión del DNA.

Heterocromatina Regiones de la **cromatina** que permanecen muy condensadas y son transcripcionalmente inactivas durante la interfase. (Fig. 6-33a)

Heterocigoto Referente a una célula diploide o un organismo, que tiene dos **alelos** diferentes de un gen particular.

Hexosa Monosacárido de seis carbonos.

Hialuronano Glucosaminoglucano (GAG) muy hidratado grande que es un componente principal de la matriz extracelular; también conocido como **ácido hialurónico** y **hialuronato**. Proporciona rigidez y resistencia, y también una calidad lubricante a muchos tipos de tejidos conectivos. (Fig. 20-28a)

Hibridación del ácido nucleico Asociación de dos hebras **complementarias** de ácidos nucleicos para formar moléculas de doble hebra, que pueden contener dos hebras de DNA, dos hebras de RNA, o una de DNA y una de RNA. Técnica usada experimentalmente en varias formas de detección de secuencias específicas de DNA o RNA.

Hibridación in situ Cualquier técnica diseñada para detectar las secuencias de DNA o RNA específicas en células y tejidos al tratar a las muestras con **sondas** de DNA o RNA de hebra simple que se hibridan a la secuencia de interés. (Fig. 5-28)

Hibridación in situ con fluorescencia (FISH) Cualquiera de las diversas técnicas relacionadas para la detección de secuencias de DNA o RNA específicas en células y tejidos mediante tratamiento de las muestras con **sondas** fluorescentes que se hibridan a la secuencia de interés y la observación de las muestras con microscopía fluorescente.

Hibridoma **Clon** de células híbridas que son inmortales y producen **anticuerpos monoclonales**; formados por fusión de linfocitos B normales productores de anticuerpos con células de mieloma. (Fig. 9-6)

Hidrato de carbono Término general para ciertos polihidroxi-aldehídos, polihidroxicetonas, o compuestos derivados de éstos que en general tienen la fórmula $(CH_2O)_n$. Principal tipo de compuesto usado para almacenar y abastecer de energía a las células animales. (Fig. 2-18)

Hidrocarbóno Cualquier compuesto que contiene solo átomos de hidrógeno y carbono.

Hidrófilo Que interactúa en forma efectiva con el agua. Véase también **Polar**.

Hidrófobo Que no interactúa en forma efectiva con el agua; en general, muy poco soluble o insoluble en agua. Véase también **No polar**.

Hiperpolarización Aumento en la magnitud del potencial eléctrico negativo de la cara citosólica que normalmente existe a través de la membrana plasmática de una célula en reposo, que da como resultado un **potencial de membrana** más negativo.

Hipertónico Referente a una solución externa cuya concentración de soluto es lo suficientemente alta para hacer que el agua salga de las células por **ósmosis**.

Hipotónico Referente a una solución externa cuya concentración de soluto es lo suficientemente baja para hacer que el agua entre a las células por **ósmosis**.

Histona Una de varias proteínas pequeñas básicas muy conservadas, que se encuentran en la **cromatina** de todas las células eucariontes y que se asocian con el DNA en el **nucleosoma**. (Fig. 6-29)

Hoja beta (β) Estructura secundaria plana en las proteínas creada por las uniones de hidrógeno entre los átomos en dos cadenas polipeptídicas diferentes o entre segmentos de una cadena plegada una sola vez. (Fig. 3-5)

Homeodominio Motivo estructural conservado de unión al DNA (una hélice-giro-hélice) que se encuentra en muchos factores de transcripción importantes del desarrollo.

Homocigoto Referente a una célula diploide u organismo que tiene dos **alelos** idénticos de un gen particular.

Homología Similitud en características (p. ej., secuencias proteicas y de ácidos nucleicos o la estructura de un órgano) que refleja un origen evolutivo común. Las proteínas o genes que exhiben homología se dicen que son homólogos. En contraste, *analogía* es una similitud en estructura o función que no refleja un origen evolutivo común.

Homólogos Copias materna y paterna de cada tipo morfológico de cromosoma presente en una célula diploide.

Hormona En general, cualquier sustancia extracelular que induce respuestas específicas en células diana; específicamente, moléculas de

señalización que circulan en la sangre y median la señalización **endocrina**.

Horquilla de replicación Región con forma de Y en el DNA doble hebra en el cual las dos hebras son separadas y replicadas durante la síntesis de DNA; también denominada *horquilla en crecimiento*. (Fig. 4-30)

Huso mitótico Estructura temporal especializada, presente en las células eucariontes durante la mitosis, que captura los cromosomas y luego los empuja y los tira hacia lados opuestos de las células en división; también llamado *aparato mitótico*. (Fig. 18-37)

IgCAM Familia de **moléculas de adhesión celular** que contienen múltiples dominios de inmunoglobulina (Ig) y median las interacciones intracelulares independientemente del Ca^{2+} . Las IgCAM se producen en una variedad de tejidos y son componentes de las **uniones estrechas**. (Fig. 20-2)

Inactivación de genes Inactivación selectiva de un gen específico mediante el reemplazo del mismo con un alelo no funcional (interrumpido) en un microorganismo por lo demás normal.

Inflamación Respuesta localizada a una lesión o infección que conduce a la activación de células del sistema inmunitario y su reclutamiento al sitio afectado; marcada por los cuatro signos clásicos de enrojecimiento, inflamación, calor y dolor. (Fig. 23-6)

Inhibición lateral Proceso importante del desarrollo mediado por señal que produce células adyacentes equivalentes o casi equivalentes que asumen diferentes destinos.

Inhibidor CDK (CKI) Se une al complejo ciclina-CDK e inhibe su actividad.

Iniciador Secuencia de DNA que especifica el comienzo de la transcripción dentro de la secuencia.

Inmunoglobulina (Ig) Cualquiera de las proteínas séricas, producida por las linfocitos B completamente diferenciados, que pueden funcionar como anticuerpos; también se producen en la forma unida a la membrana como parte del **receptor de células B**. Las inmunoglobulinas se dividen en cinco clases principales (*isotipos*) que muestran propiedades funcionales distintivas. Véase también **Anticuerpo**. (Figs. 23-8 y 23-9)

Inmunotransferencia (immunoblotting) Técnica en la que las proteínas son separadas mediante electroforesis y fijadas a una membrana de nitrocelulosa o de otro tipo, para luego ser detectadas en forma específica mediante anticuerpos marcados. También se conoce como *Western blot*.

Inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) **Segundo mensajero** intracelular producido por escisión del lípido de membrana fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato en respuesta a la estimulación de ciertos receptores de la superficie celular. El IP_3 , que desencadena la liberación de Ca^{2+} almacenada en el retículo endoplasmático, es uno de los diversos fosfoinosítidos biológicamente activos. (Fig. 15-8; Cuadro 15-3)

Insaturado Referido a un compuesto (p. ej., ácido graso) en el cual uno de los enlaces carbono-carbono es doble o triple.

Insulina Hormona proteica producida en las células β de los islotes pancreáticos que estimula la captación de glucosa por parte de las células musculares y los adipocitos; actúa junto con el **glucagón** para regular las concentraciones de glucosa en sangre. La insulina también funciona como factor de crecimiento para muchas células.

Integrinas Gran familia de proteínas transmembrana heterodiméricas que funcionan como receptores de adhesión, estimulando la adhesión célula-matriz, o como moléculas de adhesión celular, promoviendo la adhesión entre las células. (Cuadro 20-3)

Interacción iónica **Interacción no covalente** entre un ion cargado positivamente (catión) y un ion cargado negativamente (anión); que en general se conoce como *enlace iónico*.

Interacción no covalente Cualquier interacción química relativamente débil que no implica compartir electrones de manera íntima. (Figs. 2-6 y 2-12)

Interacción de van der Waals **Interacción no covalente** débil debida a distribuciones electrónicas asimétricas, transitorias y débiles alrededor de átomos (dipolos). (Fig. 2-10)

Interfase Período largo del ciclo celular que incluye las fases G_1 , S, y G_2 , entre una fase M (mitótica) y la siguiente. (Figs. 1-16 y 19-1)

Interferencia de RNA (RNAi) Inactivación funcional de un gen específico por un RNA de hebra doble correspondiente que induce o la inhibición de la traducción o la degradación del mRNA de hebra simple complementario codificado por el gen pero no de los mRNA con una secuencia diferente. (Fig. 5-45)

Interferón (IFN) Grupo pequeño de citocinas que se unen a receptores de superficie celular sobre células diana e inducen cambios en la expresión génica que conducen a un estado antiviral u otras respuestas celulares importantes en la actividad inmunitaria.

Interleucinas (IL) Grupo grande de citocinas, algunas liberadas en respuesta a la inflamación, que estimulan la proliferación y el funcionamiento de linfocitos T y linfocitos B productores de anticuerpos.

Interneuronas Neuronas que reciben señales de otras células nerviosas y que a su vez transmiten señales a otras células nerviosas.

Intrón Parte de un **transcrito primario** (o del DNA que lo codifica) que es eliminado por corte y empalme durante el procesamiento de RNA y no está incluido en los mRNA, rRNA o tRNA funcionales y maduros.

IP_3 Véase **Inositol 1,4,5-trifosfato**

Islas CpG Regiones en el DNA de los vertebrados de ~100 a ~1 000 pb que tienen una frecuencia inusualmente elevada de la secuencia CG. Muchas islas CpG funcionan como promotores para el comienzo de la transcripción, en general en ambas direcciones.

Isoforma Una de las varias formas de la misma proteína cuyas secuencias de aminoácidos difieren ligeramente y cuyas actividades generales son similares. Las isoformas pueden ser codificadas por genes diferentes o por un único gen cuyo transcrito primario sufre **corte y empalme alternativo**.

Isotónico Referido a una solución cuya concentración de solutos es tal que no causa movimiento neto del agua hacia fuera o dentro de las células.

K_m Parámetro que describe la afinidad de una enzima por su sustrato y es igual a la concentración de sustrato que produce la velocidad de reacción que es la mitad de la máxima; también llamada *constante de Michaelis*. Un parámetro similar que describe la afinidad de una proteína de transporte por la molécula transportada o la afinidad de un receptor por su ligando. (Fig. 3-22)

Lámina basal Reticulo laminar delgado de componentes de la matriz extracelular que subyace en la mayoría de los epitelios animales y en otros grupos organizados de células (p. ej., músculo), separándolos del tejido conectivo y de otras células. (Figs. 20-21 y 20-22)

Lámina nuclear Reticulo fibroso sobre la superficie interna de la envoltura nuclear compuesta por filamentos intermedios de lamina. (Fig. 19-22)

Laminas Grupo de proteínas de **filamentos intermedios** que forman una red fibrosa, la **lámina nuclear**, en la superficie interna de la envoltura nuclear.

Laminina **Proteína multiadherente de la matriz**, grande y heterodimérica, que se encuentra en toda la **lámina basal**. (Fig. 20-23)

Lateral Véase **Basolateral**

Lectina Cualquier proteína que se une fuertemente a azúcares específicos. Las lectinas asisten en el plegamiento adecuado de algunas glucoproteínas en el retículo endoplasmático y pueden usarse en cromatografía de afinidad para purificar glucoproteínas o como reactivos que los detectan in situ.

Ligamiento En genética, tendencia de dos locus diferentes del mismo cromosoma a ser heredados juntos. Cuanto más cerca están los dos locus, menor es la frecuencia de **recombinación** entre ellos y mayor es el ligamiento.

Ligando Cualquier molécula, diferente del **sustrato** de una enzima, que se une fuerte y específicamente a una macromolécula, en general una proteína, formando un complejo ligando macromolécula.

Línea celular Población de células cultivadas, de origen animal o vegetal, que han sufrido un cambio genético que les permite crecer indefinidamente. (Fig. 9-1b)

Linfocito Dos clases de glóbulos blancos que pueden reconocer moléculas extrañas (**antígenos**) y median la respuesta inmunitaria. Los linfocitos B (células B) son responsables de la producción de anticuerpos; los linfocitos T (células T) son responsables de destruir las células infectadas por bacterias y virus, células extrañas y células cancerosas.

Linfocito B Véase **Célula B**

Lípido Cualquier molécula orgánica que es poco soluble o virtualmente insoluble en agua pero es soluble en solventes orgánicos no polares. Las principales clases incluyen **ácidos grasos**, fosfolípidos, **esteroides** y **triglicéridos**.

Lipoproteína Cualquier complejo de lípidos y proteínas soluble en agua que actúa en la transferencia de masas de lípidos en todo el cuerpo. Véase también **Lipoproteína de baja densidad (LDL)**.

Lipoproteína de baja densidad (LDL) Clase de **lipoproteína** que contiene apolipoproteína B-100, que es un transportador primario de colesterol en la forma de ésteres de colesterol entre los tejidos, en especial hacia el hígado. (Fig. 14-27)

Liposoma Estructura de **bicapa fosfolipídica** esférica artificial con un interior acuoso que se forma in vitro a partir de fosfolípidos y puede contener proteínas de membrana. (Fig. 10-3c)

Lisis Destrucción de una célula por rotura de la membrana plasmática y liberación de los contenidos.

Lisogenia Fenómeno en el cual el DNA de un virus bacteriano (bacteriófago) es incorporado en el genoma de la célula huésped y replicado junto con el DNA bacteriano, pero no es expresado. La activación posterior conduce a la formación de nuevas partículas virales, que finalmente produce la lisis de la célula.

Lisosoma Orgánulo pequeño que tiene un pH interno de 4-5, que contiene las enzimas hidrolíticas, y funciona en la degradación de materiales internalizados por endocitosis y de los componentes celulares en autofagia. (Figs. 9-12 y 9-32)

Macrófagos Leucocitos fagocíticos que pueden detectar una amplia gama de marcadores patógenos a través de **receptores similares a los Toll**. Funcionan como **células presentadoras de antígenos** profesionales y son una fuente importante de citocinas

Macromolécula Cualquier molécula grande, por lo general polimérica (p. ej., apoproteína, ácido nucleico, polisacárido), con una masa molecular mayor a unos pocos miles de Dalton.

Maligno Referente a un tumor o células tumorales que pueden invadir el tejido normal de alrededor y/o sufrir **metástasis**. Véase también **Benigno**.

Mano EF Tipo de **motivo estructural** hélice-bucle-hélice que se produce en la mayoría de las proteínas de unión a Ca²⁺ como la **calmodulina**. (Fig. 3-9b)

MAP cinasa Cualquiera de una familia de proteincinasas que se activan en respuesta a la estimulación celular por muchos factores de crecimiento diferentes y que median la respuesta celular mediante fosforilación de factores de transcripción específicos y otras proteínas diana. (Figs. 16-21 y 16-22)

Marcadores moleculares basados en el DNA Secuencias de DNA que varían entre individuos de la misma especie (*polimorfismos del*

DNA) y son útiles en los estudios de ligamiento genético; incluye a los SNP y SSR.

Marco abierto de lectura (ORF, *open reading frame*) Región del DNA secuenciado que no está interrumpido por codones de terminación en uno de los marcos de lectura de tripletes. Un ORF que comienza con un codón de iniciación y se extiende por al menos 100 codones tiene una alta probabilidad de codificar una proteína.

Marco de lectura Secuencia de tripletes nucleótidos (**codones**) que comienza en un codón de iniciación de la traducción específico en un mRNA y llega hasta un codón de terminación. Algunos mRNA pueden traducirse en diferentes polipéptidos leyendo de dos marcos de lectura diferentes (Fig. 4-18)

Masa de células internas Parte de un embrión temprano que formará el embrión propiamente dicho pero no los tejidos extraembrionarios, incluida la placenta.

Material pericentriolar Material amorfo visto con la microscopia electrónica de secciones finas que rodea los centriolos de las células animales. El material pericentriolar contiene muchos componentes, incluido el complejo en anillo de gamma-tubulina, que estimula la nucleación del ensamblaje de microtúbulos. (Fig. 18-6)

Matriz extracelular (MEC) Malla compleja con interdigitaciones de proteínas y polisacáridos secretados por las células al espacio que existe entre ellas. Proporciona un soporte estructural en tejidos y puede afectar las funciones bioquímicas y evolutivas de las células (**Cuadro 20-1**)

Mecanismo de retroalimentación negativa Proceso donde el producto final de una vía inhibe su propia producción.

Mecanismo de retroalimentación positiva Procesos donde el producto de una vía promueve su propia producción.

Mecanorreceptor Cualquiera de los diversos tipos de estructuras sensoriales que están incluidas en diversos tejidos y responden al tacto, la posición y los movimientos de las extremidades y la cabeza, el dolor y la temperatura.

Mediador Complejo multiproteico muy grande que forma un puente molecular entre los activadores transcripcionales unidos a un **potenciador (*enhancer*)** y a la RNA polimerasa II unida a un **promotor**; funciona como coactivador en la estimulación de la transcripción. (Figs. 7-38 y 7-39)

Meiosis En los eucariontes, tipo especial de división celular que se produce durante la maduración de las células germinales; incluye dos divisiones celulares y nucleares sucesivas con solo un ciclo de replicación del DNA. Termina en la producción de cuatro células haploides no equivalentes genéticamente (**gametos**) a partir de una célula diploide inicial. (Fig. 5-3)

Membrana plasmática Membrana que rodea una célula, que separa la célula de su ambiente externo; consiste en una **bicapa de fosfolípidos**, y los lípidos y las proteínas de membrana asociados. (Figs. 9-32, 10-1 y 10-5)

Memoria Capacidad de un sistema inmunitario que ya conoce un antígeno para responder más rápidamente a la siguiente exposición al mismo estímulo antigénico.

Meristemo Grupo organizado de células indiferenciadas en división que son mantenidas en los brotes y raíces en las plantas. Todas las estructuras adultas surgen a partir de meristemos.

Mesénquima Tejido conectivo embrionario inmaduro, compuesto por células organizadas y adheridas en forma poco compacta, derivado del **ectodermo** o del **mesodermo** en los animales.

Mesodermo Capa del medio de las tres primarias del embrión animal, yace entre el ectodermo y el endodermo; da origen a la notocorda, el tejido conectivo, el músculo, la sangre y otros tejidos.

Metafase Estadio de la mitosis en el cual los cromosomas alineados están equidistantes entre los polos y el huso mitótico pero todavía no han comenzado a segregarse hacia los polos del huso. (Fig. 18-36)

Metaloproteasas de la matriz (MMP) Las metaloproteasas de la matriz son enzimas proteolíticas que emplean el cinc metálico en sus sitios activos. Funcionan en el espacio extracelular, donde escinden proteínas en la matriz extracelular y a veces otras proteínas (p. ej., algunos receptores de superficie).

Metástasis Diseminación de las células cancerosas desde el sitio del origen y su establecimiento en otras áreas de crecimiento secundario.

Metazoos Subgrupo del reino animal que incluye todos los animales multicelulares con tejidos diferenciados, como nervios y músculos.

MHC (*Major histocompatibility complex*) Véase **Complejo mayor de histocompatibilidad**

Micela Agregado esférico soluble en agua de fosfolípidos u otras moléculas anfipáticas que se forman espontáneamente en una solución acuosa. (Fig. 10-3c)

Microfilamento Fibra del citoesqueleto (≈ 7 nm de diámetro) formada por la polimerización de **actina** globular (G) monomérica; también llamada *filamento de actina*. Los microfilamentos cumplen un papel importante en la contracción muscular, las citocinesis, el movimiento celular, y otras funciones y estructuras celulares. (Fig. 17-4)

Micromatrices (*microarray*) de DNA Conjunto ordenado de miles de secuencias nucleotídicas diferentes dispuestas sobre un portaobjeto u otra superficie sólida; se puede usar para determinar los patrones de expresión génica en diferentes tipos celulares o en un tipo celular particular en diferentes etapas de desarrollo o bajo condiciones diferentes. (Figs. 5-29 y 5-30)

Microorganismo modelo Especie no humana usada para estudiar genes, proteínas y funciones celulares. Los organismos modelo se eligen en base a las expectativas de que los descubrimientos logrados en ellos proporcionarán información sobre otros organismos.

Micro-RNA Véase **miRNA**

Microtúbulo Fibra del citoesqueleto (≈ 25 nm en diámetro) formada por la polimerización de monómeros de α, β -**tubulina** y tiene polaridad estructural y funcional. Los microtúbulos son componentes importantes de los cilios, los flagelos, el huso mitótico, y otras estructuras celulares. (Figs. 18-2 y 18-3)

Microvellosidades Prolongaciones pequeñas cubiertas por membrana sobre la superficie de una célula animal que contienen un centro de filamentos de actina. Sobre la superficie absorbente de las células epiteliales intestinales pueden encontrarse muchas microvellosidades, las cuales aumentan el área para el transporte de los nutrientes. (Figs. 17-4 y 20-10)

Miofibrilla Estructuras largas y delgadas dentro del citoplasma de las células musculares que consisten en un arreglo de repetición regular de **sarcómeros** compuesto de filamentos (**miosina**) gruesos y filamentos (**actina**) finos. (Fig. 17-31)

Miosinas Clase de **proteínas motoras** que tiene actividad ATPasa estimulada por actina. Las miosinas se mueven a lo largo de los **microfilamentos** de actina durante la contracción muscular y la citocinesis y también median la translocación de vesículas. (Fig. 17-22)

miRNA (micro-RNA) Cualquiera de los pequeños RNA celulares endógenos, de 20-30 nucleótidos de largo, que son procesados a partir de regiones de doble hebra de las estructuras secundarias en horquilla en los largos precursores de RNA. Una hebra simple del miRNA maduro se asocia con varias proteínas para formar un complejo de silenciamiento inducido por RNA (**RISC, RNA-induced silencing complex**) que inhibe la traducción de un mRNA diana al cual se hibrida de manera imperfecta el miRNA. Varios miRNA deben hibridarse a un mRNA simple para inhibir su traducción. Véase también **siRNA**. (Figs. 8-25a y 8-26)

Mitocondria Orgánulo grande rodeado por dos membranas de bicapas fosfolipídicas que contiene DNA y lleva a cabo la **fosforilación oxidativa**, con lo cual produce la mayor parte del ATP en las células eucariontes. (Figs. 9-33c y 12-6)

Mitógeno Cualquier molécula extracelular, como un factor de crecimiento, que estimula la proliferación celular.

Mitosis En las células eucariontes, proceso por el cual el núcleo se divide produciendo dos núcleos hijos genéticamente equivalentes con número diploide de cromosomas. Véase también **Citocinesis** y **Meiosis**. (Fig. 18-36)

Molécula de adhesión celular (CAM, cell-adhesion molecule)

Proteínas de la membrana plasmática de las células que se unen a proteínas similares de otras células, mediando de esta forma la adhesión intercelular. Las cuatro clases principales de CAM son las **caderinas**, las **IgCAM**, las **integrinas** y las **selectinas**. (Figs. 20-1 y 20-2)

Molécula del MHC Glucoproteínas que exhiben péptidos, derivadas de proteínas extrañas (y propias), sobre la superficie de las células y que son necesarias para la presentación del antígeno a las **células T**. Las moléculas de Clase I se expresan de manera constitutiva en casi todas las células nucleadas; las moléculas de Clase II, en células profesionales presentadoras de antígenos. (Figs. 23-21 y 23-22)

Molécula señal Término general para cualquier molécula intra o extracelular involucrada en la mediación de la respuesta de una célula a su ambiente externo o hacia otras células.

Momento dipolar Medida cuantitativa de la extensión de la separación de la carga, o fuerza, de un dipolo, que para un enlace químico es el producto de la carga parcial en cada átomo y la distancia entre los dos átomos.

Monómero Cualquier molécula pequeña que puede unirse químicamente con otras del mismo tipo para formar un **polímero**. Los ejemplos incluyen aminoácidos, nucleótidos y monosacáridos.

Monosacárido Cualquier azúcar simple con la fórmula $(\text{CH}_2\text{O})_n$ donde $n = 3-7$.

Monoubicuitinación Adición covalente de una sola molécula de ubiquitina a una proteína diana.

Motivo estructural Combinación particular de dos o más estructuras secundarias que forman una estructura tridimensional distintiva que aparece en múltiples proteínas y que a menudo, pero no siempre, está asociada con una función específica.

mRNA (RNA mensajero) Cualquier RNA que especifica el orden de los aminoácidos en una proteína (p. ej., la estructura primaria). Se produce por **transcripción** del DNA mediante la RNA polimerasa. En los eucariontes, el producto inicial de RNA (Transcrito primario) sufre un procesamiento para producir un mRNA funcional. Véase también **Traducción**. (Fig. 4-15)

MTOC (centro organizador de microtúbulo) Término general para cualquier estructura (p. ej., centrosoma, polo del huso, cuerpo basal) que organiza los microtúbulos en las células. (Fig. 18-5)

Muerte celular programada Véase **Apoptosis**

Multimérica Referido a proteínas que contiene varias cadenas polipeptídicas (o subunidades).

Multiubiquitinación Adición covalente de varias moléculas individuales de ubiquitina, cada una en un sitio distinto, de una proteína diana.

MuSK Receptor de tirosinasa localizado en la membrana plasmática del miotubo que induce el agrupamiento de receptores de acetilcolina y sirve para atraer el extremo de los axones de las neuronas motoras en crecimiento.

Mutación En genética, cambio heredable y permanente en la secuencia de nucleótidos de un cromosoma, por lo general en un gen en particular; normalmente causa una alteración en la función del producto génico.

Mutación puntual Cambio de un solo nucleótido en el DNA, especialmente en una región que codifica proteínas; puede dar lugar a la formación de un codón que especifica un aminoácido diferente o a un codón de terminación. La adición o delección de un único nucleótido causará un cambio en el **marco abierto de lectura**.

Mutación sensible a temperatura (ts) Mutación que produce un fenotipo del tipo silvestre a una temperatura (la temperatura permisiva) pero un fenotipo mutante a otra temperatura (la temperatura no permisiva). Este tipo de mutación es especialmente útil en la identificación de genes esenciales para la vida. (Fig. 5-6)

Mutágeno Agente químico o físico que induce mutaciones.

NAD⁺ (nicotinamida adenina dinucleótido) Molécula orgánica pequeña que funciona como transportador de electrones al aceptar dos electrones de una molécula donante y un H⁺ de la solución. (Fig. 2-33a)

NADP⁺ (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) Forma fosforilada del NAD⁺ usada extensamente como transportador de electrones en las vías biosintéticas y durante la fotosíntesis.

Necrosis Muerte celular que resulta del daño tisular u otra patología; en general está marcada por hinchazón y rotura de las células con liberación de sus contenidos. Contrasta con la **apoptosis**.

Neurofilamentos Grupo de proteínas de **filamentos intermedios** que se encuentran solo en las neuronas, que contribuyen a la estructura axonal y la velocidad de transmisión de los potenciales de acción por los axones. (Fig. 18-2b)

Neurona (célula nerviosa) Cualquiera de las células conductoras de impulsos del sistema nervioso. Una neurona típica contiene un cuerpo celular, múltiples prolongaciones ramificadas cortas (**dendritas**), y una prolongación larga (**axón**). (Fig. 22-1)

Neurona aferente Neuronas que transmiten señales desde los tejidos periféricos hacia el sistema nervioso central.

Neurona eferente Neuronas que transmiten señales del sistema nervioso central hacia los tejidos periféricos, como las células musculares y endocrinas.

Neurotransmisor Molécula de señal extracelular que es liberada por la neurona presináptica en una **sinapsis** química y transmite la señal hacia la célula postsináptica. La respuesta provocada por un neurotransmisor, ya sea de excitación como de inhibición, está determinada por su receptor en la célula postsináptica. (Figs. 22-18 y 22-19)

Neurotrofina Familia de **factores tróficos** estructural y funcionalmente relacionados que se unen a receptores llamados Trks y son necesarios para la supervivencia de las neuronas; incluyen el factor de crecimiento nervioso (NGF) y el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF).

Neutrófilo Leucocito fagocítico que es atraído a sitios de daño tisular y migra hacia el interior del tejido. Una vez activados, los neutrófilos secretan varias citocinas, quimiocinas, enzimas destructoras de bacterias (p. ej., lisozima) y otros productos que contribuyen a la inflamación y ayudan a limpiar los patógenos invasores.

Nicho de célula madre Conjunto de células, matrices extracelulares y hormonas que rodean a una célula madre y que mantiene las propiedades de la célula madre.

Nicotinamida adenina dinucleótido Véase NAD⁺

Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato Véase NADP⁺

No polar Referente a una molécula o estructura que no tiene carga eléctrica neta o distribución asimétrica de cargas positivas y negativas. Las moléculas no polares suelen ser menos solubles en agua que las moléculas polares y con frecuencia son insolubles en agua.

Nociceptor Mecanorreceptor que responde al dolor asociado con una lesión a los tejidos corporales causada por un traumatismo, calor, electricidad o químicos tóxicos.

Noqueo de genes (knockout) Véase **Inactivación de genes**

Northern blot (transferencia Northern) Técnica para detectar RNA específicos separados por electroforesis mediante hibridación con una sonda de DNA marcada. Véase también **Southern blot**. (Fig. 5-27)

Núcleo Órgano grande rodeado por una membrana en las células eucariontes, que contiene DNA organizado en cromosomas; la síntesis y el procesamiento de RNA y el ensamblado de los ribosomas se producen en el núcleo

Nucleocápside Cápside viral más el ácido nucleico contenido dentro.

Núcleolo Estructura grande en el núcleo de eucariontes donde ocurre la síntesis y el procesamiento del rRNA y se ensamblan las unidades ribosómicas. (Fig. 6-33a)

Nucleoporinas FG Proteínas halladas sobre la superficie interna del complejo del poro nuclear con un dominio globular que forma parte de la estructura del poro y un dominio de enrollamiento aleatorio de los aminoácidos hidrófilos marcado por repeticiones cortas ricas en fenilalanina y glicina. (Fig. 8-20)

Nucleoporinas Grupo grande de proteínas que forman el complejo de poro nuclear. Una clase (**nucleoporinas FG**) participa en la incorporación y salida (importación y exportación) del material del núcleo.

Nucleósido Molécula pequeña compuesta de una **purina** o una **pirimidina** unida a una pentosa (ya sea ribosa o desoxirribosa). (Cuadro 2-3)

Nucleosoma Unidad estructural de la **cromatina** que consiste en un núcleo con forma de disco de proteínas **histónicas** alrededor del cual se enrolla un segmento de DNA de 147 pb. (Fig. 6-29)

Nucleótido **Nucleósido** con uno o más grupos fosfato unidos mediante un enlace éster a un azúcar, en general al átomo de carbono 5'. El DNA y el RNA son polímeros de nucleótidos que contienen desoxirribosa y ribosa, respectivamente. (Fig. 2-16 y Cuadro 2-3)

Oligopéptido Polímero lineal de tamaño pequeño a mediano compuesto por aminoácidos conectados por enlaces peptídicos. El término **péptido** y **oligopéptido** suelen usarse de manera indistinta.

Oligosacárido N-ligado Cadena ramificada de oligosacáridos unida al grupo amino de la cadena lateral de un residuo de asparagina en una glucoproteína. Véase también **Oligosacárido O-ligado**.

Oligosacárido O-ligado Cadena de oligosacáridos que está unida a un grupo hidroxilo de la cadena lateral en un residuo de treonina o serina en una glucoproteína. Véase también **Oligosacárido N-ligado**.

Oncogén Gen cuyo producto está involucrado tanto en transformar células en cultivo como en inducir el cáncer en animales. En general es una forma mutante de un gen normal (**protooncogén**) para una proteína involucrada en el control del crecimiento o división celular. (Fig. 24-11)

Oncoproteína Proteína codificada por un **oncogén** que induce la proliferación celular normal; puede ser una forma mutante desregulada de una proteína normal o una proteína normal que está producida en exceso o en el momento o lugar equivocados en un organismo.

Operador Secuencia corta de DNA en un genoma bacteriano o de bacteriófago que se une a una proteína represora y controla la transcripción de un gen adyacente. (Fig. 7-3)

Operón En el DNA bacteriano, grupo de genes contiguos Transcritos a partir de un **promotor** que da origen a un mRNA que contiene secuencias codificantes para múltiples proteínas. (Fig. 4-31a)

Orgánulo Cualquier estructura subcelular limitada por una membrana hallada en las células eucariontes. (Figs. 1-12b, 9-32 y 9-33)

Origen de replicación Segmento de DNA único presente en el genoma de un organismo donde comienza la replicación del DNA. Los cromosomas eucariontes contienen múltiples orígenes, mientras que los cromosomas bacterianos y los plásmidos por lo general contienen uno solo.

Ósmosis Movimiento neto de agua a través de una membrana semipermeable (permeable al agua pero no a los solutos) desde una solución de menor concentración de soluto a una de mayor concentración. (Fig. 11-6)

Oxidación Pérdida de electrones de un átomo o molécula que ocurre cuando se retira un átomo de hidrógeno desde una molécula o se añade oxígeno; opuesto a la **reducción**.

Oxidación aerobia Metabolismo de los azúcares y los ácidos grasos que requiere oxígeno y produce CO₂ y H₂O y permite la síntesis de ATP.

Par de bases Asociación de dos **nucleótidos** complementarios en una molécula de DNA o RNA estabilizada por enlaces de hidrógeno entre las bases. La adenina se aparea con timina o uracilo (A • T, A • U) y la guanina con citosina (G • C), (Fig. 4-3b)

Paracrino Referente al mecanismo de señalización en el cual una célula diana responde a una molécula señal (p. ej., factor de crecimiento, neurotransmisor) que es producida por una célula cercana y alcanza su objetivo por difusión.

Pared celular Matriz extracelular rígida especializada ubicada a continuación de la membrana plasmática, que protege a la célula y mantiene su forma; se destaca en la mayoría de los hongos, las plantas y los procariontes pero no se encuentra en la mayoría de los animales multicelulares. (Fig. 20-40)

Partícula de reconocimiento de señal (SRP, *signal-recognition particle*) Partícula de ribonucleoproteína citosólica que se une a la secuencia señal del RE en una proteína secretora nascente y lleva el complejo ribosoma/hebra nascente hacia la membrana del RE, donde se completa la síntesis de la proteína y la translocación dentro del RE. (Fig. 13-5)

PCR (reacción en cadena de la polimerasa) Técnica para amplificar un segmento de DNA específico en una mezcla compleja mediante múltiples ciclos de síntesis de DNA a partir de oligonucleótidos cebadores cortos seguida por un breve tratamiento con calor para separar las hebras complementarias. (Fig. 5-20)

Pentosa **Monosacárido** de cinco carbonos. Las pentosas ribosa y desoxirribosa están presentes en el RNA y DNA, respectivamente. (Fig. 2-16)

Péptido Polímero lineal pequeño compuesto por aminoácidos conectados por enlaces peptídicos. Los términos *péptido* y *oligopéptido* suelen usarse de manera indistinta. Véase también **Polipéptido**.

Peptidoglucano Cadena de polisacáridos entrelazados por péptidos en una pared celular bacteriana que confiere rigidez y contribuye a determinar la forma de la célula.

Perlecán **Proteoglucano** multidominio grande, componente de la matriz extracelular (ECM) que se une a muchos componentes, moléculas de superficie y factores de crecimiento; un componente principal de la **lámina basal**.

Peroxisoma Orgánulo pequeño que contiene enzimas para la degradación de ácidos grasos y aminoácidos mediante reacciones que generan peróxido de hidrógeno, que es convertido en agua y oxígeno por la catalasa.

pH Medida de la acidez o la alcalinidad de una solución definida como el logaritmo negativo de la concentración de hidrogeniones en moles por litro: pH = -log [H⁺]. La neutralidad es equivalente a un pH de 7; los valores por debajo de éste son ácidos y aquellos por encima son alcalinos.

pI Véase **Punto isoeléctrico**

Pirimidina Clase de compuestos nitrogenados que contienen un anillo heterocíclico. Dos pirimidinas, citosina (C) y timina (T), son los componentes básicos de los nucleótidos en el DNA; en el RNA, el uracilo (U) reemplaza a la timina. Véase también **Pares de bases**. (Fig. 2-17)

Plaquinás Familia de proteínas que ayudan a adherir los **filamentos intermedios** a otras estructuras.

Plásmido Pequeña molécula circular de DNA extracromosómico capaz de replicarse en forma autónoma en una célula; suele usarse como un vector en la **clonación de DNA**.

Plasmodesmo Uniones celulares en forma de tubos que interconectan los citoplasmas de las células vegetales adyacentes y son funcionalmente análogos a las **uniones de hendidura** de las células animales. (Fig. 20-41)

Plegamiento de inmunoglobulinas Motivo estructural evolutivamente ancestral que se encuentra en los anticuerpos, los receptores de células T y muchas otras proteínas eucariontes no involucradas directamente en el reconocimiento antígeno-específico; también llamado dominio Ig. (Fig. 23-12b)

Polar Referido a una molécula o estructura con una carga eléctrica neta o distribución asimétrica de cargas positivas y negativas. Las moléculas polares suelen ser solubles en agua.

Polaridad En biología celular, presencia de diferencias estructurales o funcionales en regiones distintas de una célula o componente celular.

Polaridad celular Capacidad de las células para organizar su estructura interna, que determina cambios en la forma celular y produce regiones de la membrana plasmática con composiciones de proteínas y lípidos diferentes.

Polarizado En biología celular, referido a cualquier célula o estructura subcelular marcada por asimetrías estructurales y funcionales.

Poliinsaturado Referido a un compuesto (p. ej., ácido graso) en el cual dos o más de los enlaces carbono-carbono son dobles o triples.

Polímero Cualquier molécula grande compuesta por múltiples unidades idénticas o similares (**monómeros**) unidas por enlaces covalentes. (Fig. 2-13)

Polipéptido Polímero lineal de aminoácidos conectados por enlaces peptídicos, en general con 20 o más residuos. Véase también **Proteína**.

Polirribosoma Complejo que contiene varios **ribosomas**, todos los cuales traducen un único RNA mensajero; también llamado *polisoma*. (Fig. 4-28)

Polisacárido Polímero lineal o ramificado de **monosacáridos** unidos por enlaces glucosídicos y que en general contienen más de 15 residuos. Aquellos con menos de 15 residuos a menudo se llaman *oligosacáridos*.

Poliubiquitinación Adición covalente de una cadena de moléculas de ubiquitina unidas covalentemente a un sitio sobre una proteína diana.

Porina Clase de proteínas transmembrana triméricas a través de las cuales pueden cruzar la membrana moléculas hidrosolubles pequeñas; presentes en las membranas externas de las mitocondrias y los cloroplastos, y en la membrana externa de las bacterias gramnegativas. (Fig. 10-18)

Potenciador (Intensificador) Secuencia reguladora en el DNA eucarionte que puede estar localizado a una gran distancia del gen que controla o incluso dentro de la secuencia que codifica. La unión de proteínas específicas a un potenciador (intensificador) modula la tasa de transcripción del gen asociado. (Fig. 7-22)

Potencial de acción Actividad eléctrica rápida, transitoria y que sigue la ley de todo o nada y que se propaga por la membrana plasmática de células excitables (p. ej., neuronas y células musculares) como resultado de la apertura y el cierre selectivo de canales de Na⁺ y K⁺ regulados por voltaje. (Figs. 22-2 y 22-9)

Potencial eléctrico Energía asociada con la separación de las cargas positivas y negativas. A través de la membrana plasmática de casi todas las células se encuentra un potencial eléctrico.

Potencial de membrana Diferencia de potencial eléctrico, expresada en voltios, a través de una membrana debido al leve exceso de iones positivos (cationes) en un lado y de iones negativos en el otro (aniones). (Figs. 11-18 y 11-19)

Potencial de oxidación Cambio de voltaje cuando un átomo o una molécula pierden un electrón; una medida de la tendencia de una molécula a perder un electrón. Para una reacción de oxidación dada, el potencial de oxidación tiene la misma magnitud pero signo opuesto que el **potencial de reducción** para la reacción inversa (reducción).

Potencial de reducción (E) Cambio de voltaje que se produce cuando un átomo o una molécula ganan un electrón; es una medida de la tendencia de una molécula a ganar un electrón. Para una reacción de reducción dada, *E* tiene la misma magnitud pero el signo opuesto del **potencial de oxidación** para la reacción inversa (oxidación).

Potenciosoma (Intensificosoma) Gran complejo nucleoproteico que se ensambla a partir de factores de transcripción (activadores y represores) a medida que se unen de forma cooperativa a sus sitios de unión en un potenciador (**intensificador**) con la asistencia de proteínas que curvan el DNA. (Fig. 7-33)

Pre-mRNA Precursor del RNA mensajero; es el **transcrito primario** y sufre el procesamiento del RNA. (Figs. 4-15 y 8-2)

Pre-rRNA Precursor grande del RNA ribosómico, sintetizado en el nucléolo de las células eucariontes y procesado para generar tres de los cuatro RNA presentes en los ribosomas. (Figs. 8-37 y 8-38)

Primasa RNA polimerasa especializada que sintetiza tramos cortos de RNA usados como cebadores para la síntesis de DNA. (Fig. 4-31).

Procariontes Clase de microorganismo, que incluye a las **bacterias** (eubacterias) y **archaeas**, que carecen de un verdadero núcleo limitado por membrana y otros orgánulos. Véase también **Eucariontes**. (Fig. 1-1)

Profase Primer estadio en la mitosis, durante el cual los cromosomas se condensan, los cromosomas duplicados se separan para alcanzar los polos del huso, y comienzan a formarse los husos mitóticos. (Fig. 18-36)

Prometafase Segunda etapa en la mitosis, durante la cual la envoltura nuclear y la lámina nuclear se degradan y los microtúbulos se ensamblan desde los polos del huso “capturando” pares de cromosomas en estructuras especializadas llamadas **cinetocoros**. (Fig. 18-36)

Promotor Secuencia de DNA que determina el sitio de inicio de la **transcripción** para una RNA polimerasa. (Fig. 4-11)

Proteasa Cualquier enzima que corta uno o más enlaces peptídicos en proteínas diana.

Proteína Macromolécula compuesta de una o más cadenas **polipeptídicas** lineales plegadas en una forma tridimensional característica (**conformación**) en su estado nativo, biológicamente activa.

Proteína adaptadora Las proteínas adaptadores unen físicamente una proteína con otra uniéndose a ambas. Las adaptadoras conectan directa o indirectamente (mediante adaptadores adicionales) las moléculas de adhesión molecular o receptores de adhesión a elementos del citoesqueleto o a proteínas de señalización intracelular.

Proteína de adhesión celular Véase **Molécula de adhesión celular (CAM)**

Proteína asociada con microtúbulo (MAP) Cualquier proteína que se une a los microtúbulos y regula sus estabilidades. (Figs. 18-13, 18-14, y 18-15)

Proteínas citoesqueléticas Véase **Citoesqueleto**

Proteína G monomérica (pequeña) GTPasa monomérica con una estructura similar a la de las proteínas Ras que cambia de conformación cuando un GTP unido es hidrolizado a GDP y fosfato. (Fig. 15-7)

Proteína G trimérica grande GTPasa reguladora asociada a la membrana formada por una subunidad α , una β y una γ . Cuando la subunidad α está unida al GTP, las subunidades β y γ se disocian como un heterodímero. La subunidad α libre y el heterodímero β - γ libre pueden interactuar con otras proteínas y transducir una señal a través de la membrana. Cuando la subunidad α hidroliza el GTP a GDP y fosfato, la GDP se asocia con el heterodímero β - γ , terminando la señalización. (Fig. 15-17)

Proteína GLUT Familia de proteínas transmembrana, que contienen 12 hélices α que atraviesan la membrana y transportan glucosa (y algunos otros azúcares) a través de la membrana celular en contra de su gradiente de concentración. (Fig. 11-5)

Proteína integral de membrana Cualquier proteína que contiene uno o más segmentos hidrófobos incluidos en el núcleo de la **bicapa fosfolipídica**; también llamadas proteínas transmembrana. (Fig. 13-10)

Proteína de membrana anclada por lípido Cualquier proteína anclada a una membrana celular por uno o más grupos de lípidos unidos covalentemente, que están incluidos en la bicapa lipídica. (Fig. 10-19)

Proteína multiadherente de la matriz Grupo de proteínas flexibles largas que se unen a otros componentes de la **matriz extracelular** y a receptores de la superficie celular, interconectando de esta forma los componentes de la matriz a la membrana de la célula. Los ejemplos incluyen la **laminina**, un componente principal de la lámina basal, y la **fibronectina**, presente en muchos tejidos.

Proteína motora Cualquier miembro de una clase especial de enzimas mecanoquímicas que usan la energía de la hidrólisis de ATP para generar movimiento, ya sea lineal o rotatorio; también llamada *motor molecular*. Véase también **Dineínas**, **Cinecinas** y **Miosinas**.

Proteína p53 Producto de un gen supresor de tumores que cumple una función crítica en la detención de las células con DNA dañado. Las mutaciones inactivantes del gen *p53* se encuentran en muchos cánceres humanos. (Fig. 24-26)

Proteína periférica de membrana Cualquier proteína que se asocia con la cara citosólica o exoplasmática de una membrana pero no penetra en el centro hidrófobo de la bicapa fosfolipídica. Véase también **Proteína integral de membrana**. (Fig. 10-1)

Proteína Ras Miembro monomérico de la **superfamilia de las GTPasa** de proteínas interruptoras que está unida a la membrana plasmática por un anclaje lipídico y actúa en las vías de señalización intracelular; es activada por la unión del ligando al **receptor tirosin-cinasa** y algunos otros receptores de superficie celular. (Figs. 16-17 y 16-19)

Proteína Rb Inhibidor de la familia del factor de transcripción E2F y por lo tanto regulador clave de la entrada del ciclo celular.

Proteína SMC Proteínas cromosómicas de mantenimiento estructural; una familia pequeña de proteínas no histónicas de la cromatina que son cruciales para el mantenimiento de la estructura morfológica de los cromosomas y su segregación adecuada durante la mitosis. Miembros de sus familias son las *condensinas*, que contribuyen a la compactación cromosómica durante la mitosis, y las *cohesinas*, que unen **cromátidas hermanas** hasta su separación en la anafase. Las proteínas SMC funcionan en la segregación adecuada de cromosomas bacterianos a las células hijas. (Figs. 6-36 y 19-27)

Proteína de transporte de membrana Término colectivo para cualquier proteína integral de membrana que media el movimiento de uno o más iones específicos o moléculas pequeñas a través de la membrana celular independientemente del mecanismo de transporte. (Fig. 11-2)

Proteína de unión a SER (SREBP) Factores de transcripción dependientes de colesterol, localizados en la membrana del RE, que se activan en respuesta a concentraciones bajas de colesterol celular y por lo tanto estimulan la expresión de genes que codifican proteínas involucradas en la síntesis e importación del colesterol y también en la síntesis de otros lípidos. (Fig. 16-37)

Proteincinasa A (PCA) Enzima citosólica que es activada por el AMP cíclico (cAMP) y actúa fosforilando y por lo tanto regulando la actividad de numerosas proteínas celulares; también denominada *proteincinasa dependiente del cAMP*. (Fig. 15-29)

Proteincinasa B (PCB) Enzima citosólica que es reclutada a la membrana plasmática por una señal inducida por **fosfoinosítidos** y posteriormente se activa; también llamada **Akt**. (Fig. 16-26)

Proteincinasa C (PCC) Enzima citosólica que es reclutada a la membrana plasmática en respuesta a una señal inducida por elevación de las concentraciones de Ca^{2+} citosólico y es activada por el **diacilglicerol (DAG)** unido a la membrana. (Fig. 15-36a)

Proteincinasa G (PCG) Proteincinasa citosólica activada por el GMP cíclico.

Proteoglucanos Grupo de glucoproteínas (p. ej., perlecán y agregán) que contienen una proteína central a la cual se adhieren una o más cadenas de **glucosaminoglucano** (GAG). Se encuentran en casi todas las matrices extracelulares animales, y algunas son proteínas integrales de membrana. (Fig. 20-31)

Proteoma Todo el complemento de proteínas producido por una célula.

Proteómica Estudio sistemático de las cantidades, modificaciones, interacciones, localizaciones y funciones de todos los subgrupos de proteínas en el cuerpo, a niveles subcelular, celular y tisular.

Proteosoma (o proteasoma) Complejo multifuncional grande de proteasas en el citosol que degrada las proteínas intracelulares marcadas para la destrucción mediante la adhesión de múltiples moléculas de **ubiquitina**. (Fig. 3-29)

Protooncogén Gen celular normal que codifica una proteína en general involucrada en la regulación del desarrollo o diferenciación celular, y que puede mutar y convertirse en un oncogén que promueve un cáncer, ya sea cambiando un segmento de la proteína codificante o alterando su expresión. (Fig. 24-11)

Protostomados (protostomos) Grupo de animales simétricamente bilaterales cuya boca se desarrolla cerca del blastoporo y tienen un cordón nervioso ventral. Este grupo incluye los gusanos, los insectos y los moluscos.

Provirus DNA de un virus animal que está integrado al genoma de la célula huésped; durante la replicación de la célula, el DNA proviral es replicado y aparece en ambas células hijas. La activación del DNA proviral conduce a la producción y liberación de la progenie de viriones.

Pulso y caza Tipo de experimento en el cual una pequeña molécula radioactiva se añade a una célula por un período corto (el pulso) y luego es reemplazada con un exceso de la forma sin marcar a partir de la misma molécula pequeña (la caza). Usada para detectar cambios en la localización celular de una molécula o su destino metabólico en el tiempo. (Fig. 3-40)

Punto de control (checkpoint) Cualquiera de los diversos puntos en el **ciclo celular** eucarionte en los que se puede detener la progresión de una célula de un estadio al siguiente hasta que las condiciones sean las adecuadas.

Punto isoelectrónico (pI) El pH de una solución al cual se disuelve una proteína u otra molécula potencialmente cargada tiene una carga neta cero y por lo tanto no se mueve en un campo eléctrico. (Fig. 3-37)

Purinas Clase de compuestos nitrogenados que contienen dos anillos heterocíclicos fusionados. Dos purinas, la adenina (A) y la guanina (G), son los componentes básicos de los nucleótidos encontrados en el DNA y el RNA. Véase también **Pares de bases**. (Fig. 2-17)

Queratinas Grupo de proteínas de **filamento intermedio** que se encuentran en las células epiteliales y que se ensamblan en filamentos heteropoliméricos. (Fig. 18-48)

Quimiocina Cualquiera de las numerosas proteínas pequeñas secretadas que funcionan como pistas quimiotácticas para los leucocitos.

Quimiosmosis Proceso por el cual se utiliza un gradiente electroquímico de protones (pH más potencial eléctrico) a través de una membrana para impulsar un proceso que requiere energía como la síntesis de ATP; también denominado **acoplamiento quimiosmótico**. Véase **Fuerza protón-motriz**. (Fig. 12-2)

Quimiotaxis Movimiento de una célula u organismo hacia o lejos de ciertos compuestos químicos.

Radioisótopo Forma inestable de un átomo que emite radiación a medida que se desintegra. Varios tipos de radioisótopos se usan experimentalmente como marcadores en moléculas biológicas. (Cuadro 3-1)

Reacción en cadena de la polimerasa Véase **PCR (polymerase chain reaction)**

Reacción redox Reacción de óxido-reducción en la cual uno o más electrones son transferidos de un reactivo al otro.

Receptor acoplado a proteína G (GPCR) Miembro de una clase extensa de receptores de señalización presentes en la superficie celular, incluido aquellos para adrenalina, glucagón y factores de apareamiento de levadura. Todos los GPCR contienen siete hélices α transmembrana. La unión del ligando conduce a la activación de una proteína G trimérica e inicia las vías de señalización intracelular. (Figs. 15-15 y 15-17)

Receptor Cualquier proteína que se une específicamente con otra molécula para mediar la señalización entre célula y célula, la adhesión, la endocitosis u otros procesos celulares. Por lo general es una proteína localizada en la membrana plasmática, el citosol o el núcleo que se une a una molécula extracelular específica (**ligando**), que suele inducir un cambio conformacional en el receptor, iniciando así una respuesta celular. Véase también **Receptor de adhesión** y **Receptor nuclear**. (Figs. 15-1 y 16-1)

Receptor de adhesión Proteína de la membrana plasmática de las células animales que se une a componentes de la **matriz extracelular**, mediando de esta forma la adhesión célula-matriz. Las **integrinas** son los principales receptores de adhesión. (Fig. 20-1, [5])

Receptor beta (β) adrenérgico Siete receptores integrales de la membrana acoplados a la proteína G que unen adrenalina y moléculas relacionadas, y que conducen a la activación de la adenilciclase.

Receptor de células B Complejo compuesto por una molécula de inmunoglobulina unida a la membrana específica de antígeno y las cadenas traductoras de señal $Ig\alpha$ e $Ig\beta$ asociadas. (Fig. 23-16)

Receptor de células T Proteína heterodimérica transmembrana de unión a antígeno que contiene regiones variables y constantes, y está asociada al complejo CD3 multimérico de transducción de señales. (Fig. 23-27)

Receptor de citocina Miembro de la principal clase de receptores de señalización de la superficie celular, que incluyen aquellos para la eritropoyetina, la hormona de crecimiento, las interleucinas y los inter-

ferones. La unión del ligando produce la activación de las cinasas KAK citosólicas asociadas al receptor, iniciando así las vías de señalización intracelular. (Figs. 16-2 y 19-13)

Receptor nuclear Miembro de una clase de receptores que unen moléculas liposolubles (p. ej., hormonas esteroides), forman complejos ligando-receptor que activan la transcripción; también denominada *superfamilia de receptores esteroides*. (Fig. 7-44d)

Receptor similar a Toll (TLR) Miembro de una clase de receptor de superficie celular e intracelular que reconoce una variedad de productos microbianos. La unión del ligando inicia la vía de señalización que induce diversas respuestas según del tipo celular. (Fig. 23-33)

Receptor tirosincinasa (RTK) Miembro de una clase grande de receptores de superficie celular, en general con un dominio transmembrana único, incluidos aquellos para la insulina y muchos factores de crecimiento. La unión con el ligando estimula la actividad proteincinasa específica de tirosina en el dominio citosólico del receptor, iniciando así las vías de señalización intracelular. (Figs. 16-3 y 16-4)

Recesivo En genética, referido a aquel alelo de un gen que no se expresa en el **fenotipo** cuando hay un alelo **dominante** presente; también se refiere al fenotipo de un individuo (homocigoto) que porta dos alelos recesivos. Las mutaciones que producen alelos recesivos suelen dar como resultado la pérdida de la función génica. (Fig. 5-2)

Recombinación Cualquier proceso en el cual los cromosomas o moléculas de DNA son escindidas y los fragmentos son unidos para dar combinaciones nuevas. La recombinación homóloga se produce durante la meiosis, dando lugar al **entrecruzamiento** (*crossing-over*) de cromosomas homólogos. La recombinación homóloga y no homóloga (es decir, entre cromosomas de diferente tipo morfológico) también se produce durante varios mecanismos de reparación del DNA y puede inducirse in vitro con DNA purificado y enzimas. (Fig. 5-10)

Recombinación del DNA Proceso por el cual dos moléculas de DNA con secuencias similares se cortan y vuelven a unirse para generar dos moléculas de DNA recombinantes con secuencias compuestas por porciones de cada progenitor. (Figs. 4-42 y 4-43)

Red trans-Golgi Red compleja de membranas y vesículas que sirven como punto principal de ramificación en la **vía secretora**. Las vesículas brotan desde el compartimiento del Golgi más distal llevando proteínas solubles y de membrana hasta la superficie celular o a los lisosomas. (Figs. 14-1 y 14-17)

Reducción Ganancia de electrones por un átomo o molécula como sucede cuando un átomo de hidrógeno se añade a una molécula o se extrae uno de oxígeno. Lo opuesto a la **oxidación**.

Región de control de la transcripción Término colectivo para todas las secuencias reguladoras del DNA que controlan la transcripción de un gen particular.

Repeticiones terminales largas (LTR, long terminal repeats) Secuencias de repeticiones directas que contienen hasta 600 pares de ba-

ses, que flanquean la región codificante del DNA retroviral integrado y **retrotransposones** virales.

Represor **Factor de transcripción** específico que inhibe la transcripción.

Residuo Término general para las unidades repetidas en un polímero que permanece después de la unión covalente a los precursores monoméricos.

Resolución Distancia mínima entre dos objetos que puede distinguirse por un aparato óptico; también llamada *poder de resolución*.

Resolución de cromátidas hermanas El proceso de desenredar las **cromátidas hermanas** entrelazadas durante la profase.

Respiración La conversión de energía de los nutrientes en ATP mediante una serie de reacciones catalizadas por proteínas que implica, reacciones de oxidación y reducción asociadas con la membrana, llamada cadena de transporte de electrones, que finalmente se asocian con la adición de P_i al ADP (fosforilación oxidativa) para formar ATP y la transferencia de los electrones al oxígeno u otros aceptores electrónicos inorgánicos.

Respiración aerobia Véase **Oxidación aeróbica**

Respiración anaerobia Respiración en la cual se utilizan moléculas diferentes al oxígeno, como sulfatos o nitratos, como aceptores finales de electrones transportados por la cadena de transporte de electrones.

Retículo endoplasmático (RE) Red de estructuras membranosas interconectadas dentro del citoplasma de las células eucariontes contigua a la cubierta nuclear externa. El **RE rugoso**, que se asocia con los **ribosomas**, está involucrado en la síntesis y el procesamiento de proteínas secretadas y de membrana; el **RE liso**, que no tiene ribosomas, está involucrado en la síntesis de lípidos. (Fig. 9-32)

Retículo sarcoplasmático Red de membranas en el citoplasma de una célula muscular que secuestra iones Ca^{2+} ; la liberación del Ca^{2+} almacenado inducida por la estimulación muscular desencadena la contracción. (Fig. 17-34)

Retrotransposón Tipo de **elemento transponible del DNA** cuyo movimiento en el genoma está mediado por un intermediario de RNA e implica un paso de transcripción inversa. Véase también **Transposón**. (Fig. 6-8b)

Retrovirus Tipo de virus eucarionte que contiene un genoma RNA que se replica en las células haciendo primero una copia de DNA del RNA. Este DNA viral es insertado en el DNA cromosómico celular formando un **provirus**, y da lugar a otros RNA genómicos y también a los mRNA para proteínas virales. (Fig. 4-49)

Ribosoma Complejo grande que comprende diversas moléculas de **rRNA** diferentes y hasta 83 proteínas, organizado en una subunidad grande y una subunidad pequeña; la maquinaria de **traducción** (síntesis proteica). (Figs. 4-22 y 4-23)

Ribozima Molécula de RNA con actividad catalítica. Las ribozimas actúan en el procesamiento del RNA y la síntesis de proteína.

Ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa Enzima localizada en los cloroplastos que cataliza la primera reacción en el **ciclo de Calvin**, la adición de CO₂ a un azúcar de cinco carbonos (ribulosa 1,5 bifosfato) para formar dos moléculas de 3-fosfoglicerato; también llamada **RuBisCO**. (Fig. 12-45)

RISC Véase **Complejo silenciador inducido por RNA**

RNA (ácido ribonucleico) Polímero lineal de hebra simple compuesto por **nucleótidos de ribosa**. Los mRNA, rRNA y tRNA cumplen diferentes funciones en la síntesis de proteínas; una variedad de pequeños RNA cumple cierta función en el control de la estabilidad y la traducción de los mRNA y en controlar la estructura y la transcripción de la cromatina. (Fig. 4-17)

RNA mensajero Véase **mRNA**

RNA polimerasa Enzima que copia una hebra de DNA (la hebra *molde*) para sintetizar la hebra de RNA complementaria usando como sustratos ribonucleósidos trifosfato. (Fig. 4-11)

RNA ribosómico Véase **rRNA**

Rotura de la doble hebra (*double strand break*) Forma de daño del DNA en la que ambos esqueletos de azúcar-fosfato del DNA están cortados.

rRNA (RNA ribosómico) Cualquiera de las moléculas de RNA grande componentes estructurales y funcionales de los **ribosomas**. A menudo designados por su coeficiente de sedimentación: 28S, 18S, 5,8S y 5S rRNA en los eucariontes superiores (Fig. 4-22)

RuBisCO Véase **Ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa**.

Sarcómero Unidad estructural repetitiva del músculo estriado (esquelético) compuesto por superposición organizada de filamentos finos (**actina**) y filamentos gruesos (**miosina**) y que se extiende desde un disco Z hasta uno J adyacente; se acorta durante la contracción. (Figs. 17-31 y 17-32)

Saturado Referido a un compuesto (p. ej., ácido graso) en el cual todos los enlaces carbono-carbono son enlaces simples.

SCF (Skp1, Cullin, proteínas caja F) Ubiquitinproteínligasa que ubiquitina inhibidores de CDK de la fase S y muchas otras proteínas, marcándolas para la degradación por los proteosomas.

Secuencia de activación corriente arriba (en dirección 5') (UAS, *upstream activating sequence*) Cualquier secuencia reguladora de unión a proteína en el DNA de levaduras y otros eucariontes simples que es necesaria para la expresión máxima de genes; equivalente a un intensificador o un elemento proximal al promotor en los eucariontes superiores. (Fig. 7-22)

Secuencia señal Secuencia de aminoácidos relativamente corta dentro de una proteína que dirige la proteína hacia una localización especí-

fica dentro de la célula; también denominada *péptido señal y secuencia de marcado para la captación*. (Cuadro 13-1)

Secuencia topogénica Segmento dentro de una proteína cuya secuencia, número y ordenamiento dirige la inserción y la orientación de varias clases de proteínas transmembrana dentro de la membrana del retículo endoplasmático. (Fig. 13-14)

Segmentación (*cleavage*) En embriogénesis, serie de divisiones celulares rápidas que se producen después de la fecundación y con poco crecimiento celular, lo que lleva a la generación de células cada vez más pequeñas; culmina en la formación de los blastocistos en los mamíferos o en la blástula en otros animales. (Fig. 21-3)

Segregación Proceso que distribuye un complemento igual de cromosomas a las células hijas durante la mitosis y la meiosis.

Segundo mensajero Pequeña molécula intracelular (p. ej., cAMP, cGMP, Ca²⁺, DAG, y IP₃) cuya concentración se incrementa (o disminuye) en respuesta a la unión de una señal extracelular y que funciona en la **transducción de señal**. (Fig. 15-8)

Selectinas Familia de **moléculas de adhesión celular** que median las interacciones dependientes de Ca²⁺ con restos específicos de oligosacáridos en las glucoproteínas y los glucolípidos sobre la superficie de células adyacentes o en glucoproteínas extracelulares. (Figs. 20-2 y 20-39)

Sensor Que mide una propiedad intra o extracelular y la convierte a una señal.

Señal de clasificación Secuencia relativamente corta de aminoácidos dentro de una proteína que dirige la proteína a las vesículas de transporte particular a medida que se desprenden por gemación desde una membrana donante en la vía secretora o endocítica. (Cuadro 14-2)

Separación de centrosomas Describe el proceso de la segregación de los centrosomas durante la profase

Seudogén Secuencia de DNA que es similar a la del gen funcional pero no codifica un producto funcional; probablemente surja por deriva de secuencias de genes duplicados.

Silenciador Secuencia en el DNA eucarionte que promueve la formación de estructuras de cromatina condensada en una región localizada, bloqueando de esta forma el acceso de proteínas necesarias para la transcripción de genes dentro de varios cientos de pares de bases del silenciador; también se denomina *secuencia silenciadora*.

Silenciamiento génico por siRNA (*knockdown*) Técnica para inhibir experimentalmente la traducción de un mRNA específico usando **siRNA**; útil para reducir la actividad de una proteína, especialmente en organismos que no son adecuados para los métodos genéticos clásicos de aislamiento de mutantes con pérdida de función.

Silenciamiento por siRNA Procedimiento que induce la degradación de un RNA específico por transfección de células con RNA doble hebra que tienen una hebra con la misma secuencia que el RNA dia-

na. Este RNA doble hebra se llama **siRNA** por la sigla del inglés *short-interfering RNA*.

Simporte Tipo de **cotransporte** en el cual una proteína de membrana (*simporte*) transporta dos moléculas o iones diferentes a través de una membrana celular en la *misma* dirección. Llamado también **co-transporte unidireccional**. Véase también **Antiporte**. (Fig. 11-2, [3B])

Sinapsis Región especializada entre un axón terminal de una neurona y una neurona adyacente u otra célula excitable (p. ej., célula muscular) a través de la cual se transmiten los impulsos. En una sinapsis *química*, el impulso es conducido por un **neurotransmisor**; en una sinapsis *eléctrica*, la transmisión del impulso se produce a través de las **uniones de hendidura** que conectan las células pre y postsinápticas. (Fig. 22-3)

Sinapsis excitatoria Sinapsis en la cual un neurotransmisor induce una despolarización de la célula sináptica favoreciendo la generación de un potencial de acción.

Sinapsis inhibitoria Sinapsis en la cual el neurotransmisor induce una hiperpolarización de la célula postsináptica, inhibiendo la generación de un potencial de acción.

Sindecanos Clase de **proteoglucanos** de superficie celular que actúan en la adhesión entre célula y matriz, interactúan con el citoesqueleto y puede unirse a señales externas, participando de este modo en la señalización intercelular.

Sintenia Aparición de genes en el mismo orden en un cromosoma en dos o más especies diferentes.

siRNA RNA pequeño de hebra doble de 21-23 nucleótidos de longitud con dos nucleótidos de hélice sencilla en cada extremo. Un siRNA de una hélice se asocia con diversas proteínas para formar un **complejo silenciador inducido por RNA (RISC)** que corta los RNA diana a los cuales se aparea perfectamente el siRNA; llamado también *RNA de interferencia pequeño* y *RNA inhibidor pequeño*. Los siRNA pueden diseñarse para inhibir experimentalmente la expresión de genes específicos. Véase también **miRNA**. (Fig. 8-25b)

Sistema de reparación por escisión del DNA Uno de los varios mecanismos para la reparación del daño del DNA por despurinización o desaminación espontánea o por exposición a **carcinógenos**. Estos sistemas de reparación normalmente funcionan con un alto grado de fidelidad y su pérdida está asociada con el aumento en el riesgo de ciertos cánceres.

Sistema de respuesta al daño del DNA Vía que detecta el DNA dañado e induce la detención del ciclo celular y las vías de reparación del DNA.

Sitio activo Región específica de una enzima que se une a molécula(s) de **sustrato** y promueve un cambio químico en el sustrato al que se une. (Fig. 3-21)

Sitio CAP Secuencia del DNA bacteriano a la que se une la proteína activadora de catabolitos (CAT, *catabolite activator protein*), también conocida como la proteína reguladora del AMP cíclico. (Fig. 7-3)

Smads Clase de factores de transcripción activados por fosforilación seguida por la unión de miembros de la familia del **factor de crecimiento transformador β (TGF β)** de moléculas de señal a sus receptores de superficie celular. (Fig. 16-28)

SNARE Proteínas integrales de membrana y citosólicas que promueven la fusión de vesículas con las membranas diana. La interacción de **v-SNARE** sobre una vesícula con **t-SNARE** afines sobre una membrana forma complejos muy estables, y coloca a la vesícula y a las membranas diana en estrecha aposición. (Fig. 14-10)

snRNA (RNA nucleolar pequeño) Tipo de RNA pequeño, estable que actúa en el procesamiento de rRNA y la modificación básica en el nucléolo.

snRNA (RNA nuclear pequeño) Uno de los diversos RNA estables pequeños localizados en el núcleo. Cinco snRNA son componentes del espliceosoma y actúan en el procesamiento del pre-mRNA. (Figs. 8-9 y 8-11)

Solución amortiguadora (*buffer*) Solución de las formas ácido (HA) y base (A^-) de un compuesto que sufre pocos cambios en el pH cuando se añaden pequeñas cantidades de ácido o base fuerte en valores de pH cercanos al pK_a del compuesto.

Sonda (*probe*) Fragmento definido de DNA o RNA, marcado en forma radiactiva, fluorescente o química, usado para detectar secuencias específicas de ácidos nucleicos mediante hibridación.

Southern blot (transferencia Southern) Técnica para la detección de secuencias de DNA específicas separadas por electroforesis mediante hibridación con una **sonda** de ácido nucleico marcada. (Fig. 5-26)

START Punto de inicio en el ciclo celular en el que las células están irreversiblemente comprometidas con la división celular y no pueden retornar a la etapa G_1 .

Superfamilia ABC Grupo grande de proteínas integrales de membrana que a menudo actúan como **proteínas transportadoras de membrana** para mover diversas moléculas (p. ej., fosfolípidos, colesterol, azúcar, iones, péptidos) a través de las membranas celulares. (Fig. 11-15).

Superfamilia de las GTPasa Grupo de proteínas interruptoras intracelulares que alternan entre un estado inactivo con GDP unido y un estado activo con GTP unido. Incluye la subunidad $G\alpha$ de las **proteínas G triméricas (grandes)**, las **proteínas G monoméricas (pequeñas)** (p. ej., Ras, Rab, Ran, y Rac), y ciertos **factores de elongación** usados en la síntesis proteica. (Fig. 3-32)

Surco de segmentación (*cleavage furrow*) Indentación en la membrana plasmática que representa los pasos iniciales en la citocinesis.

Sustrato Molécula que sufre un cambio en una reacción catalizada por una enzima.

Tamaño celular crítico Define el tamaño que una célula debe alcanzar antes de que pueda entrar en el ciclo celular.

Telofase Etapa mitótica final durante la cual se vuelve a formar la envoltura nuclear alrededor de dos conjuntos de cromosomas separados, se descondensan los cromosomas y se completa la división del citoplasma (citocinesis). (Fig. 18-36)

Telómero Región en cada extremo de un cromosoma eucarionte que contiene múltiples repeticiones en tándem de una secuencia telomérica corta (TEL). Los telómeros son necesarios para la correcta **segregación** de los cromosomas y son replicados mediante un proceso especial que evita el acortamiento de los cromosomas durante la replicación del DNA. (Fig. 6-47)

Terminación de la transcripción Finalización de la síntesis de una hebra de RNA. (Fig. 4-11)

Tilacoides Sacos membranosos aplanados en un cloroplasto que pueden estar apilados y contener los pigmentos fotosintéticos y fotosistemas. (Fig. 12-31)

Tinción fluorescente Técnica general para la visualización de los componentes celulares mediante el tratamiento de las células o los tejidos con un agente marcado con un colorante fluorescente (p. ej., anticuerpo) que se une específicamente a un componente de interés y la observación de la muestra por microscopia fluorescente.

Tipo silvestre Forma normal no mutante de un gen, proteína, célula u organismo.

Tolerancia Ausencia de una respuesta inmunitaria a un antígeno o grupo de antígenos particular.

Traducción Ensamblaje mediado por **ribosomas** de un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos está especificada por la secuencia de nucleótidos en un mRNA. (Fig. 4-17)

Transcitosis Mecanismo para el transporte de ciertas sustancias a través de una capa de epitelio que combina la **endocitosis** y la **exocitosis mediada por receptor**. (Figs. 14-25 y 23-10)

Transcripción Proceso en el cual una RNA polimerasa usa una hebra de una molécula de DNA como molde para la síntesis de un RNA complementario. (Figs. 4-10 y 4-11)

Transcriptasa inversa Enzima que se encuentra en los retrovirus y cataliza una reacción compleja en la cual se sintetiza un DNA doble hebra a partir de un molde de RNA de hebra simple. (Fig. 6-14)

Transcrito primario En los eucariontes, producto inicial del RNA, que contiene **intrones** y **exones**, producido por la transcripción del DNA. Muchos Transcritos primarios deben sufrir un procesamiento del RNA para convertirse en las formas de RNA fisiológicamente activas.

Transducción de la señal Conversión de una señal de una forma física o química en otra. En biología celular suele referirse a al proceso secuencial iniciado por la unión de una señal extracelular a un receptor y culmina en una o más respuestas celulares específicas.

Transfección Introducción experimental de DNA extraño en células en cultivo, normalmente seguida por la expresión de los genes del DNA introducido. (Fig. 5-32)

Transformación (1) Alteración permanente y heredable en una célula que resulta de la captación e incorporación de un DNA extraño dentro del genoma de una célula huésped; también llamada *transfección estable*. (2) Conversión de una célula de mamífero “normal” en una célula con propiedades similares a las cancerosas, en general inducida por el tratamiento con un virus u otro agente oncogénico.

Transgén Gen clonado introducido e incorporado de forma estable en una planta o animal y transmitido a las generaciones sucesivas.

Transición epitelio a mesénquima Describe un programa de desarrollo durante el cual las células epiteliales adquieren las características de las células mesenquimatosas. Las células pierden sus propiedades adhesivas y adquieren movilidad.

Translocación cotraduccional Transporte simultáneo de una proteína secretora dentro del retículo endoplasmático mientras que la proteína naciente aún está unida al ribosoma y se está alargando. (Fig. 13-6)

Translocón Complejo multiproteico de la membrana del retículo endoplasmático rugoso a través del cual una proteína secretora naciente entra en la luz del RE a medida que es sintetizada. (Fig. 13-7)

Transportador Proteínas de membrana que sufren cambios conformacionales a medida que mueven una amplia variedad de iones y moléculas a través de las membranas celulares a una velocidad menor que la de los canales. Véase *uniporte*, *simporte* y *antiporte* en la Fig. 11-3.

Transportador de electrones Cualquier molécula o átomo que acepta electrones a partir de moléculas dadoras y los transfiere a las moléculasceptoras en reacciones de **oxidación** y **reducción** acopladas. (Cuadro 12-2)

Transporte activo Movimiento mediado por proteínas de un ion o una molécula pequeña a través de la membrana en contra de su gradiente de concentración o gradiente electroquímico impulsado por la hidrólisis acoplada de ATP. (Fig. 11-2[1]; Cuadro 11-1)

Transporte de electrones Flujo de electrones a través de una serie de transportadores desde los dadores de electrones (p. ej., NADH) hasta el O₂ en la membrana mitocondrial interna, o desde el H₂O hasta el NADP⁺ en la membrana de tilacoides de los cloroplastos de plantas. (Figs. 12-19 y 12-32)

Transporte facilitado Transporte mediado por proteínas de un ion o una molécula pequeña a través de la membrana celular en contra de su gradiente de concentración a una velocidad mayor a la obtenida por difusión simple; también llamada *difusión facilitada*. (Cuadro 11-1)

Transporte fotoeléctrico Transporte de electrones inducido por luz que genera una separación de cargas a través de la membrana **tilacoide** que genera los acontecimientos posteriores de fotosíntesis. (Fig. 12-35)

Transposición Movimiento de un elemento transponible del DNA dentro del genoma; se produce por un mecanismo de corte y empalme. (Fig. 6-8)

Transposón de DNA Elemento transponible del DNA presente en procariontes y eucariontes que se mueve en el genoma por un mecanismo que involucra síntesis y transposición del DNA. Véase también **Retrotransposón**. (Figs. 6-9 y 6-10)

Triglicérido Forma principal en la cual se almacena y transportan los ácidos grasos en los animales; consiste en tres cadenas de ácido graso esterificadas a una molécula de glicerol.

tRNA (RNA de transferencia) Grupo de moléculas de RNA pequeñas que funcionan como donadores de aminoácidos durante la síntesis de proteínas. Cada tRNA se une covalentemente a un aminoácido particular, formando un **aminoacil-tRNA**. (Figs. 4-19 y 4-20)

Tropoectodermo Parte de un embrión temprano de los mamíferos que formará los tejidos extraembrionarios, incluye la placenta pero no el embrión propiamente dicho.

Tubulina Familia de proteínas del citoesqueleto que se polimerizan para formar la pared cilíndrica de los **microtúbulos**. (Fig. 18-3)

Tumor Masa de células, en general derivadas de una única célula, que surge debido a la pérdida de los reguladores normales del crecimiento celular; puede ser **benigno** o **maligno**.

Ubiquitina Proteína pequeña que puede unirse covalentemente con otras proteínas intracelulares; la ubiquitina de esta manera marca las proteínas para su degradación por parte del proteosoma, las clasifica para el lisosoma o provoca una alteración en la función de la proteína diana. (Fig. 3-29)

Unidad de transcripción Región del DNA limitada por un sitio de inicio y un sitio de terminación que es transcripta a un único **Transcrito primario**.

Unión de anclaje Regiones especializadas en la superficie celular que contienen **moléculas de adhesión celular** o **receptores de adhesión**; incluyen las *uniones de adherencia* y los *desmosomas*, que median la adhesión entre célula y célula, y los *hemidesmosomas*, que median la adhesión la célula y la matriz. (Figs. 20-13 y 20-15)

Unión celular Regiones especializadas de la superficie celular a través de las cuales las células se unen unas con otras o con la matriz extracelular. (Fig. 20-10; Cuadro 20-2)

Unión o configuración anfitélica Describe la correcta adhesión de los cromosomas al huso mitótico, donde los cinetocoros hermanos se unen a los microtúbulos que nacen de polos opuestos. (Fig. 18-36)

Unión o configuración merotélica Indica que un solo cinetocoro se une a los microtúbulos que nacen de dos polos opuestos del huso.

Unión o configuración monotélica Indica que solo una de las hermanas del par cinetocórico se adhiere a los microtúbulos.

Unión o configuración sintélica Indica que los cinetocoros de un par de **cromátidas hermanas** se unen a los microtúbulos que nacen del mismo polo.

Unión estrecha Tipo de unión intercelular entre las membranas plasmáticas de células epiteliales adyacentes que evitan la difusión de macromoléculas y muchas moléculas pequeñas e iones en los espacios entre las células y la difusión de componentes de la membrana entre las regiones apical y basolateral de la membrana plasmática. (Fig. 20-16)

Unión de extremos no homólogos Vía que repara las roturas de la doble hebra en el DNA, en la que los extremos rotos se unen directamente sin necesidad de un molde homólogo.

Unión en hendidura (de tipo gap) Canal recubierto de proteínas que conecta los citoplasmas de células animales adyacentes y permite el paso de iones y pequeñas moléculas entre las células. Véase también **Plasmodesmo**. (Fig. 20-20)

Vacuna Preparación inocua derivada de un patógeno y diseñada para provocar una respuesta inmunitaria con el propósito de proporcionar inmunidad contra una futura exposición a una forma virulenta del mismo patógeno.

Vacuola contráctil Vesícula hallada en muchos protozoarios que toma agua del citosol y elimina periódicamente su contenido mediante fusión con la membrana plasmática.

Vaina de mielina Membrana celular especializada apilada que forma una capa aislante alrededor de los **axones** de vertebrados e incrementa la velocidad de la conducción del impulso. (Fig. 22-15)

Vector En biología celular, elemento genético de replicación autónoma usado para llevar un cDNA o fragmentos de DNA genómico a una célula huésped con propósitos de clonación génica. En general se usan vectores que son plásmidos bacterianos y genomas de bacteriófagos modificados. Véase también **Vector de expresión** y **Vector lanzadera**. (Fig. 5-13)

Vector de expresión Plásmido modificado o virus que transporta un gen o cDNA al interior de una célula huésped adecuada y que allí dirige la síntesis de la proteína codificada; usado para rastrear una genoteca de DNA en busca de un gen de interés o para producir grandes cantidades de una proteína a partir de su gen clonado. (Figs. 5-31 y 5-32)

Vector lanzadera (shuttle) Vector plásmido capaz de propagarse en dos huéspedes diferentes. (Fig. 5-17)

Velocidad máxima Véase $V_{\text{máx}}$.

Vesícula sináptica Vesículas pequeñas en el extremo del axón que contienen un neurotransmisor y que sufren exocitosis al llegar un potencial de acción.

Vesícula de transporte Compartimiento pequeño delimitado por membrana que transporta proteínas solubles y de membrana en la dirección directa o inversa a la **vía secretora**. Las vesículas se forman por

gemación del orgánulo donante y liberan sus contenidos por fusión con las membranas diana.

Vía endocítica Vía celular que involucra la **endocitosis mediada por receptor**, que internaliza materiales extracelulares demasiado grandes para ser importados por las proteínas de transporte de membrana y retira proteínas receptoras de la superficie celular como una vía para regular por disminución su actividad. (Fig. 14-29)

Vía del punto de control Mecanismo de vigilancia que evita la iniciación de cada paso en la división celular hasta que los pasos previos de los cuales depende se hayan completado y se hayan corregido los errores que se producen durante el proceso.

Vía del punto de control del ensamblaje del huso Vía que censa la unión incorrecta de los cromosomas a los husos mitóticos e induce la detención del ciclo celular en metafase.

Vía del punto de control de la posición del huso Vía que comprueba la unión incorrecta de los cromosomas al huso mitótico e induce la detención del ciclo celular en metafase.

Vía secretora Vía celular de síntesis y corte de proteínas solubles y de membrana localizada en el retículo endoplasmático, en el Golgi y en los lisosomas; también proteínas de la membrana plasmática y proteínas que finalmente son secretadas por la célula. (Fig. 14-1)

Vigilancia del mRNA Procesos que conducen a la degradación de un pre-mRNA o mRNA que ha sido procesado de manera inadecuada.

Virión Partícula viral individual.

Virus Parásito intracelular pequeño compuesto por ácido nucleico (DNA o RNA) envuelto en una cubierta proteica que puede replicarse solo en una célula huésped adecuada; ampliamente usado en la investigación biológica celular. (Fig. 4-44)

$V_{\text{máx}}$ Parámetro que describe la velocidad máxima de una reacción catalizada por enzima u otros procesos como el transporte mediado por proteína de moléculas a través de la membrana. (Figs. 3-22 y 11-4).

Wee1 Una proteintirosinasa; fosforila CDK en la treonina 14 o tirosina 15 para inhibir la actividad CDK.

Wnt Familia de proteínas de señalización usadas en el desarrollo de la mayoría de los tejidos en casi todos o todos los animales. Las mutaciones de los componentes de la transducción de señales Wnt están implicadas en el cáncer humano, en especial el cáncer de colon. Los receptores son proteínas de la clase Frizzled con siete segmentos transmembrana. (Fig. 16-30)

Zona media del huso Porción media del huso mitótico que cumple un papel importante en el posicionamiento del surco de segmentación en algunos organismos.

ÍNDICE ANALÍTICO

Los números de página seguidos por "c" indican un cuadro y los seguidos por "f" una figura.

1000 Genomes Project, 252

A

A-SNAP, 639

Acetabularia, 133

Acetil CoA, 465

- definición, 527

- estructura, 529f

Acetilación, 36, 258

- de la histona, 317

Acetilcolina, 1036

- receptores, 692

Ácidos(s)

- amortiguadores, 47, 47f

- aspártico, 34

- biliares, 450

- desoxirribonucleico, Véase *DNA (ácido desoxirribonucleico)*

- glutámico, 34

- grasos, Véase *Ácidos grasos*

- iones hidrógeno, 45, 47f

- nucleicos, 6, 116

Ácidos grasos

- definición, 40

- facilitación del movimiento, 465

- fosfolípidos, 40, 41c, 464

- grupos acilo, 40

- insaturados, 40, 41, 465

- oxidación mitocondrial, 528

- oxidación peroxisómica, 531, 531f

- poliinsaturados, 40

- roles, 465

- saturados, 40, 465

Ácidos nucleicos

- bases, 116

- decodificación en una secuencia de aminoácidos, 134

- direccionalidad química, 118, 118f

- estructura, 116

- hibridación, 9, 121

- información codificada, 7

- polímeros, 33, 117

Acilación, 460

Acilo, 40

Acoplamiento metabólico, 84, 943

Actina

- características, 776

- definición, 776

- dinámica, 789, 789f

- ensamblado dependiente de Arp2/3, 788f

- F

- - definición, 777

- - estructura, 778f

- - polaridad estructural y funcional, 778

- - polímeros, 777

- fagocitosis, 789f

- fase de elongación, 779

- fase estable, 780

- filamentos, Véase *Filamentos de actina*

- haces contráctiles, 804

- nucleación, 779, 784f

- polimerización, 779, 780f, 787, 787f

- proteínas de nucleación, 784

- toxinas que afectan la acumulación, 789

- uniones a la membrana, 793

- G, Véanse también *Actina; Filamentos de actina*

- - definición, 777

- - estructuras, 778f

- - monómeros, 777

- - in vitro, 780f

Actinina α , 790

Activación

- de aminoácidos, 134

- de caspasas, 1013, 1099

- CDK mitótico, 898

- cinasa MAP, 739

- factores de remodelado de la cromatina, 319

- PKA, 703

- PKB, 746f

- proteína Ras, 736f

- proteínas G, 690, 690f

- proteincinasas, 677

- rodopsinas, 694

- TLR, 1102f, 1103

- transcripción, 314

- vía NF κ -B, 757, 758f

Activador(es)

- coactivadores, 311

- en la dirección de la acetilación de las histonas, 319

- empalme del RNA, 361

- estructura modular, 307f

- del plasminógeno tisular (TPA), 68

- promoción de la transcripción, 306

- regulación de la transcripción, 283

- unión alejada de los promotores, 286

- unión a promotores, 322

- unión a regiones del DNA, 282

Actividad de ATPasa activada por actina, 795

Actividad de cinasa, 875

- fase S, 882

- función en el ciclo celular, 884c

- generalidades de la regulación del ciclo celular, 884f

- mitóticas, 883

- oscilaciones, 876

- regulación por la actividad inhibidora de la fosforilación, 888

- requerimiento de subunidad de ciclina reguladora, 884

Acuaporinas

- definición, 480

- estructura, 482f

- expresión en ovocitos de rana, 482f

- familia, 483

- permeabilidad al agua, 481

ADAM, proteínas, 761

Adaptación visual, 698

Adenilato cinasa, 7f

Adenilciclase

- activación e inhibición inducida por hormonas, 700f

- complejos receptor-ligando, 699

- definición, 692

- receptores acoplados a proteínas G, 698

- síntesis de cAMP e hidrólisis por, 699f

- unión G α s-GTP, 700, 700f

Adenosina difosfato, Véase ADP (adenosina difosfato)

Adenosina trifosfato, Véase ATP (adenosina trifosfato)

Adenovirus, 21

Adhesión

- entre la célula y la matriz extracelular, 939

- celular

- - homotípica específica de la especie, 931

- - mediada por la integrina, 961

- - rol de la matriz extracelular, 929

- - sustrato, 808

- focalizada, 776, 793, 809

- homotípica, 928

- intercelular

- - funciones, 927

- - generalidades, 926f, 927

- - mediación por cadherina, 935

- - modelo de generación, 929

- - roturas, 931

- a la matriz celular

- - funciones, 926

- - generalidades, 926f, 927

- - multicelularidad, 17

- - roturas, 931

ADP (adenosina difosfato)

- conversión en ATP, 54

- definición, 5

- fosforilación, 519

- liberación, chaperonas moleculares, 73

- tasa de oxidación mitocondrial, 552

Adrenalina, mediación de la respuesta al estrés, 688

Afinidad

- cromatografía, 96, 97f, 685

- maduración, 1077

- unión a proteínas, 76

Agonistas, 682

Agrina, 1037

Agua

- enlaces de hidrógeno, 28f

- molécula, naturaleza de dipolo, 26f

- presión osmótica, 480

- Agua (Cont.)
 - transporte facilitado, 479
- Aislantes, 263
- Alanina, 33, 36
- Alelo(s), 1141
 - autosómico dominante, 206, 206c
 - autosómico recesivo, 206, 206c
 - CDK, 888
 - definición, 172
 - dominante, 172
 - - negativo, 215
 - RB, 1140
 - recesivo, 172
 - - ligado al cromosoma X, 206, 207c
 - segregación, 176f
- Alfa (α) hélice, 61, 62f
- Almidón
 - definición, 552
 - estructura, 552f
 - polímero de la glucosa, 39
- Alosterismo, 88
- Alport, síndrome de, 950
- Alzheimer, enfermedad de
 - filamentos amiloides, 76, 76f
 - segmentación inapropiada, 762
 - segmentación proteolítica, 761f
- Amiloide, filamentos de, 77, 77f
- Aminas heterocíclicas, 1146
- Aminoácidos
 - activación, 135
 - alipático, 34
 - básico, 34, 34f
 - cadenas laterales, 33, 35f
 - común, 35f
 - epitopo, 410
 - esencial, 36
 - estructura, 32
 - formación de proteínas, 7, 32
 - hidrófilo, 34, 34f
 - hidrófobo, 32, 35f
 - polar, 33
 - residuos, 33
 - secuencias, 9f
 - - decodificantes, 135f
 - - plegamiento de las proteínas, 70
 - tallo aceptor, 133
 - transporte transcelular, 508
 - tRNA, 134
- Aminoacil-tRNA sintetasas, 133, 135
- Amoeba dubia, 231
- Amoebidium, 248
- Amortiguadores
 - ácido acético, 47, 47f
 - capacidad amortiguadora, 47
 - mantenimiento del pH, 47f
- AMP (adenosina monofosfato), 53
- cAMP (AMP cíclico)
 - activación de la proteincinasa, 701
 - amplificación de la señal, 703
 - aumento inducido por hormonas, 704c
 - fosfodiesterasa, 699f, 705
 - integración del segundo mensajero, 711, 712f
 - localización de los efectos, 704, 705f
 - regulación del metabolismo del glucógeno, 703
 - relación con la activación de la transcripción génica, 703
- segundo mensajero, 679
- síntesis e hidrólisis por adenilato ciclasa, 699f
- síntesis, estimulación por GTP, 719
- AMP cinasa (AMPK), 377
- Amplificación
 - DNA, 1124
 - gen, 1125
 - reacción en cadena de la polimerasa (PCR), 193, 193f, 197
 - secuenciación del DNA, 191, 192f
 - señal
 - - GPCR, 680, 680f
 - - rodopsina, 696
 - - en la vía del cAMP/PKA, 704
- Anaerobios facultativos, 522
- Anafase, Véase también *Mitosis*
 - definición, 850, 876
 - movimiento de los cromosomas a los polos, 855, 857f
 - separación a los polos, 857
- Análisis
 - genético
 - - ciclo celular, 877, 878f
 - - mutaciones, 171
 - iRNA, 434f
 - de microensayos del DNA
 - - definición, 1123
 - - ilustración, 1124f
 - - patrones de expresión, 1123
 - químicos, 430, 432f
 - siRNA, 433
- Aneuploidia, 849, 1122
- Anillo contráctil, 776, 858, 905
- Animales
 - ciclo de replicación lítica, 163f
 - regulación del desarrollo de los órganos, 19f
 - subestructuras celulares, 425f
 - virus, 160, 161
- Aniones, 28
 - contratransportadores
 - - actividad, 505
 - - definición, 505
 - - transporte de CO₂, 506
- Antagonistas, 682
- Anticuerpo(s), 1059
 - afinidad, 97
 - de alta afinidad, 1104
 - definición, 77
 - descubrimiento, 1066
 - ensayos, 97
 - especificidad, 77
 - específicos de los orgánulos, 429
 - generación de diversidad, 1073
 - monoclonales, 401, 410, 1072
 - policlonales, 403, 410
 - reconocimiento del antígeno, 1081
 - suero, 1067f
 - unión a antígenos, 77
 - unión entre la proteína y el ligando, 77, 77f
 - visualización, 1059
- Antígeno(s)
 - adquisición, 1086
 - definición, 1060
 - del grupo sanguíneo AB0, 462f
 - presentación, 1085
 - - por las células B, 1091f
- procesamiento por el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I, 1087, 1087f
- procesamiento por el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II, 1089, 1090f
- procesamiento y presentación, 1086
- señalización para su destrucción, 1088
- T grande, 147
- unión a anticuerpos, 77
- Antitransportador de cationes, 504
- Antitransportador Clú/HCO₃ú, 505, 506f
- Aparato circulatorio, 1062f
- Apertura numérica, 405
- Apoptosis
 - definición, 86, 1007
 - mitocondrias en la regulación, 1011, 1012f
 - muerte celular, 907, 1006
 - regulación por proteínas BH3, 1013
 - vías extrínsecas, 1015f
 - vías, conservación evolutiva, 1007, 1008f
- Apoptosomas, 1013
- Apaf1, 1014f
- Apotransferrina, 659
- Arabidopsis thaliana, 8
 - mtDNA, 246
 - DNA del cloroplasto, 251
 - organismo de experimentación, 12f
 - pared celular, 968
 - miRNA, 372
- Arco reflejo, 1022
- Arginina, 34, 34f
- Arrestina
 - β , 706, 706f
 - transporte intracelular, 698
 - unión, 696
- Asparagina, 35, 35f
- Aspartato, 34, 34f
- Áster mitótico
 - alejamiento, 852
 - orientación, 851
- Astrocitos, 1023, 1024f
- Aterosclerosis, 468
- ATM, 909
- Átomos
 - de carbono asimétricos, 25
 - electronegatividad, 26
 - estructura electrónica, 25
 - isótopo pesado, 104
 - propiedades de unión, 26c
- ATP (adenosina trifosfato), 4
 - captura y transferencia de energía, 5f
 - células gástricas, 524
 - células musculares, 525
 - definición, 4
 - fermentación, 523
 - fotosíntesis, 5, 554
 - fuerza motora de los protones, 519f, 544
 - generación, 516, 524
 - hidrólisis, 52, 52f
 - - de los enlaces peptídicos, 459
 - - y movimiento de la miosina, 796, 798f
 - mecanismo de cambio de la unión, 547, 548f
 - moléculas, 53
 - oxidación mitocondrial, 528, 531f
 - oxidación peroxisómica, 531

- pasaje de protones a través de la ATP sintetasa, 549
- productos de degradación de los combustibles nutritivos, 519
- quimioósmosis, 545f
- síntesis
 - por ATP sintetasa, 545f
- traslocación postraduccional, 584, 586f
- unión
 - uso de chaperonas, 72
 - uso de chaperonina, 75

ATP sintasa

- complejos de proteínas F₀ y F₁, 546
- definición, 544
- estructura, 546
- incluida en la membrana, 546
- pasaje de protones a través de, 549
- síntesis de ATP, 545f

ATPasa, 476

- Ca²⁺, 485, 485f, 488f
- H⁺ clase V, 490
- H⁺/K⁺, 509
- Na⁺/K⁺, 489, 489f

ATR, 909

Aurora B, 901

Aurora cinasas, 898

Autoempalme

- intrones del grupo 2, 357
- proteína, 91
- RNA, 122

Autofagia, 377, 661, 664

Autorradiografía

- con electroforesis en gel, 100
- definición, 100
- usos, 100

Autosomas, 267

Axonema, 844

Axones, 1010

- guía, 1021
- mielinizados, 1033, 1033f
- movimiento de la información, 1021

B

Bacterias, Véase también *Escherichia coli*

- ciclo de replicación lítica, 162f
- control génico, 288
- control de la respuesta, 284
- control de la transcripción, 281
- expresión génica, 280
- organismo experimental, 12f
- parasitaria, 13
- mRNA policistrónica, 225
- secuencias de inserción, 236, 236f
- síntesis de ATP, 544

Bacteriófago, 160

Bases

- ácidos nucleicos, 37f, 116
- DNA, 6
- iones de hidrógeno, 45
- pirimidina, 117
- purina, 117

Bastones, 694, 694f, 698, 698f

Bax, 1012

Benzopireno, 1145, 1146f

Bibliotecas químicas, 430

Bicapas fosfolípicas

- ácidos grasos, 40, 41c, 465
- anulares, 459f
- biomembranas, 40
- clases lipídicas, 448, 449f
- colesterol, 449
- compartimento sellado, 446
- efectos de la composición lipídica, 453f
- esfingolípidos, 450
- estructura, 444
- formación, 444, 446f
- gel y líquido, 450f
- interacciones con proteínas, 457
- mecanismos de transporte, 469, 469f
- permeabilidad, 474f
- propiedades físicas, 40
- proteínas ABC, 491
- síntesis sobre la membrana del retículo endoplasmático, 465, 466f

Bioinformática, 252

Biología, evolución, 1

Biomarcadores, 108

Biomembranas, Véase *Membranas*

Biomoléculas, Véase *Moléculas*

BiP, 584

BLAST, algoritmo

- búsqueda de secuencias de proteínas, 252
- definición, 252, 256
- función, 251

Blastocitos, 979

Blastoporo, 19

Bombas de H⁺ de clase V, 490, 490f

Bombas impulsadas por ATP, 476, 483

- Ca²⁺, 485
- clase F, 483, 483f
- clase P, 483, 483f
- clase V, 483, 483f
- clases, 483
- electrógena, 490

- generación y mantenimiento de gradientes iónicos, 485

- H⁺ clase V, 490, 490f
- regulación de la calmodulina, 487
- superfamilia ABC, 483f, 484, 491

Borde conductor, 776

Bordetella pertussis, 692

Botulismo, 1041

BRCA-1, 1129, 1148

BRCA-2, 1148

Bromodominios, 261, 319

Burkitt, linfoma de, 1136, 1137f

C

C-Fos, 1136

C-Myc, 1120, 1136

Ca²⁺

- aumento inducido por hormonas, 708c
- bomba, 485
- canales con compuerta de voltaje, 1041
- complejo con calmodulina, 711
- concentraciones, 487
- integración con el segundo mensajero, 711, 712f
- iones, 485
- liberación del retículo endoplasmático, 708
- regulación de la contracción del músculo esquelético, 803, 803f, 804f

Ca²⁺+ATPasas, 487

- comparación con Na⁺/K⁺ ATPasa, 489f
- dependencia de la relajación muscular, 486
- estructura de la subunidad α catalítica, 488f
- mecanismo de acción, 486
- modelo operativo, 486f

Cadena(s)

- laterales

- definición, 33
- no polares, 33
- líder o conductora, 147, 148f
- esencial, 795
- reguladora, 795
- livianas, 796
- DNA de las células embrionarias, 1113f
- ensamblado de los segmentos de los genes V y J, 1075

- onmunoglobulinas, 1069

- región variable, 1071

- reorganización V-J, 1080

- pesadas

- inmunoglobulinas, 1068

- región variable, 1070

- reorganización del locus, 1075

- retrasada y rezagada, 147, 148f

- de transporte de electrones

- cadena respiratoria, 532

- definición, 519

- ilustración, 536f

- supercomplejos, 540, 541f

Cadherina(s)

- clásicas, 935
- desmosómica, 936, 938, 938f
- E, 936, 936f, 939f
- mediación de la adhesión intercelular, 935

Caenorhabditis elegans

- activación de la proteasa CED-3, 1009, 1009f
- células, 925
- células madre de la línea germinal, 987, 988f
- desarrollo muscular y nervioso, 19
- evaluación genómica con siRNA, 434
- genómica, 434
- linaje celular, 1000f
- organismo experimental, 12f
- receptor del tacto MEC-4, 1047, 1047f
- respuesta de iRNA, 373
- iRNA, 216

- secciones ópticas, 407

- transempalme, 356

- transporte del receptor de ECF, 733

Calcio, enlace no covalente, 88

Calmodulina

- definición, 488f
- regulación de la bomba en la membrana plasmática, 487

Calorías, 49

Calvin, ciclo de, 569

Cambio de marco de lectura, 133

Canal(es)

- con compuerta de cationes, 695
- con compuerta de voltaje
 - apertura y cierre secuencial, 1025
 - definición, 1025
 - estructura, 1029
 - secundaria, 1030f
 - K⁺, 1027, 1027f
 - Na⁺, 1026, 1026f, 1028f

- Canal(es) (*Cont.*)
 - iónicos, 1043
 - - activación secuencial en la unión neuromuscular, 1043f
 - - con compuertas, 1043f
 - - - de cationes, 1047
 - - - de voltaje, 1025
 - - elongados, 497
 - - filtro de selectividad, 497, 499f
 - - de K⁺ en reposo, 497, 498f
 - - medición del movimiento de iones, 499
 - - regulación de los receptores acoplados a proteína G, 693
 - - sin compuertas, 495
 - de K⁺
 - - con compuerta de voltaje, 1027
 - - estructuras secundarias, 1030f
 - - inactivación, 1032
 - - mutantes, experimentos, 1032f
 - - en reposo
 - - - definición, 497
 - - - estructura, 498f
 - - - selectividad y transporte de iones, 499f
 - - sensibles al voltaje, 1031f
 - - Shaker, 1029
 - - mecanorreceptores, 1047
 - - nociceptores, 1048
 - de traslocación, 579
- Cáncer, 1113
 - aberraciones en la vía de señalización, 1137
 - aumento de la incidencia en función de la edad, 1120f
 - bases genéticas, 1124
 - biología celular molecular, 1138
 - cambios celulares que causan, 1114f
 - carcinógenos, 1113, 1144
 - carcinomas, 1115
 - células madre, 1116
 - células tumorales, 1113
 - de colon, 1119, 1129
 - - desarrollo, 1121f
 - - formas hereditarias, 1129
 - - metástasis, 1121f
 - - modelo de inducción múltiple, 1119, 1122
 - - mutaciones oncogénicas sucesivas, 1120
 - - progresión, 1121
 - de pulmón, 1144
 - división celular, 1139
 - establecimiento, 1114
 - genes implicados en el establecimiento, 1127c
 - genes supresores tumorales, 1113
 - glioblastomas, 1115
 - leucemias, 1115
 - linfomas, 1115
 - de mama, 1123, 1138
 - - análisis de micromatrices de DNA, 1123, 1124f
 - - biología celular molecular, 1138
 - - hereditario, 1128
 - - respuestas terapéuticas, 1123
 - - tratamiento, 1138
 - metástasis, 1114, 1116f
 - modelo de inducción múltiple, 1119
 - modelo de ratón, 1131, 1132f
 - oncogenes, 1124
 - pérdida del sistema de reparación del DNA, 1146
 - protooncogenes, 1113, 1124
 - pulmón, 1144
 - regulación anormal de las vías reguladoras del crecimiento, 1131
 - sarcomas, 1115
 - tumores, 1113
- Cápsides, 160
- Capuchón 5'
 - complejo de unión al capuchón nuclear, 360
 - síntesis en el mRNA eucariótico, 350f
- Capuchón GTP- β -tubulina, 829, 829f
- Carbono
 - átomos asimétricos, 25
 - átomos quirales, 25
 - fijación, 555
 - geometría de los enlaces, 25f
- Carcinógenos
 - cáncer, 1143
 - conexiones específicas con el cáncer, 1145
 - directos, 1145
 - exposición, 1113
 - indirectos, 1145
 - inducción de cáncer a través del daño del DNA, 1144
 - mutágenos, 1145
 - químicos, 1144, 1147f
- Carcinomas, 1115
- Caspasas
 - activación, 1012, 1098
 - amplificación de la señal apoptótica, 1009
 - definición, 1009
 - iniciador activado, 1010
- Catabolismo, 54, 519
- Catalizadores
 - definición, 79
 - enzima, 77
 - velocidad de la reacción química, 43
- Catión con compuerta para acetilcolina, 143
- Cationes, 28
- CD113, 1117
- CD138, 1117
- CD4, 1084, 1099
- CD8, 1084, 1098
- Cdc14 fosfatasa, 913
- Cdc20, 911
- Cdc25 fosfatasa, 898
- Cdc42
 - movimiento celular, 813f
 - organización de la acción, 811, 811f
 - regulación coordinada, 812
- CDK G1/S, 890f
- CDK mitóticas, 897, Véase también Cinasas dependientes de ciclina (CDK)
 - activación, 896, 898
 - desfosforilación, 904f
 - formación del huso mitótico, 898
 - inactivación, 903
 - proteínas de la envoltura nuclear fosforiladas, 900f
 - regulación, 888
 - rotura de la envoltura nuclear, 898
- CED-3, 1007, 1008f
- CED-4, 1007
- CED-9, 1007
- Células, 750
 - 3T3, 1118, 1118f
 - - inmortales, 1118
 - - ácidos grasos, 465
 - - adhesión, rotura, 809
 - - agregación en tejidos, 925
 - - alteración de las funciones, 430
 - - ancestral, 2f
 - - aneuploides, 400
 - - animales, 424
 - - aporte de energía, 521
 - - bacterianas, 10
 - - bastones, 694, 694f, 698, 698f
 - - características comunes, 4
 - - complejo mayor de histocompatibilidad, 1061
 - - cotransportadores ligados a Na⁺, 502
 - - dendríticas, 1063
 - - desensibilización, 684
 - - en detención reversible, 882
 - - diferenciadas, 986
 - - división, 859
 - - epiteliales
 - - - apicales, 401
 - - - basales, 401
 - - - citoesqueletos, 774f
 - - - definición, 926
 - - - función, 773
 - - - lámina basal, 401
 - - - laterales, 401
 - - - polaridad celular, 1001, 1002f
 - - - superficies apicales, 933
 - - - superficies basales, 933
 - - - superficies laterales, 933
 - - - tipos, 934f
 - - estructura, 403
 - - excitables, 1021
 - - fusión para obtener hibridomas, 403f
 - - gliales, 1019, 1023, 1033
 - - - definición, 1019, 1023
 - - - funciones, 1023
 - - - producción de la vaina de mielina, 1033
 - - - tipos, 1033, 1034f
 - - haploides, 315
 - - HeLa, 384
 - - híbridas, 402
 - - hijas, 873, 905
 - - - citocinas en la creación, 977
 - - - citocinesis, 905
 - - - división celular asimétrica, 977
 - - - no disyunción, 912
 - - ingreso de Na⁺, 502
 - - inmóviles, 961
 - - interfase, 823
 - - localización para la determinación del destino del embrión, 981f
 - - madre, 315
 - - - cáncer, 1116
 - - - definición, 977
 - - - hematopoyéticas, 327, 993
 - - - - análisis funcional, 995f
 - - - - detección y cuantificación, 994
 - - - - formación de las células de la sangre, 993, 994f
 - - - indiferenciadas, 986
 - - - intestinales, 988, 989f, 990f, 991f
 - - - - células en la base de las criptas, 990f
 - - - - expresión de Lgr5, 990f, 991f
 - - - generación de células epiteliales, 988
 - - - ilustración, 989f
 - - - regeneración, 989f

- línea germinal, 987
- meristemas, 995, 996f
- mesenquimáticas, 767
- métodos para la inducción de la división, 1004f
- nerviosas, 991, 991f
- formación de las células nerviosas y gliales, 991
- infección por retrovirus, 992f
- nicho, 992
- nichos, 986
- de soporte, 986
- organismos multicelulares, 986
- patrones de diferenciación, 986, 987f
- pluripotenciales inducidas, 978
- masa celular interna, 978
- mastocito, 1066
- matriz extracelular, Véase *Matriz extracelular*
- MDCK, 652, 936
- memoria, 1100
- mesófila, 570
- micelas lipídicas, 455, 455f
- mieloma, 403
- moléculas en investigación biológica, 431c
- móviles, 961
- nacimiento, 978f
- nerviosas, 1019
- conducción del potencial de acción, 1028, -
- generación del potencial de acción, 1045
- organización y movimiento, 773, 804f
- orgánulos, 424
- oxínticas, Véase *Células parietales*
- parietales, 509, 510f
- acidificación del estómago, 509, 510f
- definición, 509
- del pedículo embrionario, Véase también *Células madre*
- control pluripotencial, 983, 983f
- cultivo, 982f
- definición, 978
- desarrollo metazoario temprano, 979
- masa celular interna como fuente, 981
- tipos de células diferenciadas, 982f
- plasma, 424, 1078
- plasmáticas, 1079
- polarizadas, 978
- presentadoras de antígenos, 1063, 1104
- procarióticas, 12f
- progenitoras, 986
- proliferativas, 1116
- recombinantes, 480
- rotura, 427
- sanguíneas, 728, 728f, 926, 993, 994f
- células madre hematopoyéticas, 993
- citocinas, 728
- formación, 728f
- de Schwann, 1023, 1033
- señales, 673
- sensibilidad, 684
- sistema inmunitario, 1102
- solución hipertónica, 481
- solución hipotónica, 481
- somáticas, 235, 978, 984
- generación celular de IPS, 984
- tipos, 978
- transposición dentro, 235
- trasplante nuclear, 985f
- tamaño crítico, 892, 908
- tinción fluorescente, 408
- tipos, separación por citometría de flujo, 400
- transformadas, 204, 400
- tumorales, 1113
- análisis de micromatrices de DNA, 1123, 1124f
- análisis sistemático, 1119
- aparición, 1121
- células normales comparadas con, 1122
- circulantes, 1116
- expresión de telomerasa en la inmortalización, 1148
- metastásicas, invasoras, 1115
- producción de energía, 1123f
- producción de telomerasa, 1149
- vaina del haz, 570
- variación de la densidad, 930f
- vegetales, 425f
- Celulosa, 39
- Centimorgan (cM), 181
- Centrifugación
- diferencial, 93, 427, 428f
- gradiente de densidad, 93, 108f
- en equilibrio, 427, 428f
- purificación de proteínas, 93, 94f
- separación de los orgánulos, 427
- Centro reactivo, 555, 563
- definición, 555
- PSII, 561
- Centrómeros
- complejidad, 271
- definición, 852, 876
- variación de longitud, 271
- Centros organizadores de los microtúbulos
- centrosomas, 825, 826f
- crecimiento microtubular, 830f
- definición, 824
- ensamblado microtubular, 825, 825f
- Centrosomas
- centriolos, 824
- definición, 876
- duplicación, 849
- estructura, 825f
- material pericentriolar, 825
- Cepas celulares, 399
- CFTR, 206c
- Chaperonas
- chaperoninas, 73, 75
- cochaperonas, 75
- definición, 72
- familia Hsc70, 584
- ilustración del plegamiento de las proteínas, 74f
- importancia, 72
- moleculares, 73
- plegamiento y ensamblado de proteínas, 598
- unión al ATP, 72
- Chaperoninas
- definición, 73
- GroEL/GroES, 75
- plegamiento de las proteínas, 605
- ilustración, 75
- Charcot-Marie-Tooth, enfermedad de, 1035
- Chironomous tentans, 367
- Chlamydomonas, 773
- Cianobacterias, Véase Bacterias
- Ciclinas
- descubrimiento, 923
- destrucción, 924f
- determinación de la actividad CDK, 885
- fase S, 884
- función en el ciclo celular, 884c
- G1, 884
- G1/S, 884
- inhibidores de CDK en el control de la actividad, 888
- mitóticas, 884, 886f
- regulación de la actividad, 887c
- replicación por degradación de proteínas, 887
- tipo D, 1139
- Ciclo del ácido cítrico, 524
- definición, 527
- ilustración, 528f
- vía glucolítica, 529c
- Ciclo celular, 873
- anafase, 875
- análisis genético, 877, 878f
- cinasas dependientes de ciclina, 875
- compromiso, 890
- definición, 15, 873
- fase G1, 15, 874
- fase G2, 15, 874
- fase M, 14, 874
- fase S, 14, 874
- generalidades, 875
- ilustración, 15f, 874f
- ingreso, 833, 898
- señales extracelulares, 892
- interfase, 876
- mecanismos de vigilancia de la regulación, 906
- meiosis, 913
- metafase, 875
- organismos modelo y métodos de estudio, 877
- procesos, 906f
- profase, 875
- proteínas, 16
- puntos de control, 1123
- regulación, 881
- regulación de la transición, 883, 883f
- respuesta de daño del DNA, 905, 909f, 910f
- telofase, 876
- Ciclo Q, 537, 537f
- Ciclo de la transferrina, 660f
- Ciclo vital
- animales, 164f
- bacterias, 163f
- definición, 162
- estadios, 162
- virus DNA, 161
- virus envueltos, 164
- Cilios
- definición, 844
- dineína axonémica, 845, 846f
- motores basados en microtúbulos, 844
- organización estructural, 844f
- orgánulos sensoriales en las células en interfase, 847, 848f
- par de microtúbulos largos, 844
- primarios, 847, 848f
- defectos, 847
- definición, 847

Cilios (*Cont.*)

- - orgánulos sensoriales sobre las células en interfase, 847, 848f
- transporte intraflagelar, 846, 847f

Cinasa(s)

- activadoras de CDK, 888
- asociadas a la pared, 970
- dependientes de ciclina (CDK), 149
- - alelos, 889
- - ciclo celular, 875
- - determinación de la actividad de la ciclina, 885
- - fase G1/S, 883
- - funciones, 889
- - G1, 883

- - regulación de la actividad, 883, 887c

- Jun N-terminales, 744

- del receptor β -adrenérgico (BARK), 706, 757

Cinesinas, 852

- 1
- cabezas, 838f
- - ciclo de movimiento del ATP, 837
- - estructura, 835f
- - modelo de transporte de las vesículas, 836f
- - movimiento de vesículas, 833
- - transporte anterógrado, 833
- separación a los polos, 857
- superfamilia, 836, 836f
- transporte de orgánulos, 841

Cinetocoros

- adhesión de los microtúbulos, 855
- biorientados, 918
- coorientados, 918
- definición, 273, 850, 876, 899
- estructura, 853f
- levaduras, 853
- microtúbulos, 850

Cinturón adherente, 776

Cisteína, 35, 35f

Cisternas, 425, 426f

Citocinas

- definición, 375, 993
- desarrollo celular, 728
- estructura general y activación, 729
- formación de las células de la sangre, 728, 728f
- producción de células T, 1100
- receptores, 722
- unión al receptor, 728

Citocinesis, 875, Véase también Mitosis

- creación de células hijas, 905
- definición, 776, 851, 876, 905
- división, 859

- ilustración, 851f

Citocromo c oxidasa, 539

Citocromos, 534

Citoesqueleto

- cambios inducidos por la señal, 812f
- componentes de las biomembranas, 775f
- definición, 14, 774
- filamentos de actina, 779
- filamentos intermedios, 775
- generalidades, 774f
- importancia, 775
- microfilamentos, 775
- microtúbulos, 774
- proteínas de la membrana plasmática, 443
- regulación por señalización celular, 776f

Citometría de flujo, análisis del DNA, 882f

Citoplasma

- definición, 14
- endosoma, 424
- membrana plasmática, 424

Citoqueratinas, 862

Citosol

- conexión en las plantas superiores, 969, 970f
- dirección de las proteínas a los orgánulos, 602c
- proteínas no ensambladas o mal plegadas, 600
- trayectoria hacia la membrana mitocondrial interna, 608f

Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, 1072

Clatrina

- cubiertas, estructura, 647f
- definición, 429
- vasos, 647, 648f
- vesículas, 635

Claudina, 941

Cleisininas, 265

Clones y clonación (DNA), 183

- agrupación de genes, 202
- análisis de grupos de diferenciación
- definición, 185
- experimentos con múltiples genes, 201
- identificación por hibridación de la membrana, 188

- reversión de la diferenciación, 984

- secuenciación, 195

- vectores plásmidos, 185f

Clorofilas

- definición, 552
- estructura, 553f
- triplete, 563

Cloroplastos

- estructura celular, 553f
- evolución, 427
- fotosistemas, 561, 561f
- membranas tilacoides, 553
- modelo de hipótesis endosimbionte, 246f, 546f
- moléculas de DNA, 251
- proteínas

- - estromales, 610

- - importación, 602

- señalización de las proteínas, 577, 610

- señalización de los tilacoides, 610, 611f

- síntesis, 602

- - de ATP, 544

- transcripción, 337

- transformación, 251

CO2

- fijación, 570, 570f

- metabolismo durante la fotosíntesis, 567

- síntesis de sucrosa, 567

Coactivadores, 311

Código epigenético, 261

Código genético

- alteraciones en las mitocondrias, 249
- codones para los aminoácidos, 133c
- definición, 132
- degenerado, 132
- mitocondrial, 248
- mRNA, 130
- triplete, 131
- universal, 133, 133f

Código de la histona, 259, 260

Codones

- apareamiento de bases no estándar, 133
- de iniciación, 131
- significado, 131
- de terminación, 131

Coenzimas, 83

- Q (CoQ), 535, 535f

Cofactores, 83

Cofilina, 782

Cohesinas

- definición, 896
- meiosis, 916f
- mitosis, 917f
- modelo de conexión, 897f
- regulación de la segmentación, 903, 903f
- segregación de los cromosomas, 915

Colágeno(s)

- asociado a las fibrillas, 949c, 952
- defensa del huésped, 949c, 952
- definición, 946
- fibilar, 949c, 951, 952f, 953f
- - biosíntesis, 952f
- - características, 949c
- - definición, 951
- - ensamblado, 953
- - interacciones con los colágenos no fibrosos, 953, 953f

- - matriz extracelular de los tejidos conjuntivos, 951

- - secreción, 952

- - tipos I y II, 953

- formación de láminas y anclaje, 949c, 952

- tipo IV, 946, 949, 949f

- transmembrana, 949c, 952

- triple hélice, 948, 948f

Colapso de la horquilla de replicación

- definición, 156
- reparación, 155, 156f

Colas de histona

- definición, 258, 315
- hipocetilación, 318
- lisinas, 258
- modificaciones, 258

Colchicina, 829

Colesterol, 449, 452

- mecanismos de transporte, 469, 469f
- microdominios de la membrana, 454

- síntesis de enzimas, 466

- vía biosintética, 467f

Colorantes fluorescentes, 409

Compartimento del retículo endoplasmático al aparato de Golgi, 642

Compensación de dosis, 262

Complejo(s)

- Arp2/3

- - ensamblado de actina, 788

- - ensamblado de filamentos ramificados, 785

- - nucleación de la actina, 786f

- - regulación por WASp, 786f

- de ataque de la membrana, 1062

- Augmina, 825, 858

- condensina, 902

- distrofina-glucoproteína

- - células musculares esqueléticas, 964f

- - efectos, 965

- - relación con la matriz extracelular, 23, 964

- exón-unión, 356

- del factor de transcripción E2F, 887
- H2, 1081
- de iniciación
- - 48S, 139
- - 80S, 139
- - definición, 298
- - ensamblado in vitro, 300f
- - modelo estructural, 301f
- mayor de histocompatibilidad, 1081, Véase también *Moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad*
- - complejos peptídicos de clase I, 1088
- - complejos peptídicos de clase II, 1091
- - definición, 1081
- - función, 1081
- - ilustración de la vía de clase II, 1090f
- - organización, 1082f
- - recombinación, 1081
- - restricción, 1082
- - unión al antígeno peptídico, 1084, 1086f
- Par apical, 1002
- de pasajero cromosómico (CPC)
- - durante la anafase y la telofase, 858f
- - regulación del microtúbulo y el cinetocoro, 855, 856f
- de los poros nucleares (NPC)
- - definición, 365, 615
- - modelo de pasaje del transportador, 366f
- - moléculas que ingresan o salen, 615
- - niveles de resolución, 616f
- - salida e ingreso a través de, 366
- - vista por tomografía crioelectrónica, 423f
- de preiniciación 43S, 139
- promotor de la anafase, 888
- de proteínas adaptadoras, 646
- de proteínas F0 y F1, 546
- que absorben la luz, 556
- - cianobacterias y plantas, 558f
- - definición, 555
- - eficiencia de la fotosíntesis, 557
- receptor-ligando, 657
- receptor-transferrina, 659
- de reconocimiento de exones cruzado, 357
- de reconocimiento del origen, 894
- de remodelación de la cromatina, 1129
- ribonucleoproteicos, 348
- Sec61, 583f, 584f
- Sec63, 584
- de segmentación y poliadenilación, 358c
- - definición, 359
- - pre-mRNA, 358
- de silenciamiento inducido por RNA, 372
- sinaptonémico, 915
- trithorax
- - control epigenético, 330
- de unión al capuchón nuclear, 360
- Complementación funcional
- búsqueda en genoteca, 188
- definición, 188
- Complementación genética, 227
- Complementariedad, 24f, 32
- molecular
- - definición, 33, 77
- - ilustración, 24f
- - interacciones no covalentes, 32
- - receptor y ligando, 675
- - unión a la hormona de crecimiento, 676f
- - unión a proteínas, 32
- Complemento
- definición, 1063
- vías activadoras, 1063, 1064f
- Concentración micelar crítica, 463
- Conexinas, 943
- Conformaciones
- abiertas, 73
- definición, 59
- determinación por métodos físicos, 104
- Constante de disociación
- definición, 46, 681
- medida de afinidad del receptor, 681
- Constante de equilibrio, 43
- Contracción muscular, 819
- basal, 819
- diagrama esquemático, 820f
- experimento, 819
- investigación, 820
- regulación
- - Ca²⁺, 803f, 804f
- - mecanismo dependiente de la miosina, 804
- Control génico
- bacterias, 281
- componentes, 345
- eucariótico, 288
- postraduccional, 335
- postranscripcional, 335
- - generalidades, 348f
- - mecanismos citoplasmáticos, 370
- Conversión de genes, 159
- Conversión del piruvato, 520, 526
- Cooperatividad, 88, 88f
- COPI, vesículas, 642
- COPII, vesículas, 634, 636, 636c
- andamiaje estructural, 641
- estructura tridimensional, 641f
- formación, 639
- mediación del transporte, 640
- CoQH2-citocromo c reductasa, 538
- Correpresores, 318
- Corriente citoplasmática, 807, 807f
- Corteza celular, 776
- Corteza visual, 1047
- Cotransportadores, 502
- acoplados a Na⁺, 502
- aniones, 506
- ATP/ADP, 550
- de Ca²⁺ ligado a Na⁺, 504
- cationes, 504
- Cl⁻/HCO₃⁻, 505, 506f
- definición, 476
- Na⁺/aminoácidos, 503
- - con compuerta de voltaje, 1026, 1026f, 1028f
- - estructuras secundarias, 1030f
- - inactivación transitoria, 1028f
- - modelo operativo, 1026f
- - período refractario, 1029
- Na⁺/una glucosa, 503, 503f
- de protón/sucrosa, 507
- regulación del pH citosólico, 505
- tres Na⁺/un Ca²⁺, 504, 505f
- unitransportadores, 502
- Cremalleras de leucina, 66
- proteínas, 310
- Crestas, 525
- Crick, Francis, H., 7, 7f
- Criptas, 989, 990f
- Cristalografía de rayos X, 104, 104f
- Cromátida(s)
- biorientadas, 915
- coorientadas, 915
- cromosomas en metafase, 266
- entrecruzamiento, 915
- hermanas
- - definición, 875
- - progresión en estadios, 876
- - unión a la cohesina, 850
- de la mitad de profase, 265
- Cromatina
- condensación y control de la función, 258
- conservación de la estructura, 258
- definición, 224, 256
- descondensación, 319f
- estructura de la fibra de 30 nm, 258, 259f
- forma condensada, 256, 256f
- forma extendida, 256, 256f
- hiperacetilada, 259
- hipoacetilada, 259
- inmunoprecipitación, 297, 297f
- en interfase, 265
- - factores de transcripción, 265
- regiones del cromosoma, 256
- unidad estructural, 315
- Cromatografía
- por afinidad, 98, 99f
- - con el DNA específica de la secuencia, 305
- - definición, 96
- - espectroscopia de masa en serie (LC-MS/MS), 105, 108f, 109, 109f
- de inunoafinidad, 97
- de intercambio iónico, 97, 98f
- líquida
- - filtración en gel, 97, 98f
- - inunoafinidad, 97
- - intercambio de iones, 97, 98f
- - separación de proteínas, 96
- - técnicas, 97f
- Cromodominio, 261, 330
- Cromosomas
- amplificación, 270
- captura y orientación durante la prometafase, 852, 854f
- ciclo celular, 874f
- condensación, 900
- definición, 15, 225, 876
- DNA celular, 14
- duplicación, 228
- - alineación por motores y la dinámica de los microtúbulos, 855
- eucarióticos, 256
- - elementos funcionales, 266
- - morfología, 266
- - organización estructural, 256
- haplotipos, 209, 209f
- homólogos, 915
- en interfase, 263f, 264, 269
- - amplificación del DNA, 269
- - territorios, 264, 264f
- en leucemia linfoblástica crónica, 1143
- en metafase, 265
- - cariotipo, 267
- - condensación, 265
- - cromátides, 267

Cromosomas (Cont.)

- estructura, 265
- ilustración, 265f
- patrones de bandeo, 267
- mitosis, 14f
- movimiento hacia los polos, 855, 857f
- primates, evolución, 268f
- recombinante, 159
- relación entre los mapas genéticos y los físicos, 210
- territorios, 264
- traslocaciones, 267f
- unión al huso mitótico, 900f
- unión anfitélica, 901
- unión estable, 901f
- unión inestable, 901f
- unión merotética, 901
- unión monotética, 901
- unión sintética, 901
- X, 261, 331
- inactivación, 262
- mamíferos, 332, 332f

Cuerpo(s)

- basal, 844
- de Cajal, 391
- densos, 863
- embrioides, 982
- nucleares
- de Cajal, 391
- definición, 391
- leucemia promielocítica, 391
- primeros observados, 392
- P
- definición, 373
- sitios de represión de la traducción, 377

Cultivos celulares

- células MDCK, 401, 402f, 453
- cepas celulares, 399
- colonia, 399
- en crecimiento, 397
- en dos dimensiones, 402
- estadios, 400f
- fibroblastos, 400
- híbridos, 402
- líneas celulares, 400
- medio de selección, 403
- medios, 398
- primarios, 399
- regulación del ciclo celular, 881
- solución amortiguada de sal, 464
- transformación, 400
- transformación en células tumorales, 1118
- tridimensional, 401

D

Daltons, 62

Darwin, Charles, 4

Dedo de cinc

- definición, 309
- estructuras secundarias, 65
- proteínas, 308
- tipos de estructura, 308

Defensinas, 1066

Deficiencia de la adhesión leucocitaria, 967

Degradación lisosómica, 661

- mecanismo de señalización del descenso regulado, 732
- transporte de proteínas a la membrana plasmática, 732

Dendritas, 1010, 1020

Densidad del mapa electrónico, 104

Densidad postsináptica, 1037

Desacetilación de la histona, 318

Desaminación, 152

Desaminasa inducida por la activación, 1077, 1080

Descenso regulado

- por GPCR/cAMP, 705
- mecanismos, 731
- represión por retroalimentación, 706

Desensibilización

- células, 683
- GPCR, 705f
- heteróloga, 706

Desequilibrio en el ligamiento, 209, 209f

Desequilibrio T-G, reparación, 154, 155f

Desmina, 862

Desmosomas, 935, 938f

Desnaturalización

- definición, 72, 121

Desnaturalizantes, 72

Desorción/ionización láser asistida en la matriz (MALDI), 102, 102f

Desoxirribonucleótidos (dNTP), 197

Desoxirribonucleótidos trifosfato con marcación fluorescente, 196

Despolarización

- definición, 695, 1021
- hélice S4 sensora de voltaje en respuesta a, 1030

- membrana, 1044

- membrana plasmática, 1025f

- neurona, 1020

Despurinación del DNA, 153

Detergentes, 463

- concentración micelar crítica, 463

- definición, 462

- eliminación de las proteínas, 462

- estructuras, 463f

- iónicos, 463

- no iónicos, 463, 464f

Deuterostomas, 19

Diabetes insípida, 483

Diabetes mellitus, 766

1,2-diacylglicerol (DAG), 708

- activación de la proteína cinasa C, 708

- síntesis de segundos mensajeros, 709f

- vía IP₃, 771f

Dictyostelium, 813

Difusión

- definición, 474

- transporte en la membrana, 473

- velocidad, 475

Dímeros de tubulina $\alpha\beta$, 822, 824f

Dinactina, 839

Dinamina

- definición, 647

- hidrólisis del GTP, 648f

Dineína

- cooperación con cinesina, 841

- estructura del dominio, 839f

- orientación en la mitosis, 851

- regulación, 840, 841f
- separación en los polos, 857
- transporte hacia el extremo (ú) de los microtúbulos, 837

Diploides

- crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, 16f
- mutaciones letales recesivas, 176

Dipolos

- definición, 270
- molécula de agua, 28f
- momento, 26
- transitorios, 29

Disacáridos, 39, 39f

Distribuidor de células activado por fluorescencia

- procedimiento, 400f, 401

Distrofia miotónica tipo I, 232

Distrofias musculares

- conexiones con la matriz extracelular y el citoesqueleto, 964

- definición, 793

- de Emery-Dreifus, 863

Distrofinas, 793, 964, 965

Distroglucano, 964

Diversidad combinatoria, 939

División celular

- asimétrica, 15, 905, 977, 997, 1003, 1005f

- características generales, 997f

- células hijas, 977

- definición, 16

- mecanismo, 997

- neuroblastos, 1005f

- proteínas Par, 997, 1000f, 1004

- compromiso irreversible, 890

- control, 873

- *Drosophila melanogaster*, 16

- *Escherichia coli*

- huevos fertilizados, 19f

- meiosis, 913

- mutaciones, 1139

- patrones durante el ciclo vital, 881f

- polarización celular, 998

- replicación de los cromosomas, 873

- *Saccharomyces cerevisiae*, 176

- segregación de las células hijas, 874

- simétrica, 977

- vías de los puntos de control, 874

DNA (ácido desoxirribonucleico), 36

- aislamiento directo, 193

- alfoide, 273

- amplificación, 1125

- análisis por citometría de flujo, 882f

- B, 118, 118f, 119

- bases, 7

- bicatenario, 7, 119

- circular, 121

- clonación, Véase *Clones y clonación (DNA)*

- cloroplasto, 251

- composición génica, 2

- conversión de la información codificante, 10f

- daño por carcinógenos, 1144

- definición, 115

- despurinación, 153

- elementos móviles, 223, 234

- espaciador no clasificado, 233

- estrés de torsión, 121

- expresión de shRNA, 433f

- forma A, 118, 118f
 - forma B, 118, 118f
 - hijo, 146
 - interacción con proteínas, 120
 - ligasas, 183
 - longitud, 224
 - micromatrices, Véase *Micromatrices (DNA)*
 - mitocondrial, Véase *mtDNA*
 - molde, 124
 - molécula, 8f
 - no codificante, 229
 - - genomas, 231
 - - organización cromosómica, 231
 - orgánulo, 245
 - paterno, 156
 - pérdida del sistema de reparación, 1146
 - punto de control del daño, 1141
 - recombinante
 - - definición, 182
 - - molécula de DNA paterno, 160
 - - replicación, 183
 - - tecnología, 182
 - repeticiones dispersas, 232
 - repetido, 224
 - retroviral, 238f
 - secuencia simple, 231, 232f
 - separación reversible del haz, 121
 - sitios de unión al represor, 307
 - SV40, 147, 147f, 148f
 - transposones, Véase *Transposones*
 - vector, 182
 - cDNA (DNA complementario)
 - bibliotecas, 185, 186f
 - bicatenario, 187
 - búsqueda en la biblioteca, 189f
 - transcripción reversa, 187
 - mtDNA (DNA mitocondrial)
 - *Amoebidium*, 248
 - *Arabidopsis thaliana*, 247
 - cantidad total en las células, 246
 - capacidad de codificación, 246
 - detección, 245
 - *Drosophila melanogaster*, 251
 - herencia citoplasmática, 246
 - mutaciones, 250
 - *Plasmodium*, 247
 - proteínas codificadas, 247
 - ratones, 250f
 - *Reclinomonas americana*, 249
 - replicación, 245
 - tamaño, 245
 - *Tetrahymena*, 248
 - DNA polimerasas
 - corrección de prueba, 152, 153f
 - errores de copiado, 151
 - replicación del DNA, 146
 - uso del mecanismo de reparación del DNA, 1146
 - Doble hélice
 - cadenas antiparalelas complementarias, 119
 - definición, 8
 - ilustración, 7f, 119f
 - Dogma central, 116
 - Dominio(s), 67f
 - de activación
 - - ácidos, 311
 - - definición, 308
 - descondensación de la cromatina en respuesta a, 320f
 - - interacciones mediadoras, 320
 - - puente molecular entre, 320
 - - regulación de la transcripción, 311
 - carboxilo terminal, 293
 - combinación de estructuras secundarias, 65
 - cremalleras de leucina, 66
 - de cromosombra, 261
 - dedo de cinc, 66
 - de destrucción, 888
 - I, 938
 - PDZ, 491
 - proteicos
 - - definición, 67
 - - EGF, 68
 - - estructurales, 67
 - - funcionales, 67
 - - módulos de estructura terciaria, 67, 67f
 - - naturaleza modular, 68f
 - - topológicos, 67
 - de las proteínas funcionales, 67
 - PTB, 730
 - de reconocimiento del RNA, 350
 - de represión
 - - definición, 309
 - - regulación de la transcripción, 311
 - secuencia, 66
 - sensor de los esteroides, 468, 763
 - SH2
 - - definición, 730
 - - modelo superficial, 730f
 - - unión, 730
 - SH3, 738, 738f
 - de unión al DNA, 306
 - - clasificación, 308
 - - cooperativos, 313, 313f
 - - ilustración, 310f
 - - proteínas de la cremallera de leucina, 310
 - - proteínas del dedo de cinc, 309
 - - proteínas de homeodominio, 309
 - de unión al RNA
 - - conservados, 349
 - - proteínas hnRNP, 349
 - de unión a la poli-K63 ubiquitina, 759
 - de unión a la ubiquitina, 92
 - Drosophila melanogaster*
 - activación Ras, 736f
 - bandedo, 270f
 - células madre de la línea germinal, 987, 987f
 - cromosomas politénicos, 360
 - desarrollo muscular y nervioso, 19
 - diferenciación sexual, 226
 - división celular, 14
 - división celular asimétrica, 1003
 - elementos móviles, 236
 - empalme regulado, 361, 361f
 - estudio del ciclo celular, 877
 - falta de dinamina, 1042
 - genes codificadores de proteínas, 255
 - interacción entre el desarrollo y el ciclo celular, 880, 881f
 - mtDNA, 250
 - mutaciones espontáneas, 243
 - mutaciones recesivas, 176
 - neuronas retinianas, 365
 - ojo compuesto, 736f
 - organismo experimental, 12f
 - politización, 270
 - proteína Toll, 1102
 - proteínas de transducción de la señal, 735
 - regla de una neurona y un receptor, 1052
 - vía Hedgehog, 753
 - Duchenne, distrofia muscular de, 22, 207
 - Duplicación segmentaria, 229
- ## E
- Edición del RNA
 - premRNA, 365
 - - apo B, 364, 364f
 - Efecto hidrofóbico, 32
 - definición, 32
 - esquemático, 32f
 - Efectos alostéricos, 88
 - Electroforesis en gel
 - autorradiografía, 102
 - bidimensional, 95, 95f
 - definición, 95
 - poliacrilamida, 94
 - SDS-poliacrilamida, 95, 96f
 - Electroinmunotransferencia, 199, 200f
 - Electrones
 - enlaces, 29
 - enlaces covalentes, 25
 - no unidos, 30
 - Elemento(s)
 - activadores, 236
 - de disociación, 236
 - dispersos cortos
 - - definición, 241
 - - mutaciones acumuladas, 243
 - - ocurrencia, 243
 - - variación de la longitud, 242
 - dispersos largos
 - - definición, 241
 - - estructura, 241f
 - - secuencias lindantes no relacionadas, 245
 - - transcripción inversa, 241f
 - - truncado, 241
 - de DNA transponibles, 233
 - - clases, 235f
 - - definición, 234
 - - *Drosophila melanogaster*, 238
 - - influencia en la evolución, 243
 - - movimiento, 235
 - - recombinación homóloga, 243
 - - de poliadenilación citoplasmático (CPE), 375
 - promotor corriente abajo, 301
 - promotores proximales, 302
 - regulatorios de los esteroides, 763
 - de respuesta
 - - al cAMP, 703
 - - definición, 324
 - - respuesta nuclear, 325, 326f
 - - a la serina (SER), 741
 - de la secuencia de inserción
 - - definición, 236
 - - estructura, 236f
 - - modelo, 237f
 - semejantes a retrovirus, 238
 - de transporte constitutivo, 369
 - elF2 cinasas, 378

- Elongación
 - de la cadena por la RNA polimerasa II, 356
 - definición, 279
 - transcripción, 279, 285
- Embrión
 - divisiones de segmentación, 979, 981f
 - la localización celular determina el destino, 981f
- Emerson, efecto, 561
- Empalme, Véase también *Empalme del RNA*
 - alternativo, 129, 129f
 - definición, 362
 - exones, 362
 - fibroblastos, 226
 - generación del transcrito, 361
 - hepatocitos, 226
 - percepción de los sonidos, 363f
 - pre-mRNA (mRNA precursor), 255
 - auto-empalme, 93, 124, 358
 - represores, 361
 - del RNA, 350
 - activadores, 362
 - definición, 352
 - empalmosomas, 354
 - proceso, 355f
 - regulación, 360, 360f
 - represores, 361
 - sitios de empalme, 351, 351f
 - snRNA, 352, 355f
- Empalmosomas
 - empalme, 352
 - modelo de empalme, 355f
 - pre-mRNA, 366
- Endocitosis, 424, 628
 - ensamblado dependiente de Arp2/3, 788f
 - función de los microfilamentos, 788
 - mediada por receptor, 425, 654, 731, 1089
 - definición, 655, 731
 - estadios iniciales, 655
 - internalización del antígeno, 1089
 - reciclado, 808
- Endodermo pancreático, 984
- Endosimbiontes, 245
- Endosomas
 - multivesiculares, 661
 - definición, 661
 - modelo de formación, 662
 - segregación de las proteínas de membrana, 661
 - pH ácido, 658
 - rugoso, 425
 - tardío, 628
- Energética bioquímica, 48f
- Energética celular, 517
 - ciclo del ácido cítrico, 524
 - fotosíntesis, 517, 518f
 - glucólisis, 518
 - oxidación aerobia, 517, 518f
 - transporte de electrones, 531
- Energía
 - acoplamiento, 52
 - de activación, 51, 51f
 - definición, 52
 - efecto enzimático, 78, 78f
 - estado de transición, 51
 - reacciones químicas, 51f
 - calorías, 49
 - cinética, 48
 - eléctrica, 48
 - gradiente de concentración, 49
 - libre, 49
 - cambio estándar, 49
 - cambios, 49f
 - definición, 50
 - perfiles de reacción, 81f
 - reacciones químicas, 49
 - mecánica, 49
 - potencial, 48
 - definición, 48
 - gradiente de concentración, 49
 - potencial eléctrico, 49
 - química, 48
 - radiante, 49
 - térmica, 48
 - transformación, 48
- Enfermedad(es)
 - de células I, 648
 - por depósito en los lisosomas, 649
 - desmielinizante, 1034
 - humanas
 - análisis de la localización genética, 210
 - comunes, 207c
 - hereditarias debido a defectos genéticos, 210
 - patrones de herencia, 206, 208f
 - poligénicas, 211
 - monogénicas, patrones de herencia, 206
 - poligénicas, 211
 - renal poliquística autosómica dominante, 848
- Enfoque isoelectrónico, 96
- Enlaces
 - de alta energía, 52
 - covalentes, 23
 - definición, 24
 - disulfuro, 35
 - energías relativas, 28f
 - formación, 25f
 - fuerza y estabilidad, 29
 - geometría, 25, 25f
 - número, 24
 - polares, 26
 - disulfuro, 64
 - energéticos, 25f
 - fosfoanuros, 53
 - fosfodiéster, 33, 118
 - glucosídicos, 33, 39
 - hidrógeno, 27
 - agua, 28f
 - definición, 28
 - interacciones no covalentes, 27
 - resistencia, 30
 - no covalente
 - calcio y GTP, 88
 - regulación de las proteínas, 87
 - peptídicos, 33
 - definición, 61
 - hidrólisis mediada por serina proteasa, 82f
 - planares, 71
 - segmentación, 92
 - síntesis, 141
 - unión con los aminoácidos, 33
 - polares, 26
 - propiedades, 26c
 - proteicos, 33f
 - químicos, 25f
- Ensayos, 305
 - de competencia, 682
 - del filamento deslizante, 795, 795f
 - de monocapas de células de heridas, 813f
 - de movilidad electroforética, 305, 305f
 - de movilización en gel, 306
 - de transporte libre de células, 633, 633f
 - de unión, 681, 681f
- Entalpía, 50
- Entropía, 50
- Envoltura nuclear
 - definición, 615
 - poros, 615
 - reensamblado durante la telofase, 905f
 - transporte del mRNA, 364
 - transporte a través de poros nucleares, 365
- Enzimas
 - actividad de corrección de prueba, 136
 - bolsillo de unión específico para la cadena lateral, 81
 - catalizadores, 52, 78, 84
 - del citocromo P-450, 1145
 - cofactores, 83
 - complejos multienzimáticos, 84f
 - definición, 7, 78
 - dependencia del pH, 83f
 - detección de proteínas, 97
 - efecto sobre la energía de activación, 78f
 - estado de transición, 78
 - inhibidores, 83
 - lisosómicas, 648
 - comparación bioquímica, 649
 - M6P, 648, 649f
 - transporte, 650f
 - modelo esquemático de reacción, 80f
 - modificadoras, 184
 - número de recambio, 80
 - proteasas, 67
 - resistencia del DNA a la torsión, 122
 - restricción, 183, 184c
 - sitio activo, 79, 79f
 - sustratos, 78f
 - vía común, 84
- Epidermolisis ampollar simple, 864
- Epimerasas, 38
- Epitelio, 401
- Epítomos, 77
- Equilibrio químico
 - constante, 43
 - definición, 43
 - ilustración, 25f
 - mezcla, 51
- Eritropoyetina (Epo), 729f
 - definición, 728
 - estructura, 729f
 - formación de los eritrocitos, 728f
 - función, 992
- Escherichia coli
 - corrección de prueba, 152, 153f
 - crecimiento, 13
 - división celular, 14
 - factores σ , 249c
 - G-CSF, 201
 - metabolismo de la glucosa y la lactosa, 282
 - operón *Trp*, 286, 288f
 - organismo experimental, 12
 - pared celular interna, 11

- polimerasa del RNA del núcleo, 293
 - proteína de unión al DNA, 306
 - ribosoma 70S, 142
 - segmentación del DNA, 184f
 - sistemas de expresión, 201
 - vectores plásmidos, 184
 - Esfingolípidos
 - definición, 451
 - microdominios de membrana, 454
 - síntesis sobre la membrana del retículo endoplasmático, 466, 466f
 - Espacio intermembranoso, 524
 - proteínas, 608, 608f
 - Especies reactivas del oxígeno
 - definición, 541
 - derivados del transporte de electrones, 541
 - generación e inactivación, 542f
 - Especificidad
 - anticuerpos, 77
 - degradación, 86
 - efectora, 677
 - reacción química, 32
 - unión a proteínas, 76
 - Espectrina, 790
 - Espectrometría de masas
 - de captura iónica, 102, 102f
 - definición, 101
 - determinación de la secuencia y la masa proteica, 101
 - MALDI-TOF, 102, 102f
 - sensibilidad, 105
 - en serie, 103
 - Espectroscopia por resonancia magnética (RM), 105
 - Espermatozoide
 - desarrollo del organismo, 977
 - producción de células de la línea germinal, 987
 - Estado estable, 45
 - Estado nativo, 71
 - Estado de transición
 - definición, 51
 - energía de activación, 51
 - enzimas, 77
 - intermediario, 51
 - Estatinas, 468
 - Etereoisómeros
 - actividades, 25
 - definición, 25
 - ilustración, 26f
 - Esterificación, 40
 - Esteroides, 449
 - Estimulación autocrina, 1132
 - Estructura anfipática, 67
 - Estructura cuaternaria, 67f
 - Estructura enrollada, 311
 - Estructura primaria, 60, 104
 - Estructura terciaria
 - definición, 64
 - dominios como módulos, 67, 67f
 - ilustración, 67f
 - RNA, 122f
 - Estructuras celulares basadas en actina
 - organización, 790
 - proteínas adaptadoras, 791
 - proteínas con enlaces covalentes, 790, 791f
 - Estructuras secundarias, Véase también Proteínas, estructura
 - alfa (α)-hélice, 62, 62f
 - definición, 62
 - dominios estructurales, 66
 - giro beta (β), 62, 62f
 - lámina beta (β), 63, 64f
 - RNA, 122, 122f
 - Estudio de asociación genómica amplia, 212
 - Eucarióticos
 - ciclo celular, 14
 - comparación de la densidad de los genes, 229f
 - control génico, 288
 - definición, 11, 14
 - elongación de la cadena peptídica, 141f
 - genes, 224
 - genomas, 224
 - inactivación de la función de los genes, 212
 - intrones, 127
 - membrana plasmática, 443
 - mRNA, 224
 - organización de los genes, 126, 126f
 - orgánulos, 13
 - receptores de la superficie celular, 675
 - ribosomas, 136f
 - unicelulares, 15
 - vías de degradación de las proteínas, 85
 - Eucromatina
 - definición, 260
 - heterocromatina, 260f
 - localización de los genes transcritos, 316
 - Evaluación genética, 176
 - Evolución
 - biología, 1
 - cloroplastos, 426
 - cromosomas de primates, 269f
 - línea de tiempo, 4c
 - mitocondrias, 250, 427
 - presiones selectivas, 232
 - Exclusión alélica, 1078
 - Exones
 - definición, 127, 225
 - duplicación, 226f
 - empalme alternativo, 362
 - empalme del RNA, 350
 - fibronectina, 226
 - longitud promedio, 356
 - reconocimiento a través de unión cooperativa, 357f
 - Exosomas, 359
 - Experimentos de crianza, 174
 - Exportación nuclear
 - dependiente de Ran, 620, 620f
 - independiente de Ran, 619, 620f
 - mRNA, 619
 - Expresión constitutiva, 307
 - Expresión génica
 - bacterias, 281
 - control de la transcripción, 279
 - fragmentos de DNA clonado, 197
 - heterocromatina, 315
 - micromatrices, 199
 - pasos, 279
 - regulación, Véase *Control génico*
 - Expresión retroviral, 203
 - Extravasación, 965, 1101
 - Ezrina-radixina-meosina, 793
- ## F
- Factor(es)
 - de activación de las plaquetas (PAF), 966
 - antiterminación
 - definición, 302
 - modelo complejo, 303f
 - del complejo ternario, 741
 - de crecimiento
 - derivado de plaquetas (PDGF), 735, 810
 - del endotelio vascular (VEGF), 1117
 - epidérmico (EGF), 676, 725f, 726f, 810
 - activación del receptor, 726f
 - dominio, 68
 - HER1, 725f
 - heterooligómeros, 726
 - homooligómeros, 726
 - síntesis, 676
 - epitelial, 684
 - de fibroblastos, 725f
 - de fibroblastos (FGF), 725f
 - receptores, 1132
 - regulación del desarrollo en animales, 675
 - de diseminación, 813
 - de elongación
 - negativos, 301
 - regulación de la transcripción, 301
 - traducción, 140
 - de especificidad para la segmentación y la poliadenilación, 374
 - estimulador de la segmentación (CStF), 358
 - estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF), 201
 - de exportación nuclear I (NXF1), 619
 - F, 184f
 - de intercambio del nucleótido guanina (GEF), 216, 217f, 378, 636, 679, 690, 735
 - de liberación, 142
 - de necrosis tumoral (TNF), 1104
 - de necrosis tumoral alfa (TNF α), 757, 1015
 - R, 244
 - de remodelación de la cromatina, 319
 - de respuesta sérica, 741
 - de segmentación I, 359
 - de segmentación II, 359
 - σ , 282, 284c
 - de transcripción
 - actividad de helicasa, 299
 - bromodominios, 261
 - componente, 759
 - cromatina en interfase, 265
 - definición, 10, 116, 305
 - E2F
 - definición, 891
 - metazoarios, 891
 - específicos, 305
 - fenotipos de las mutaciones, 280f
 - generales, 296
 - heterodiméricos, 313
 - interacciones, 311
 - modificaciones, 675
 - nucleares, 1136
 - posición de la RNA polimerasa II en los sitios de iniciación, 297
 - regulación de la actividad, 323
 - RNA polimerasa II, 294
 - señales de localización nuclear, 749
 - Smad, 748

Factor(es) (Cont.)

- STAT, 730, 732f
- TFIIA, 301
- TFIID, 298, 301
- TFII E, 293
- TFII F, 293
- TFII H, 299
- TFOOB, 301, 338
- vía NFκ-B, 757, 758f
- FAD (favina adenina dinucleótido)
 - forma reducida, 519
 - reacciones de oxidación y reducción, 54, 54f
- FADH₂, 519
 - ciclo del ácido cítrico, 527
 - oxidación, 531
- Fagocitosis, 1061
- Fagos, 160
- Familia de ATPasa AAA, 837
 - definición, 601
 - unión transitoria, 388
- Familias de genes
 - citoesqueleto, 228
 - definición, 228
 - evolución reciente, 229
- Fármacos
 - biología celular, 430
 - búsqueda sistemática, 430, 432f
 - que afectan la polimerización, 829
- Fase G₁, 15
- Fase G₂, 15
- Fase M, 14
- Fase S
 - CDK, Véase *Cinasas dependientes de ciclina (CDK)*
 - definición, 883
 - inicio de la replicación del DNA, 894
 - ciclinas, 884
 - comienzo, control, 893f
 - definición, 16
 - inhibidor, 891
 - regulación, 888, 893f
- Fenilalanina, 33, 36f
- Fenotipo
 - definición, 172
 - efectos de los alelos mutantes, 173f
 - genotipo, 172
 - mutaciones, 280f
- Fermentación
 - definición, 522
 - generación de ATP, 524
 - glucosa, 521
- Feromonas, 673
 - apareamiento inducido por, 742f
- Ferrotransferrina, 659
- Fertilización, 980, 981f
- Fibras elásticas, 859, 860f
- Fibras de estrés, 776
- Fibroblastos
 - definición, 400
 - empalme alternativo, 226
- Fibronectinas
 - definición, 131, 957
 - dímeros, 957
 - exones, 224
 - interconexión entre la célula y la matriz, 957
 - isoformas, 361
 - organización, 958f

- región de unión a la célula, 958f
- unión a la integrina, 958f
- Fibrosis quística, 642
- Fijación de membrana
 - caracterización de los canales nuevos, 501, 501f
 - definición, 500
 - medición del movimiento de iones, 499, 500f
 - registros, 501, 501f
- Filamentos
 - de actina
 - complejo Arp2/3, 784, 786f
 - con decoración de miosina, 781f
 - crecimiento, 779
 - determinación de la formación, 780f
 - dinámica, 779
 - filamentos de miosina, 801
 - longitud, 784
 - mecanismo de ensamblado, 784
 - no ramificados, forminas, 784, 785f
 - nucleación por el complejo Arp2/3, 789f
 - organización con proteínas unidas por enlaces covalentes, 790, 791f
 - polaridad, 778f
 - regulación de la formación, 782f
 - unión a proteínas adaptadoras, 791
 - velocidad de recambio, 784
 - vesículas ligadas a miosina V, 805
 - citoesqueléticos, 14, 14f, Véanse también

Filamentos intermedios; Microfilamentos;

Microtúbulos

- finos, regulación, 803
- gruesos
 - definición, 801
 - regulación, 804
- intermedios, 860
 - clases, 862f
 - defectos de la queratina, 863
 - definición, 15, 775, 821, 860
 - desmina, 862
 - dinámica, 863
 - ensamblado, 861, 861f
 - estructura, 861f
 - expresión tisular específica, 862
 - funciones, 822f
 - ilustración, 15f
 - localización, 860f
 - neurofilamentos, 863
 - organización celular, 864
 - propiedades, 821, 822f
 - queratinas, 862
- Filamina, 790
- Filopodios, 808
- Filtro de selectividad iónica, 497, 499f
- FISH multicolor, 267
- Flagelos
 - batido, 845
 - definición, 844
 - dineína axonémica, 845, 846f
 - motores basados en microtúbulos, 844
 - movimientos, 845f
 - organización estructural, 844f
 - pares de microtúbulos largos, 846
 - transporte intraflagelar, 846, 847f
- Flipasas
 - definición, 454
 - modelo de transporte, 493, 493f

- movimiento de los fosfolípidos, 466
- Flujo de electrones, a través de los fotosistemas vegetales, 561, 562f
- Flujo electrónico cíclico
 - definición, 564
 - independiente de Ndh, 564
 - regulación, 566f
- Fluorocromos, 409
- Forminas
 - definición, 784
 - ensamblado de filamentos no ramificados, 784
 - regulación por interacción intramolecular, 785
- Fosfatasas
 - activación, 676
 - desfosforilación, 90
 - vías de señalización, 677
- Fosfatidilinositol (IP), 708, 709f
 - 3 (IP₃)
 - acumulación del fosfato, 746
 - cinasa, 745
 - generación de fosfato, 746
 - reclutamiento y activación de PKB, 747f
 - vía de la cinasa, 745, 747
- Fosfoglicéridos, 448
 - comunes, 41c
 - definición, 41
 - grupos de la cabeza, 41c
- Fosfoinositósidos
 - definición, 745
 - señalización, 814, 814f
- Fosfolipasas
 - C
 - activación, 744
 - definición, 708
 - dominios SH₂, 745
 - generación de segundos mensajeros, 708
 - definición, 454, 692
 - especificidad, 454f
- Fosfolípidos anulares, 459f
- Fosforilación
 - activación de la transducción de proteínas, 686f
 - CDK G₁/S, 893f
 - definición, 36, 90
 - LHCI₂, 565, 565f
 - MAP cinasa, 739
 - miosina, 806f
 - no acoplada, 551
 - oxidativa, 519, 533
 - regulación de las proteínas, 89, 89f
 - rodopsina, 696
 - sustrato, 520
- Fosfotirosina
 - fosfatasas, 733
 - residuos, 729, 731f
- Fositas cubiertas, 425
- Fotofosforilación cíclica, 564
- Fotoinhibición, 563, 564f
- Fotones
 - absorción, 556
 - cantidad de energía, 555
 - definición, 555
- Fotorrespiración
 - competencia por la fijación de carbono, 569
 - definición, 569
 - excesiva, 570
 - ilustración, 570

- Fotosíntesis, 555i
- absorción de la energía luminosa, 554
- absorción de la luz, 518
- definición, 54, 517
- estadios, 553, 554f
- formación de ATP, 4
- generalidades, 518f
- herbicidas, 563
- iluminación, 553
- metabolismo del CO₂, 567
- pigmentos que absorben la luz, 552
- relación recíproca, 518
- síntesis de ATP, 554
- transporte de electrones, 554
- transporte fotoelectrónico, 557f
- velocidad, 556f
- vía del carbono, 569f
- Fotosistemas
- análisis molecular, 559
- bacterias basófilas, 559, 559f, 560f
- centro de la reacción, 554
- cianobacterias y plantas, 558f
- cloroplastos, 561, 561f
- complejos que absorben la luz, 555
- definición, 555
- flujo cíclico de electrones, 560, 560f
- flujo de electrones, 560, 561f
- movimiento de proteína acoplado, 560
- separación de cargas, 558
- Fracciones, 97, 441
- Fragmoplasto, 859
- Fuerza de los protones
- definición, 519
- generación de calor, 551
- gradiente de voltaje, 542
- intercambio ATP-ADP, 550, 550f
- proteínas mitocondriales, 606
- síntesis de ATP, 518, 544
- Función de diseminación puntual
- Función de los genes
- inactivación en los eucarióticos, 212
- pruebas analíticas, 180

- G**
- Gametos
- definición, 977
- fusión durante la fertilización, 980f
- Ganglios linfáticos, 1061
- Geles de agarosa, 191
- Geles de poliacrilamida, 191
- Geles, detección de proteínas, 99
- Gelsolina, 783
- Gemación, 163, 163f
- Genes, 211
- amplificación, 1126
- apoptóticos, 1143
- codificadores de proteínas, 2, 125, 186, 228, 254
- comparación de densidades, 229f
- copias múltiples, 229
- corregulados, 200
- de la β -globina, 226
- de respuesta retrasada, 892
- de respuesta temprana, 892
- densidad, 231
- DNA no funcional, 223
- duplicación, 3, 226f, 228
- establecimiento del cáncer, 1127c
- eucarióticos, 224
- generalidades estructurales, 225f
- haploinsuficiente, 174, 1128
- intrones, 224
- marcados, 194, 204, 204f
- no transcritos, 261
- organización, 126, 127f
- cromosómica, 231
- patrones, 19
- que codifican proteínas
- - definición, 125
- - disposición, 127
- - expresión coordinada, 127
- - familia de genes, 228
- - número en el genoma, 254
- - secuencias reguladoras, 302
- - solitarios, 228
- - transcripción, 125
- región codificante, 9
- región reguladora, 9
- regulación del desarrollo, 19
- respuesta retrasada, 892
- respuesta temprana, 741, 892
- de shock térmico, 325
- supresores tumorales, 1113, 1128
- - definición, 1113
- - funcionamiento de los genes apoptóticos, 1143
- - mutación por pérdida de la función, 1128
- Genética clásica, 171, 171f
- Genética inversa, 172, 173f
- Genomas
- definición, 15, 61
- DNA no funcional, 230
- elementos del DNA transponibles, 223
- eucarióticos, 224
- número de genes codificadores de proteínas, 254, 255f
- organización, 223
- Genómica, 252
- definición, 226
- secuencias almacenadas, 252
- Genotecas
- definición, 186
- hibridación, 188
- levadura, 188, 190f
- Genoterapia, 23
- Genotipo, 172
- Glicina, 35, 35f
- Glioblastomas, 1115
- Gliomedina, 1035
- Glucoforina, 457
- C, 791
- Glucógeno, 39
- definición, 699
- estimulación, 702
- fosforilasa, 701, 712
- inhibición, 702
- síntesis y degradación, 702f
- Glucolípidos, 449
- Glucólisis
- aporte de energía, 521
- definición, 519
- ejemplo de catalizador, 520
- liberación de energía libre, 55
- primer estadio de la oxidación de la glucosa, 520
- velocidad, 520
- Glucoproteínas, 461
- cadena de oligosacáridos ligada al N, 644f
- definición, 594
- fibras de celulosa en la matriz, 968
- oligosacáridos, 595
- Glucosa
- conversión a piruvato, 520
- depleción, 284
- fermentación, 522
- mediada por proteínas GLUT, 478f
- metabolismo, 523, 523f
- - anaerobio o aerobio, 523f
- oxidación
- - aerobia, 527f
- - ciclo del ácido cítrico, 526
- - conversión del piruvato, 526
- - estadios, 520, 526
- - glucólisis, 518
- - transferencia de electrones, 532
- transporte en las células de mamíferos, 478
- transporte facilitado, 477
- transporte transcelular, 508, 508f
- Glucosaminoglucanos (GAG), 749
- contenidos, 41
- disacáridos repetidos, 954f
- modificaciones de la cadena, 955
- rol en la matriz extracelular, 955
- secuencia del pentasacárido, 955f
- GLUT1
- captación celular de glucosa mediada por, 478f
- catalizador, 478
- definición, 478
- estados conformacionales, 478
- membrana del eritrocito, 478
- GLUT2, 480, 508
- GLUT3, 479
- GLUT4, 429, 480
- moléculas, 764
- superficie celular, 765
- traslocación, 766f
- GLUT5, 480
- Glutamato, 34, 34f
- Glutamina sintetasa, 7f, 35, 36f
- cGMP fosfodiesterasa, 695
- Golgi, aparato de
- cis, 628, 644
- definición, 425
- mediación del transporte desde el retículo endoplasmático, 640, 641f
- medial, 629, 633, 644
- microfotografía electrónica, 644f
- organización, 643
- secreción de proteínas, 670
- trans, 628, 644
- - agregación de las proteínas, 651
- - complejos de proteínas adaptadoras, 646
- - procesamiento proteolítico, 651, 652f
- transporte anterógrado, 642
- transporte retrógrado, 641
- Goodpasture, síndrome de, 950
- Gotas lipídicas, 455, 455f
- Gradientes
- de concentración, 48
- de densidad, 93

Gradientes (*Cont.*)

- eléctricos, 495, 496f
- electroquímico, 475
- iónicos
- generación y mantenimiento, 485
- procesos biológicos, 495
- osmótico, 509
- quimiotácticos, 814

Gránulos corticales, 979

Granzimas, 1099, 1100f

Grupo de alta movilidad, 267

- ancladas a la cola, 590, 592f
- asociada a la cinasa A, 704
- canal de K⁺, 363
- cremallera de leucina, 310
- cromatografía líquida, 96, 99f
- dedo de cinc, 309
- distribución, 653, 654f
- espacio intermembranoso, 609, 609f
- espectrometría de masa, 102
- estructura tridimensional, 252
- estructurales, 59
- factores de liberación, 142
- factores de transcripción, 10
- histona, 224
- hnRNA, 350
- homeodominio, 309
- homólogas, 17, 69
- integrales de membrana, 64
- interacciones, 179
- localización, 12
- macromoléculas, 5
- mantenimiento estructural del cromosoma, 264, 265f
- marcado, 203, 204f
- masa, 100
- membrana, 454
- externa, 609
- interna, 605, 609f
- mitocondriales, 602
- modelos, 7f
- modificaciones, 594
- motoras, 60, 833
- multiadhesivas de la matriz, 946
- no ensambladas, 600
- no histonas, 262
- Par, 997, 999f, 1000f, 1003
- peroxisómicas, 613
- Polycomb, 330f
- purificación, 94, 95f
- redundantes, 179
- reguladoras de la respuesta, 286
- regulatorias, 61
- represoras, 281
- rotación del grupo peptídico planar, 72
- señal, 61
- SNARE, 638
- SOCS, 733
- SR, 355
- STAT, 730, 731f
- tamaño, 94
- traducción, 10
- transporte en la membrana, 60, 424, 443
- tubulina, 253
- valores p, 252

Grupo II, 356

Grupos protésicos, 84

Grupos R, 32

Grupos sanguíneos AB0, 462c

Grupos sulfhidrilo, 35, 596

GTP (guanosintrifosfato)

- descubrimiento, 719
- enlace no covalente, 87
- estimulación de la síntesis del cAMP, 719, 720f
- hidrólisis
- dinamina, 647f
- velocidad, 678
- transducción de la señal, 719

GTPasas

- inactivación, 215
- Rab GTPasas, 638

Guillain-Barre, síndrome, 1034

Gustos

- ácido, 1049
- amargo, 1048
- dulce, 1049
- ilustración de los sentidos, 1049f
- recepción de la señal, 1048
- salado, 1050
- subgrupo de células sensoras, 1048
- unami, 1051

H

H⁺/K⁺ ATPasa, 509

Haces contráctiles, 804

Haploides

- apareamiento inducido por feromonas, 742f
- cambio en el tipo de apareamiento, 382f
- crecimiento de *Saccharomyces cerevisiae*, 16f

Haplotipos, 209, 209f

Hedgehog, secreción, 988

Helicasa, 139

Hélice dextrógira, 119

Hélice de lectura de la secuencia, 309

Hélice de reconocimiento, 309

Hélices A, 456

Helicobacter pylori, 1117

Hemaglutinina, plegamiento y ensamblado, 598, 599f

Hemidesmosomas, 935

Hemo, 534, 534f

Hemoglobina, 7f

Henderson-Hasselbach, ecuaciones de, 46

Hepatocitos, 226

HER (receptor del factor de crecimiento epidérmico humano), 726, 727f

Herencia citoplasmática

- ilustración, 247f
- mtDNA, 245

Heterocigosidad, 174, 177

Heterocromatina

- código epigenético, 261
- definición, 261, 316
- elemento limitrofe, 262
- eucromatina, 260f
- expresión génica, 314
- generación en los centrómeros de *S. pombe*, 333f
- metilación de la histona H3 lisina 9, 329
- modelo de formación, 261f
- núcleos de la levadura, 317f

Heteroduplas, 158f

Heterogeneidad genética, 211

Heteroplasmia, 250

Hexocinasa, 520

Hexosas

- definición, 37
- estructuras químicas, 37f

Hialuronato, 956

Hibridación fluorescente in situ (FISH)

- análisis por traslocación cromosómica, 268f
- definición, 267
- ilustración, 368f
- multicolor, 267

Hibridización

- ácidos nucleicos, 121
- búsqueda de genotecas, 189
- definición, 189
- detección del DNA/mRNA, 199
- fluorescencia in situ, 267
- in situ, 199, 201f

Hibridomas

- anticuerpos monoclonales, 401, 1072
- definición, 403
- obtención, 403f

Híbridos de resonancia, 27

Hidratos de carbono

- almidón, 39
- glucógeno, 39
- monosacáridos, 37

Hidrocarburos, 32

Hidrofobia, 475

Hidrolasas ácidas, 425

Hidrólisis

- ATP, 638, 648f, 796, 797f
- catalizada por bases, 120f
- definición, 33
- enlaces peptídicos, 549
- GTP, 647f, 678
- mediada por serina proteasa, 82f

Hierro-azufre, 534

HIF-1, 1117

Hipercolesterolemia familiar, 658

Hipercromía, 122

Hipermutación somática, 1077

Hiperpolarización, 693

Hipoacetilación, de las colas de histonas, 318

Histidina, 34, 34f

Histona metil transferasa, 261

Histonas, 224, 315

- acetilación, 258
- acetilasa, 317
- acetiltransferasas, 260
- definición, 256
- desacetilasas
- eliminación de grupos acetilo, 260, 317
- mecanismo, 318f
- represión de la transcripción, 318
- metilación, 327
- modificaciones, 260
- postraduccionales, 258f, 259, 328c
- variedades, 257

HIV (virus de inmunodeficiencia humana)

- mRNA, 368, 369f
- transcripción, 300, 369

HLA, complejo, 1081

HMG-CoA reductasa, 467

Hoja

- almidón, 552, 552f

- anatomía de los vegetales C4 y vía C4, 571f
- estructura celular, 553f
- Holliday, estructura
- definición, 157
- resolución, 159
- resolución alternativa, 159f
- Homeodominio, 309
- Homocigosidad, 317
- Homólogos, 259
- Hormonas
- crecimiento, 676f
- epinefrina, 688
- unión a receptores nucleares, 324
- Horquillas, 122
- Huntington, enfermedad de, 232
- Husos mitóticos
- CDK mitóticas, 898
- clases de microtúbulos, 851, 852f
- definición, 850, 876
- formación, 858, 858f
- función, 898
- organización por los centrosomas, 899
- separación, 857f
- unión del cromosoma, 900f
- vía de control del ensamblado, 910, 911f
- vía de control de la posición, 912, 912f

I

- I- κ B cinasa, 757
- Ícono, 29
- Identificación de genes
- corregulada, 202
- genes de enfermedades, 206
- posición en el cromosoma, 180
- IgM
- cambio de clase, 1080
- membrana, 1079f
- secretoria, 1079f
- síntesis de sucrosa, 1079f
- Importación nuclear, 617
- Imprecisión de la unión, 1075
- Impronta de DNA
- diferencias en la longitud de una secuencia simple de DNA, 233
- identificación de individuos, 235f
- Inactivación génica, 212
- GTPasa de tipo salvaje, 218f
- interferencia en el RNA (iRNA), 216, 218f
- recombinación de células somáticas, 214
- Índice hidropático, 593
- Índice de refracción, 407
- Inflamación, 1064
- Inflamosomas, 1104f
- Inhibición lateral, 761
- Inhibición por producto final, 88
- Inhibición por retroalimentación, 88
- Inhibidor de la disociación del nucleótido guanina, 811
- Inhibidor regulado por el hemo, 379
- Inhibidores de CDK (CKI)
- control de la actividad de la ciclina-CDK, 888
- definición, 888
- fase S. degradación, 892
- Iniciadores, 295
- Inmunidad
- adaptativa, 1065

- definición, 1059
- innata, 1061
- vacunas, 1105
- Inmunoelctrotransferencia
- definición, 100
- ilustración, 101f
- Inmunoglobulinas
- cadenas livianas, 1069
- cadenas pesadas, 1068
- definición, 1066
- dominios, 1071
- ensamblado de la cadena liviana, 1075
- estructura, 1068f
- ilustración, 7f
- isotipos, 1068
- propiedades funcionales, 1072
- región constante, 1071
- reorganización somática, 1111
- Imunoprecipitación
- cinasas, 685
- ensayos, 685
- Inositol 1,4,5-trifosfato (IP3), 708
- liberación de Ca²⁺ del retículo endoplasmático, 708
- vía del diacilglicerol, 711f
- Insulina
- definición, 6
- estimulación de los adipocitos, 766f
- glucagon, 765
- ilustración, 7f
- secreción en respuesta a la glucemia, 765f
- Integrinas
- adhesión de las células a la matriz extracelular, 939
- control del movimiento celular, 962
- definición, 809, 939
- estructuras adhesivas, 961, 962f
- expresión, 964
- mediación de la conexión, 959f
- modelo de activación, 963f
- transporte de la señal, 961
- unión, 961
- unión a la fibronectina, 958f
- Interacciones
- adhesivas
- - células inmóviles, 961
- - células móviles, 931
- electroestáticas, 30
- entre el endotelio y los leucocitos, 966f
- intercelulares, 928
- intracelulares, 927
- iónicas, 28
- no covalentes
- - complementariedad molecular, 32
- - definición, 25
- - energías relativas, 28f
- - enlaces de hidrógeno, 27
- - fuerza y estabilidad, 29
- Interfase, 876
- Interferones, 165
- Interleucinas, 1099
- Intermediarios metabólicos, 520
- Interneuronas, 1020, 1022
- Intrones
- auto-empalme, 358, 359f
- definición, 127, 225
- empalme del RNA, 350, 351f

- eucarióticos, 128, 225
- grupo I, 356, 389, 389f
- grupo II, 389f
- premRNA (mRNA precursor), 356
- Invasión catalizada, 157
- Invertebrados, sistemas experimentales, 19
- Iones
- Ca²⁺, 485
- filtro de selectividad, 497, 499f
- hidrógeno
- - ácidos, 46, 46f
- - bases, 46
- K⁺, 489, 496, 498
- medición del movimiento, 499, 500f
- proteínas de transporte, 506, 506f
- selectividad y transporte en los canales de K⁺ en reposo, 499f
- Islotes CpG
- definición, 296
- transcripción divergente, 296
- Isoformas
- definición, 130, 933
- *Dscam*, 364, 1140
- fibronectina, 362
- Isoleucina, 33, 36f
- Isomerasa disulfuro proteica, 597, 597f
- Isómeros ópticos, Véase *Estereoisómeros*

J

- JAK cinasa, 728, 737

K

- KDEL
- receptores, 641, 643f
- señales para la distribución, 642
- Kearne-Sayre, síndrome de, 250
- Kozak, secuencia, 140

L

- Lámina basal, 945
- colágeno de tipo IV, 947, 948f, 950f
- componentes proteicos, 947, 947f
- definición, 18, 933
- ensamble de las células en los tejidos, 946
- lamininas, 947, 947f
- nidógeno, 947
- perlecán, 947
- proteoglucanos, 951
- separación de las células, 946f
- Lámina beta (β), 64, 64f
- Lámina nuclear, 898, 899f
- Laminina
- definición, 947
- ilustración, 948f
- LC-MS/MS (espectroscopia de masa en serie)
- definición, 105
- identificación de las proteínas en los orgánulos, 109f
- identificación de las proteínas en una muestra compleja, 108f
- Leber, neuropatía óptica hereditaria de, 250
- Lectinas, 598
- Lentivirus, 203
- Letalidad sintética, 179

- Leucemias, 1115
 - Leucina, 33, 36f
 - Levaduras
 - aparato de Golgi, 16
 - apareamiento inducido por feromonas, 742f
 - cascadas de MAP cinasa, 743f
 - ciclo sexual, 17
 - complejos mediadores humanos, 321f
 - crecimiento, 16
 - crecimiento asimétrico durante el acoplamiento, 998
 - elemento Ty, 240f
 - experimentos de transfección, 271
 - fisión, 877, 879f
 - gemación, 877, 878f
 - genes esenciales, 175
 - genotecas, 188, 190f
 - haploide, 382f
 - heterocromatina telomérica, 317f
 - movimiento por la miosina V, 805f
 - mutantes, 632, 632f
 - organismo experimental, 12f
 - proteína SR, 367
 - reemplazo del alelo mutante, 212
 - RNA polimerasa nuclear, 293
 - secuencias de replicación autónomas, 270, 270f
 - sistema de dos híbridos, 321, 321f
 - transporte de la partícula de mRNP, 383f
 - Ligandos, 77f, 724f
 - afinidad por el receptor, 681, 685
 - baja afinidad, 683f
 - complementariedad molecular, 676
 - definición, 45, 77
 - moléculas de señalización, 674
 - sitio de unión, 77
 - tirosina cinasas del receptor, 723
 - unión a proteínas, 76, 77f
 - Líneas celulares, 400
 - Linf, 1061
 - Linfocitos
 - B, 1059, 1068, 1072
 - cambio de isotipo, 1080
 - comparación del desarrollo, 1098f
 - definición, 1060
 - desarrollo, 1072
 - diferenciación terminal, 1079
 - estructura del prerreceptor, 1078f
 - Ig secretada, 1079
 - inmunoglobulinas, 1068
 - presentación antigénica, 1091f
 - producción de anticuerpos de gran afinidad, 1104, 1106f
 - proliferación, 1078
 - proliferación y diferenciación, 1095
 - requerimiento del desarrollo, 1077
 - definición, 1061
 - *natural killer*, 1064, 1065f
 - pre B, 1077
 - salida, 1061
 - T, 1059, 1080, 1092
 - activadas a través del compromiso, 1093
 - CD4, 1099
 - citolíticos, 1099
 - citotóxicos, 1081
 - actividad de destrucción, 1082
 - correceptor CD8, 1099
 - definición, 1081
 - especificidad, 1083f
 - muerte celular mediada por granzima, 1100f
 - muerte celular mediada por perforina, 1100f
 - presentación cruzada, 1088
 - restricción, 1082
 - definición, 1060
 - desarrollo, 1098f
 - guiadas por moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, 1082
 - helper, 1081, 1083
 - definición, 1081
 - marcador de la glucoproteína CD4, 1084
 - inflamatorios, 1101
 - producción de anticuerpos de alta afinidad, 1104, 1106f
 - producción de citocinas, 1099
 - proliferación y diferenciación, 1095
 - reconocimiento de la molécula del complejo mayor de histocompatibilidad, 1097
 - regulación del desarrollo en animales, 1092
 - regulatorias, 1101
 - reorganización de los genes, 1093
 - señal, 1098, 1099f
- Linfomas, 1115
- Lípidos
 - anclaje a las proteínas de membrana, 461, 461f
 - bicapa, 8f, 455
 - clases en biomembranas, 448, 449f
 - componentes de las biomembranas, 452c
 - composición, 451
 - dominios de unión, 462
 - fosfoglicéridos, 448
 - influencia de las propiedades físicas, 452
 - movilidad en las biomembranas, 450
 - transición de fase, 451
 - transporte diferencial, 469
 - valvas exoplasmáticas/citosólicas, 453
- Lipoproteína de alta densidad (HDL), 31
- Lipoproteína de baja densidad (LDL), 31, 655
 - absorción celular, 656
 - definición, 656
 - enfermedad aterosclerótica, 764
 - modelo, 656f
 - receptor (LDLR), 657, 659f
 - unión a la partícula, 659f
 - unión a la superficie, 655
 - vía endocítica para la internalización, 657f
- Liposomas, 445
- LIS1, 840, 840f
- Lisina, 34, 36f
- Lisina acetiltransferasas nucleares, 260
- Lisogenia, 164
- Lisosomas
 - materiales citosólicos, 661
 - proteínas de la membrana, 661
 - transporte de proteínas citosólicas, 664
- Listeria
 - definición, 787
 - motilidad, 788
 - polimerización de la actina, 787f
 - propulsión, 808
- Localización
 - DNA de secuencia simple, 232f
 - efectos del cAMP, 703, 705f
 - filamentos intermedios, 860f
 - miosina II, 805f
- de mRNA, 379
- *Saccharomyces cerevisiae*, 382
- sinapsis, 383, 383f
- proteína, 10
- proteincinasa A, 705f
- vesículas sinápticas, 1038
- ## M
- Macroautofagia, 377
 - Macrófagos, 773
 - Macromoléculas
 - construcción, 33
 - formación, 4
 - sitios de unión, 45f
 - Macronúcleo, 271
 - Mad2, 911
 - Maduración de las cisternas, 629
 - Manganeso, 562
 - Manosa-6-fosfato, 648, 648f
 - MAP cinasa
 - activación, 739
 - cascada, 735
 - cascadas de la levadura, 743f
 - fosforilación, 739
 - inducción de la transcripción de genes, 741f
 - no fosforilada, 740f
 - regulación del factor de transcripción, 741
 - separación de la vía, 744
 - Mapa genético
 - identificación genética, 180
 - recombinación durante la meiosis, 180f
 - usos, 182
 - Mapeo del ligamiento, 208
 - Mapeo recombinante, 181
 - Máquinas moleculares, 59, 109
 - Marcado del epítipo, 99, 205, 411
 - Marcado isotópico estable con aminoácidos en cultivo celular, 105
 - Marcos de lectura, 132, 132f
 - abiertos (ORF), 253
 - Marfan, síndrome de, 960
 - Masa celular interna, 978
 - definición, 979
 - fuente de células madre embrionarias, 981
 - Mastocitos, 1066
 - Material pericentriolar, 825
 - Matriz extracelular, 399
 - adhesión, 928
 - conexiones con el citoesqueleto, 964
 - definición, 927, 929
 - inactivación de los genes de proteínas, 932f
 - lámina basal, 945
 - proteínas, 930c
 - regla GAG, 954
 - rol de los proteoglicanos, 953
 - señalización, 929
 - tejido conjuntivo, 951
 - variación de la densidad, 930f
 - Matriz mitocondrial
 - importación de proteínas, 604f
 - secuencias señal, 603
 - secuencias señal anfipáticas N-terminales, 603
 - Maturasas, 358
 - Mdm2, 1141
 - Mecanismo de cambio de unión, 547, 548f
 - Mecanismos epigenéticos, 323

- Mecanismos de retroalimentación negativa, 876
- Mecanismos de retroalimentación positiva, 876
- Mecanorreceptores, en canales catiónicos con compuertas, 1047
- Mediador
 - definición, 315, 321
 - interacciones con el dominio de activación, 320
 - puente molecular, 320
 - regulación de la transcripción, 315
- Meiosis
 - fases de segmentación del cromosoma, 913
 - función de la cohesina, 917f
 - ilustración, 916
 - ingreso, 913
 - meiosis I, 917
 - meiosis II, 917
 - mitosis, 174f, 914, 914f
 - recombinación, 180f
 - recombinación homóloga, 913
- Melanosomas, 865
- Membranas, 447
 - artificiales, 480
 - ATP sintetasa, 546
 - basales, 1115
 - bicapas, 445, 445f, 446f
 - biosíntesis, 464
 - bloques de construcción, 11
 - capacitores, 496
 - cara citosólica, 447f, 495
 - cara exoplasmática, 447f, 495
 - caras, 447, 447f
 - componentes lipídicos, 452c
 - conexión con los filamentos de actina, 791
 - despolarización, 1025f, 1044
 - eritrocito, 478
 - estructura, 442
 - estructuras dinámicas, 444, 444f
 - extensión, 808
 - fuerzas, iones de Na⁺, 503f
 - de glucosilfosfatidilinositol, anclaje, 654
 - - proteínas, 592, 592f
 - Golgi, 452
 - gradiente eléctrico, 495
 - magnitud del potencial eléctrico, 496
 - medición del potencial eléctrico, 497f
 - mesosoma, 11
 - mitocondrial, 524, 528
 - modelo de mosaico fluido, 444, 444f
 - orgánulo, 473
 - permeabilidad al agua, 481
 - plasmáticas, Véase *Membrana plasmática*
 - potencial de reposo, 497
 - reciclado, 808
 - retículo endoplasmático, 465
 - tilacoide, 553
 - unión lateral de los microfilamentos, 792f
- Membranas plasmáticas, Véase también Membranas
 - definición, 424, 443
 - despolarización, 1025f
 - proteínas, 443
 - receptores, 443
- Meristemas
 - apical de la raíz, 995
 - cambios en la pared celular, 969
 - definición, 995
 - estructura física, 996f
 - nichos para las células madre en las plantas, 995
 - raíz, 995
 - red reguladora, 996f
- Meselson-Stahl, experimento de, 146f
- Mesosomas, 11
- Metabolitos, 507
- Metafase, Véase también Mitosis
 - definición, 850, 876
 - ilustración, 850f
- Metaloproteinasas de la matriz, 960
- Metástasis
 - cáncer colorrectal, 1121f
 - definición, 1114
 - ilustración, 1116f
- Metazoarios
 - definición, 36
 - factor de transcripción E2F, 891
 - genes codificadores de proteínas, 18
 - inactivación del cromosoma X, 332
 - modelos, 16
 - regulación de la terminación de la RNA polimerasa II, 327
 - regulación de la transición de la RNA polimerasa II, 325
 - represión epigenética, 331
 - transición de la fase G1/S, 890
- Metilación
 - histona, 327
 - de la histona H3 lisina 9
 - - heterocromatina, 329
 - - mantenimiento, 329f
 - modelo del mecanismo, 334f
 - represión epigenética, 327
- Metionil-tlRNA^{Met}, 137
- Metionina, 33, 36f
- Micelos, 445
- Michaelis, constante de, 80
- Michaelis-Menten, ecuación de, 80
- Micoplasma, 14
- Micro mRNA (miRNA)
 - características distintivas, 371f
 - complejos RIC, 372
 - definición, 370
 - desarrollo del miembro, 373f
 - función, 229
 - procesamiento, 372, 372f
 - regulación de la traducción, 370
 - represión de la traducción del mRNA, 371
 - tamaño, 9
- Microfibrillas, 961, 969
- Microfilamentos, 773
 - cinturón adherente, 776
 - conos de crecimiento nerviosos, 866, 867f
 - coordinación Cdc42, 867, 867f
 - definición, 15, 775
 - ejemplos de estructura, 777f
 - estructuras de actina, 775
 - funciones, 822f
 - funciones en la endocitosis, 788
 - ilustración, 15f
 - propiedades, 822f
 - transporte en los melanosomas, 865
 - unión lateral a las membranas, 792f
- Micromatrices (DNA)
 - análisis, 200f
 - definición, 199
 - elevación de la expresión génica, 200
 - preparación de la expresión génica, 200
- Microsatélites
 - definición, 232
 - formación, 207
 - repeticiones, 232, 232f
 - unidades de transcripción, 231
- Microscopia, 417f
 - confocal, 413, 413f, 414f
 - - definición, 413
 - - disco giratorio, 413, 413f
 - - ilustración de la sección óptica, 414f
 - - trayectorias de la luz, 413f
 - por contraste de interferencia diferencial
 - - cono de crecimiento neuronal, 867f
 - - definición, 407
 - - mitosis, 849f
 - - transporte de vesículas en microtúbulos *in vitro*, 835f
 - - visualización celular, 404, 407f
 - de contraste de fase, 405
 - crioelectrónica
 - - definición, 105, 421
 - - proceso, 105
 - - visualización de la pieza, 421
 - de deconvolución, 412, 412f
 - de fluorescencia
 - - desconvolución, 412, 412f
 - - funciones, 408
 - - limitaciones, 411
 - - marcado doble, 410, 411f
 - - de reflexión interna total, 415, 415f
 - índice de refracción, 407
 - inmunoelectrónica, 421
 - de inmunofluorescencia, 398
 - - definición, 409
 - - detección, 409
 - - indirecta, 410, 410f
 - de interferencia de contraste diferencial, 405
 - lapso temporal, 408
 - localización fotoactivada, 418
 - óptica, 404
 - piezas, 408
 - superresolución, 418, 418f
 - tejidos, 408f
 - TIRF, 415, 415f
- Microscopia electrónica, 419, Véase también Microscopia
 - de barrido, 419, 423, 424f
 - - definición, 419
 - - imágenes tridimensionales, 424f
 - - muestras cubiertas de metal, 423
 - cortes, 421
 - crioelectrónica, 421, 423f
 - imágenes de alta resolución, 418
 - inmunoelectrónica, 421
 - microscopios, 419
 - moléculas o estructuras aisladas, 419
 - muestras con tinción negativa, 419
 - proceso, 420f
 - sombra metálica, 420, 421f
 - de transmisión, 419, 420f, 422f
 - - definición, 419
 - - detección de proteínas unidas a anticuerpos, 422f
 - - muestras con tinción negativa, 420f

- Microscopios ópticos, 407
 - apertura numérica, 405
 - desarrollo, 405f
 - resolución, 404
- Microtúbulos
 - acortamiento, 855
 - alineación de cromosomas duplicados, 855
 - astral, 851
 - búsqueda y captura, 829
 - capuchón de GTP- β -tubulina, 828, 829f
 - la cinesina-1 usa ATP para su transporte, 838f
 - cinetocoro, 850
 - conos de crecimiento nervioso, 866, 867f
 - coordinación Cdc42, 867, 867f
 - crecimiento preferencial, 827
 - crecimiento y reducción, 828, 828f
 - definición, 15, 775, 821
 - desensamblado, 831, 833f
 - destirolados, 843
 - dinámica, 827
 - - mitosis, 851, 853f
 - distintivos, 842
 - dobles, 824, 824f, 845
 - ensamblado, 825, 826f
 - - localizado, 829
 - espaciado, 831f
 - estabilización por proteínas de unión lateral, 830
 - estructura, 821
 - estructuras superficiales, 844
 - fuerzas de tracción y de empuje, 821
 - funciones, 822f
 - ilustración, 15f
 - inestabilidad dinámica, 827, 828f, 829f
 - localizaciones, 823f
 - organización, 823
 - paredes, 822
 - polar, 851
 - propiedades, 821, 822f
 - - y regulación de la función, 830
 - proteínas desestabilizadoras, 833f
 - proteínas motoras, 833
 - protofilamentos, 822
 - regulación, 830
 - - CPC, 855, 856f
 - - de la unión, 855
 - transporte axónico, 833, 834f, 843
 - transporte en el melanoma, 865
 - triplete, 824, 824f
 - velocidad de crecimiento, 828
- Microvellosidades, 773
- Migración y movimiento celular, 808
 - adhesión, 808
 - adhesión mediada por integrina, 961
 - coordinación de la generación de la fuerza, 808
 - definición, 808
 - dirección por moléculas quimiotácticas, 813
 - estructuras de actina, 810f
 - extensión, 808
 - hialuronato, 956
 - iniciación, 808
 - pasos, 809f
 - proteínas de unión al GTP, 810
 - reciclado, 808
 - regulación coordinada por Cdc42, Rax, Rho, 812
 - traducción, 809
- Miocardopatías hipertróficas, 801
- Miofibrillas, 801
- Miosina(s), 792
 - cabezas
 - - cambios conformacionales, 797
 - - pasos, 799
 - cadena liviana reguladora, 806
 - clases comunes, 797
 - conversión de la energía, 794
 - definición, 793
 - detección del movimiento, 795, 795f
 - disolución del filamento, 795
 - estructura, 794f
 - filamentos, 801
 - fosforilación, 806f
 - I, 804f
 - II, 793f, 795, 799f
 - - ciclado, 804
 - - haces contráctiles, 804
 - - localización durante la citocinesis, 805f
 - LC cinasa, 805
 - longitud del cuello, 799f
 - movimiento impulsado por ATP, 798, 798f
 - organización en dominio, 794
 - superfamilia, 796f
 - tamaño del paso, 800f
 - V, 798, 799f
 - - movimiento, 805f
- Miranda, 1004
- Mitocondrias
 - aislamiento, 245
 - alteraciones del código genético, 249c
 - ciclo del ácido cítrico, 524
 - códigos genéticos, 249
 - definición, 13, 524
 - distribución de las proteínas, 577
 - estructura interna, 525f
 - evolución, 248, 427
 - fraccionamiento, 525
 - fuerza de los protones, 541
 - fuerza de los protones para la generación de calor, 551
 - fusión y fisión, 526f
 - hipótesis endosimbionte, 247f, 546f
 - membranas, 524
 - oxidación en los ácidos grasos, 530, 531f
 - porinas, 526
 - productos, 247
 - purificación, 525
 - regulación de la apoptosis, 1012f
 - síntesis de ATP, 544
 - sistema de transporte de ATP/ADP, 550, 550f
 - transporte de electrones, 532
 - velocidad de oxidación, 551
- Mitógenos, 891, 1140
- Mitosis, 849
 - anafase, 850, 851f
 - células humanas, 882f
 - citocinesis, 851, 851f
 - definición, 14f, 15, 850
 - dinámica microtubular, 851
 - fases, 849
 - finalización, 903, 906f
 - función de la cohesina, 917f
 - ilustración de los estadios, 875f
 - ingreso, 898
 - inicio, 896
- meiosis, 174f, 913f, 914
- metafase, 850, 850f
- microscopia DIC, 851
- profase, 849, 850f
- prometafase, 850, 850f
- salida, 903, 906f
- telofase, 851, 851f
- Modelo de adivina de la selección de la célula T, 1097
- Modelo del filamento deslizante, 803f
- Modelo de hipótesis endosimbionte, 246f
- Modelo del mosaico fluido, 444, 444f
- Moléculas
 - de adhesión celular
 - - definición, 399, 927
 - - dirección de la adhesión leucocitaria, 967
 - - familias, 928f
 - - a inmunoglobulinas (IgCAM), 965, 1035
 - - interacciones intermoleculares, 929
 - - multifacéticas, evolución, 932
 - - en las plantas, 970, 970f
 - - unión, 926
 - de adhesión a la unión, 19, 940, 964
 - afinidad, 33
 - anfipáticas, 24, 445
 - DNA, 6f
 - evolución, 1
 - GLUT4, 765
 - grupos funcionales y ligamentos, 28c
 - hidrófilas, 24, 445
 - hidrófobas, 23, 445
 - investigación en biología celular, 431c
 - no polares, 30
 - pequeñas, 4, 5f
 - RNA, 6f
 - de señal
 - - distancia, 675
 - - extracelular, 673
 - - ligandos, 674
 - - locales, 675
 - - respuesta celular máxima, 683, 684f
 - - unión, 676
 - separación, 93
 - vitales, 5
- Moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, 1081, Véase también *Complejo mayor de histocompatibilidad*
 - clase I, 1081, 1083, 1084f
 - - transporte, 1088
 - - unión, 1088
 - clase II, 1082, 1084, 1084f
 - - encuentro, 1089
 - - unión, 1089
 - reconocimiento por las células T, 1098
- Monastrol, 431
- Monómeros
 - composición de los polímeros, 117
 - definición, 34
 - formación de polímeros, 4
 - ilustración, 34f
- Monosacáridos
 - definición, 37
 - hexosas, 37, 37f
 - pentosas, 37
- Morfogénesis
 - definición, 931
 - ramificación, bloqueo, 931

Mosca de la fruta, Véase *Drosophila melanogaster*

Movimientos impulsados por la miosina, 801

Muerte celular

- apoptosis, 1006, 1006f
- características ultraestructurales, 1006f
- definición, 1006
- generalidades, 978f
- programada, 908, 978, 1143

Multicelularidad

- adhesión entre la célula y la matriz, 17
- adhesión intercelular, 18

Músculo esquelético

- complejo glucoproteico distrofina, 964f
- estructura, 802f
- estructura a través de proteínas estabilizadoras o de andamiaje, 801
- proteínas accesorias, 803f
- regulación de la contracción, 801

MuSK, 1037

Mutaciones, 172

- análisis genético, 171
- por aumento de la función, 1125
- por cambio de marco de lectura, 173
- causantes de cáncer, 1114
- condicional, 175
- condicionales
- - estudio de los genes esenciales, 175
- - sensible a la temperatura, 176
- daño químico y actínico, 152
- definición, 172
- división celular, 1139
- dominantes, 172
- - efectos sobre el fenotipo, 173f
- - función de los genes, 173
- - negativas, 173, 729, 1143
- - pérdida de función, 173
- - segregación, 173, 175f
- fenotipos, 280f
- levadura, 632, 632f
- mapeo de ligamiento, 208
- marcado de genes mediante la inserción, 194
- mtDNA, 250
- pérdida de la función, 1127
- puntuales, 151, 173, 1125
- - conversión de protooncogenes a oncogenes, 1125
- - definición, 151, 173
- - desaminación, 152
- recesivas, 173, 175, 1127
- - diploides, 175
- - efectos sobre el fenotipo, 173f
- - función de los genes, 172
- - genes supresores tumorales, 1128
- - pruebas de complementación, 177
- - segregación, 173, 175f
- secreción (*sec*), 632
- secuencia del DNA, 150
- segregación, 173
- sensibles a la temperatura, 176, 176f, 877
- - definición, 177
- - levaduras, 877
- - levaduras haploides, 177f
- sin sentido, 143, 172
- - definición, 143
- sintéticas letales, 180
- supresoras, 179
- terminación prematura de la síntesis de

proteínas, 143

- transformación en células tumorales, 1118, 1119f

Mutágenos, 172, 1145

Mutantes dobles, en la evaluación del orden de la función de las proteínas, 178, 178f

Myc, 1131, 1131f

N

Na+

- ingreso, 502
- iones, 497
- - deshidratados, 499
- - fuerzas transmembrana, 503
- - gradientes de concentración, 494

Na+/K+ ATPasa, 489, 489f

NAD+ (nicotinamida adenina dinucleótido), 54

- forma oxidada, 519
- ilustración, 55f

NADH

- ciclo del ácido cítrico, 527
- oxidación, 531
- transporte de electrones, 532

NADH-CoQ reductasa en el transporte de electrones, 536, 537f

NADP+, 556

Nebulina, 802

Necrosis, 1007

NELF (factor de elongación negativa), 419

Nematodo, Véase *Caenorhabditis elegans*

Neoplasia endocrina múltiple tipo 2, 1133

Nernst, ecuación de, 496

Neuroblastoma, 1149

Neuroblastos

- división celular asimétrica, 1005f
- precursores, 1020

Neurofilamentos, 863

Neuronas

- aferentes, 1022
- cultivo, 1037
- definición, 1020
- eferentes, 1022
- eferentes, 1022
- excitatorias, 1020
- flujo de la información, 1020
- inhibitorias, 1020
- mitrales, 1050
- motoras, 1020
- pérdida, 1011f
- presináptica, 1036
- proyección, 1050
- receptoras olfatorias, 1051, 1051f
- - definición, 1050
- - estructura, 1051f
- - ratón, 106f, 1051
- - receptores de olores, 1051
- sensitiva, 1020
- supervivencia, 1010, 1010f
- uniones comunicantes, 1045

Neurotransmisores

- ciclado, 1040f
- definición, 1036
- difusión a través de sinapsis, 1022
- estructura de las moléculas, 1039f
- liberación del estímulo de Ca²⁺, 1040
- receptores, 1036

- síntesis, 1038
- transporte en vesículas sinápticas, 1038
- unión al receptor excitatorio, 1045
- unión al receptor inhibitorio, 1045

Neurotrofinas

- definición, 1011
- supervivencia de la neurona, 1010
- unión, 1011

Neutrófilos, 1066

NFκB, 87

- cadenas de poliubiquitina, 759
- definición, 752, 757
- descubrimiento, 757
- estimulación de la transcripción, 759
- vía
- - activación, 757, 758f

Nidógeno, 947

No disyunción, 912

Nociceptores, 1048

- canales catiónicos con compuerta, 1048

Núcleo

- contenidos, 427
- distribución de las proteínas, 577
- modificación del pre-tRNA, 390
- señalización de las proteínas, 577
- transporte dentro y fuera, 615

Nucleocápsides, 160

Núcleo, 384

Nucleoporinas

- definición, 365, 615
- estructural, 615
- FG, 615
- fosforilación de CDK, 898
- membrana, 614
- tipos, 615

Nucleósidos

- definición, 38
- terminología, 38c

Nucleosomas

- definición, 225, 256
- estructura, 255, 256f
- pares de bases, 314

Nucleótidos

- bases, 7, 38f
- construcción de ácidos nucleicos, 36
- definición, 7, 37, 118
- estructuras compartidas, 38f
- formación de la cadena de DNA, 9
- terminología, 38c

O

Objetivo, 404

Ocludina, 941

Oftalmoplejía externa progresiva crónica, 250

Okazaki, fragmentos, 146

Oligodendrocitos, 1033

Oligopéptidos, 62

Oligosacáridos

- ligados al extremo amino terminal
- - definición, 594, 955
- - modificaciones, 598f
- - procesamiento, 644f
- - retículo endoplasmático rugoso, 595, 596f
- modificaciones específicas del compartimento, 631

Oligosacáridos (*Cont.*)

- precursores, biosíntesis, 595f
- unión a glucoproteínas, 596
- unión O, 593
- - definición, 594, 955
- - unión a los componentes de la lámina basal, 964
- Oligosaciltransferasa, 595
- Oncogenes, 740, 1113, Véase también *Cáncer*
- adicción, 1132
- conversión de los protooncogenes, 1125
- definición, 165, 1119
- mutaciones sucesivas, 1121
- mutaciones, efectos, 1133f
- proteínas de transducción de la señal, 1134
- receptores, 1131
- transformación, 1118
- virus que causan cáncer, 1127
- Oncoproteínas, 751, 1133
- Ondas evanescentes, 415
- Op18/estatmina, 832
- Operones
- *lac*, 281
- *Tpr*, 287, 288f, 289
- Opsonización, 1064
- Organismos
- descendencia, 3f
- experimentales, 12f
- modelo, 16
- tamaños de los genomas, 8c
- Organizadores nucleolares, pre-RNA, 385
- Órganos
- organización tisular, 19, 19f
- regulación del desarrollo en animales, 19f
- Orgánulos, Véanse también orgánulos específicos
- aislamiento, 424
- axones, 833
- blanco, 634
- caracterización, 397, 424
- células eucarióticas, 424
- composición proteica, 430
- definición, 399
- DNA, 244
- ejemplos, 426f
- eucarióticos, 14
- fotosíntesis, 427
- identificación de las proteínas, 108f
- liberación, 427
- membranas, 13, 472
- muy purificados, 429
- paternos, 634
- separación, 427, 441
- transporte por motores microtubulares, 841f
- Ósmosis, 480
- Osteoclastos, 510, 510f
- Osteopetrosis, 510
- Ovocitos
- caracterización de los canales nuevos, 501, 501f
- contenidos, 979
- definición, 977
- producción de células madre de la línea germinal, 987
- Oxidación
- aerobia
- - definición, 517
- - generalidades, 518f
- - productos de degradación, 518
- - relación recíproca, 518
- - resumen, 527f
- definición, 54
- potenciales, 55
- P**
- p53
- abolición del punto de control del daño al DNA, 1141
- actividad, 1140
- defensa contra la formación de cáncer, 1143
- forma activa, 1142
- mutaciones negativas dominantes, 1143
- Palade, George, 671
- Paneth, células, 989, 991
- Papilas gustativas, 1048
- Papilomavirus humano (HPV), 1134
- Paredes celulares, Véase también Plantas
- estructura, 968f
- láminas de fibrillas de celulosa, 968
- meristema, 969
- reblandecimiento en el crecimiento de las células vegetales, 969
- Pares de bases
- complementarios, 119
- definición, 119
- mecanismo conservador, 145
- mecanismo semiconservador, 145
- no estandarizada, 135, 136f
- Watson-Crick, 118
- Partícula de reconocimiento de la señal
- definición, 582
- estructura, 582f
- liberación de GDP, 583
- proteínas, 581
- receptores, 584
- Partículas de ribonucleoproteínas heterogéneas (hnRNP), 350, 370f
- Patógenos
- ingreso y replicación, 1061
- límites como defensa, 1062
- vacunas, 1105
- PC2 endoproteasa, 651
- Pentosas, 37
- Peptidasa de señal, 584
- Peptidilpropil isomerasas, 598
- Peptidiltransferasa, reacción, 142
- Peptidoglucano, 39
- Péptidos
- definición, 62
- encuentro con las moléculas de clase II, 1089
- impronta en masa, 105
- muestra pesada, 104
- transporte a las moléculas de clase I, 1088
- unión, 1084, 1086f
- unión a las moléculas de clase I, 1088
- unión a las moléculas de clase II, 1089
- Pérdida de la heterocigosidad, 1129, 1130f
- Perfil de expresión de proteínas, 108
- Perfil de la transcripción (mRNA), 107
- Perfiles de hidropatía, 593, 593f
- Perforinas, 1099, 1100f
- Período refractario, 1027
- Perleciano, 947
- Peroxisomas, 428
- división, 614
- oxidación de los ácidos grasos, 530, 530f
- Pez cebra
- desarrollo muscular y nervioso, 19
- organismo experimental, 12f
- pH
- definición, 45
- dependencia de la actividad de las enzimas, 83f
- disociación de los ácidos, 46f
- endosomas tardíos, 658
- líquidos biológicos, 45
- mantenimiento con amortiguadores, 47, 47f
- soluciones comunes, 46f
- Pi, 53
- Pigmentos que absorben la luz, 552
- Pinocitosis, 654
- Pinza deslizante, 147
- Pirimidinas, 37, 117
- Piruvato cinasa, 520
- Piruvato deshidrogenasa, 527
- Placas, 76, 160
- Plan corporal embrionario
- definición, 19
- formación de tejido, 17
- Plantas
- absorción de agua y minerales, 481
- conexión con el citosol, 969, 970f
- fotosistemas, flujo electrónico, 561, 562f
- inducción del 5-metil C por ncRNA, 334
- meristemas, 995, 996f
- metilación dirigida por el RNA, 333
- mitosis, 859, 859f
- moléculas de adhesión, 970, 970f
- organismo experimental, 12f
- pared celular, 968
- - estructura, 968f
- respuesta del IRNA, 373
- siRNA transferasa, 374
- subestructuras celulares, 425f
- tejidos, 966
- virus, 21, 160, 161
- Plaquetas, función, 963
- Plaquininas, 865
- Plasmalógenos, 449
- Plásmidos
- conjugación, 245
- envoltura, 203
- vector, 202
- Plasmodesmas
- conexión con el citosol, 969
- definición, 19, 969
- ilustración, 970f
- transferencia de siRNA, 373
- Plegamiento de las proteínas mediado por chaperonas, 73
- Pliegue de inmunoglobulina
- definición, 1071
- epítipo, 1071
- regiones hipervariables, 1071f
- Polaridad
- celular, 977, 996
- - antes de la división celular, 997
- - definición, 997
- - ejemplos, 773
- - mecanismo, 997
- - planar, 1002, 1003f

- definición, 1003
- orientación de las células, 1002, 1003f
- proteínas Par, 1000
- ejemplos, 28, 773
- filamentos de actina, 778, 778f
- Poli(A) polimerasa (PAP), 129, 358
- Poli(A) sitios, 225
- Poliglutaminación, 843
- Polimerasas, 127
- Polímeros
 - estructura primaria del DNA y el RNA, 117
 - formación, 4
 - ilustración, 35f
 - lineales, 117
- Polimorfismos del DNA
 - detección, 233
 - mapeo de ligamiento, 208
- Polimorfismos de nucleótido único (SNP), 208, 208f
- Polipéptidos
 - definición, 62
 - estructura, 60f
 - estructura cuaternaria, 67f
 - prohormonas, 93
- Poliposis adenomatosa colónica, 1122
- Polirribosomas
 - definición, 142
 - eficiencia de la traducción, 143
- Polisacáridos, 6, 39
 - ligados al hidroxilo, 955f
 - peptidoglucano, 39
 - polímeros, 33
- Politenización, 270
- Polo cinasas, 898
- Polos del huso mitótico, 825
- Polycomb, complejos, 262
 - control epigenético, 330
 - influencia opositora, 332f
 - modelo de represión, 331f
- Porinas
 - definición, 460
 - ilustración, 460f
 - mitocondriales, 525
- Posición de los genes, análisis, 180
- Potencial de membrana, Véase también *Potenciales de acción*
 - definición, 475
 - reposo, 1021
 - transporte axónico, 1021, 1021f
- Potencial de reposo, 1021
- Potencial umbral, 1044
- Potenciales de acción, 1020
 - conducción, 1032, 1033f
 - generación de células nerviosas, 1045
 - magnitud, 1025
 - propagación unidireccional, 1029
- Pre-mRNA (precursor del mRNA), 126
 - apareamiento de bases entre mRNA y, 353f
 - cambios en el procesamiento, 390f
 - capuchón 5', 348
 - definición, 350
 - empalme alternativo, 255
 - empalme del RNA, 350
 - empalmosomas, 368
 - ensamblado del empalmosoma, 354
 - eventos, 349
 - exonucleasas nucleares, 359
- intrones, 355
- modificación en el núcleo, 391
- organizadores nucleolares, 384
- procesamiento, 347, 390
- proteínas con dominios de unión al RNA, 349
- regulación del procesamiento, 360
- segmentación, 388
 - y poliadenilación 3', 358, 358f
- sexual doble (dsx), 362
- sexual letal, 362
- snRNA, 352, 353f
- tirosina, 390, 390f
- unidades transcripcionales, 386f
- Presentación cruzada, 1088
- Presión osmótica
 - ilustración, 481f
 - movimiento del agua a través de las membranas, 480
- Procariótico, 11
 - definición, 11
 - microorganismos, 5
 - organización de los genes, 126, 126f
 - ribosomas, 136f
- Procesamiento proteolítico, 651, 652f
- Procesamiento del RNA
 - definición, 128
 - generalidades, 129f, 348f
 - paso de empalme, 128
- Procesos moleculares, 118f
- Profagos, 164
- Profase, Véase también Mitosis
 - definición, 849, 876
 - ilustración, 851f
- Profilina, 782
- Proliferación celular
 - células B, 1078
 - inhibición por TGF- β , 1137
 - proteínas, 1125f
 - regulación, 889
 - Ski/SnoN, 751
- Prolina, 35, 35f
- Prometáfase, 850, 850f, 852, 854f
- Promoterfusión, 205
- Promotor del interferón- β , 315
- Promotores
 - débiles, 284
 - definición, 226, 286, 289
 - elementos internos, 337
 - empalme exónico, 356, 362
 - empalme intrónico, 362
 - estimulación de la transcripción, 304
 - formación del complejo multiproteico, 315
 - fuertes, 284
 - iniciación de la transcripción, 284
 - interferón β , 315
 - islote CpG, 295
 - longitud de los pares de bases, 304
 - RNA polimerasa II, 294
 - unión a los activadores lejanos, 285
 - unión para la transcripción, 281
- Proteínas, 651
- Proteasomas
 - características, 86
 - definición, 85
 - degradación de proteínas, 85
 - inhibidores de la función, 87
- Proteína(s), 329, 504
 - ácida fibrilar glial, 992
 - activadoras, 281
 - de GTPasa, 253, 697, 1134
 - aceleración, 695
 - estimulación, 811
 - de la secretasa X, 762
 - activas dominantes, 811
 - adaptadoras, 737, 928
 - definición, 737, 928
 - enlace Ras, 737
 - que conectan los filamentos de actina a las membranas, 791
 - de adhesión celular, 17
 - alostéricas, 88
 - aminoácidos, 5
 - ancladas a la cola, 590, 591f
 - ancladas a glucosfolípidos, 592
 - apicales, distribución, 652, 653f
 - ARF, 635
 - argonautas, 334, 335, 372
 - asociadas al filamento intermedio, 865
 - asociadas a cinasa A, 704
 - asociadas a los microtúbulos
 - +TIPS, 832, 833f
 - definición, 822
 - estabilizadoras, 831
 - unión lateral, 830
 - autoempalme, 93
 - basolaterales, 653
 - distribución, 652, 653f
 - de Bence-Jones, 1070f
 - BH3, 1008, 1012, 1014f
 - de cambio de la GTPasa
 - clases, 679
 - definición, 89, 144
 - formas, 89
 - formas activas e inactivas, 678f
 - ilustración, 91f
 - operación corriente abajo, 735
 - traducción, 142
 - del canal de K⁺, 363
 - capuchón, 783, 783f
 - ciclo celular, 16
 - citoesqueleto, 6
 - citosólicas, 465, 505, 645
 - dirección a los lisosomas, 661
 - regulación del pH, 505
 - transporte nuclear, 617f
 - vía autofágica, 664, 664f
 - cloroplastos, 609, 611f
 - con alteraciones del plegamiento, 600
 - con enlaces covalentes, 790, 791f
 - con grupos de alta movilidad, 267
 - con hélice-asa-hélice básica, 312
 - conformación, 64, 70, 104
 - contratransportadoras ligadas a H⁺, 1038
 - correpressoras, 313
 - crecimiento y proliferación celular, 1125f
 - de la cromatina (HP1), 261
 - de fusión, 326f
 - definición, 2
 - degradación
 - especificidad, 87
 - proteasoma, 85
 - roles, 85
 - ubiquitina, 88
- Proteína(s) (Cont.)

- del citoesqueleto, 6
- detección
 - - ensayos de anticuerpos, 97
 - - enzimas, 97
 - - experimentos de búsqueda del pulso, 101, 102f
 - - geles, 99
 - - radioisótopos, 99
- distribución, Véase *Señalización*
- efectoras, 811
- electroforesis en gel, 94, 94f, 95f
- enlaces, 31f
- ensamblado, 598, 599f
- ESCRT (complejos de distribución en endosomas necesarios para el transporte), 662
- estructura
 - - cuaternaria, 67, 68f
 - - disposición de los aminoácidos, 61
 - - espectroscopia NMR para determinar, 106
 - - generalidades, 60f
 - - jerárquica, 60
 - - microscopia crioelectrónica para la determinación, 105
 - - niveles, 61f
 - - primaria, 60, 104
 - - secundaria, 61
 - - terciaria, 64
- estructurales, 59
- eucarióticas, 202f, 203
- factores de crecimiento, 675
- de la familia Bcl-2, 1011, 1096f
- familias de proteínas
 - - ancestro evolutivo, 69, 69f
 - - definición, 228
 - - genes codificadores de proteínas, 228
 - - globina, 69f
 - - homología, 69
 - - superfamilias, 69
- fibrosas, 65
- fluorescentes
 - - colores, 412f
 - - marcado, 411
 - - verde, 99e
 - - - contenidos, 411
 - - - GroEL/GroES, 76
 - - - marcado, 204, 410
 - - - observación del transporte de la proteína G de VSV, 630
- - proteína transportadora, 205
- fuera de la célula, 671
- funciones, 6, 59, 60f
- fusión, 204, 326f
- G
 - - activación, 690, 690f
 - - activación por la luz, 694
 - - apertura de los canales de K⁺, 693
 - - estimuladoras, 692
 - - inhibitorias, 692
 - - mecanismo de cambio, 679f
 - - monoméricas, 377, 679
 - - pequeña monomérica, 377, 679
 - - trimérica, 378, 679, 692c
 - - triméricas, 379, 679, 692c
- GAL4, 305
- globulares, 64
- GLUT, 478
- homólogas, 17, 69
- HSP60, 75
- HSP70, 73
- HSP90, 73
- inhibidoras de la apoptosis, 1013
- integrales de membrana, 64, 456
- intermembranosas, 606, 608f
- de mantenimiento estructural del cromosoma
 - - anillos, 264
 - - complejo, 263
 - - definición, 263
 - - modelo, 264f
 - - mutaciones de la levadura, 263
- matriz extracelular, 930c
- de la matriz multiadhesivas, 946
- MCM, 149
- de la membrana, 454
- - acuaporinas, 457
- - α hélices, 456
- - ancladas a GPI, 592, 592f
- - anclaje lipídico, 456
- - citosólicas, 460
- - clases topológicas, 587
- - deducción de la topología, 592
- - dirección a los lisosomas, 661
- - distribución, 652, 653f
- - dominios de unión a los lípidos, 462
- - eliminación, 462
- - espacio intermembranoso, 609, 609f
- - estructura, 454
- - externa, 609
- - funciones, 454
- - glucoforina, 457
- - glucoproteínas, 461
- - integrales, 456
- - interacciones, 456
- - intermembranosas, 606, 608f
- - modificaciones, 594
- - periférica, 456
- - porinas, 460, 460f
- - residuos cargados, 459f
- - tipo I, 587, 587f
- - tipo II, 588, 588f
- - tipo III, 588, 588f
- - tipo IV, 590
- - topología, 461, 587
- mitocondriales
 - - compartimentos submitocondriales, 606
 - - espacio intermembranoso, 609, 609f
 - - experimentos, 605f
 - - fuerza de los protones, 606
 - - importación, 602, 603f
 - - - proteínas quiméricas, 605, 605f
 - - - receptores, 603
 - - - requerimientos, 603
 - - - requerimientos de ingreso de energía, 606
 - - membrana externa, 610
 - - membrana interna, 606, 608f
 - - secuencias señalizadoras, 607f
 - - señalización, 601
 - - síntesis, 602
- morfogénica ósea (BMP), 748
- motoras
 - - definición, 60, 834
 - - familias, 833
 - - microtúbulos, 833
- N-myc, 1149
- negativas dominantes, 811
- no histonas
 - - regulación de la transcripción y la replicación, 265
- NtrC, 285, 285f
- ORC, 149
- orden de funcionamiento, 179
- par
 - - asimetría celular, 997
 - - división celular asimétrica, 1003
 - - localización asimétrica, 1000f
 - - polaridad de la célula epitelial, 1001
- peroxisómicas
 - - biogénesis y división, 614f
 - - importación dirigida por PTS1, 612, 613f
 - - incorporación en diferentes vías, 613, 614f
 - - secuencia señal, 2, 612
 - - señalización, 577, 612
- plegamiento, 69, 594
- alterado, 600
 - - en enfermedades, 76
- catalizadores, 599
- chaperonina, 604
- enlaces peptídicos planares, 71, 71f
- - hemaglutinina, 597, 599f
- - inapropiado, 599
- - mediado por chaperonas, 598
- - modelo de la gota de aceite, 64f
- - secuencias de aminoácidos, 70
- precursora de amiloide (APP), 761f, 762
- producción diferencial, 280
- quiméricas, 398, 605, 605f
 - - definición, 399
 - - importación de proteínas mitocondriales, 605
- Raf, 738
- Ras
 - - activación, 733, 736f, 737f
 - - componentes de la vía, 1134
 - - conexión con las cinasas RTK y JAK, 737
 - - definición, 734
 - - estructura de unión, 739f
 - - mutación, 1117
 - - operación corriente abajo, 735
 - - unión a Sos, 737, 739f
- regulación
 - - degradación, 84
 - - fosforilación y desfosforilación, 90
 - - localización y concentración, 92
 - - métodos, 86
 - - segmentación proteolítica, 92
 - - síntesis, 85
 - - ubiquitinación y desubiquitinación, 91
- reguladoras, 59
- replicación del DNA, 146
- Sar1, 635, 635f
- secreción
 - - aparato de Golgi, 671
 - - basal, 671
 - - comentario, 672
 - - experimento, 671
 - - síntesis y movimiento, 672f
- secuencias
 - - búsqueda BLAST, 252
 - - determinación con espectrometría de masa, 101
- - homólogos, 253

- paralogas, 253
- segmentación
 - APP y enfermedad de Alzheimer, 761f
 - control de la vía de señalización, 760
 - metaloproteasas de la matriz, 761
- señalización, 577
 - cloroplastos, 577, 601
 - compartimentos submitocondriales, 606
 - definición, 577
 - espacio intermembranoso, 609, 609f
 - generalidades sobre la vía, 579f
 - membrana externa, 610
 - membrana interna, 606, 608f
 - mitocondrias, 577, 607
 - núcleo, 577, 615
 - ocurrencia, 577
 - peroxisomas, 577, 612
 - retículo endoplasmático, 577, 579
 - secuencias señal, 579
 - a los tilacoides de los cloroplastos, 610, 611f
 - vía secretora, 577, 629, 630f
- sensoras de Ca²⁺, 697
- síntesis
 - escalonada, 136
 - regulación global, 376
 - terminación prematura, 143
- Smad, 748, 750
- STAT, 730, 731f
- Tat, 301
- Tau, 830
- de transporte de la membrana, 424, 443
- acumulación de vacuolas de iones y metabolitos en los vegetales, 507, 507f
 - ATPasas, 476
 - bombas impulsadas por ATP, 476, 483
 - canales, 475
 - clases moleculares, 475
 - definición, 443
 - estudio con membranas artificiales y células recombinantes, 480
 - función, 59
 - función fisiológica, 476
 - funcionamiento conjunto, 476f
 - generalidades, 475f
 - mediación, 474
 - movimiento de la glucosa y los aminoácidos a través de los epitelios, 508
 - proteínas de transmembrana, 474
 - resistencia a múltiples fármacos, 491
 - superfamilia ABC, 483f, 484, 491
 - transportadores, 475
 - transporte facilitado, 476
 - de transporte de la resistencia a múltiples fármacos, 491
 - tipo IV, 591
 - transmembrana, 457, 458f
 - traslocación
 - cotraduccional, 583f
 - interacciones entre, 417f
 - libre, 584
 - membrana citoplasmática bacteriana, 610
 - postraduccional, 584, 586f
 - traslocón, 583, 584f
 - vía de secuencia polipeptídica, 584
 - tridimensional, 60
 - cristalografía de rayos X para determinar,

- 104, 104f
- métodos de visualización, 66f
- de unión a los ácidos grasos, 466, 466f
- de unión al elemento de respuesta iónica, 380
- de unión al GTP
 - pruebas, 685, 686f
 - transducción de la señal, 678, 678f
- de unión al retículo endoplasmático liso
 - control de la activación, 763f
 - control sensible al colesterol, 763
 - definición, 763
 - nucleares, 764
 - proteólisis intramembranosa regulada, 762
 - segmentación, 764
 - de unión al sitio A, 144, 358, 374
- Proteincinasa(s)
 - A (PKA)
 - activación, 702
 - activación mediada por cAMP, 702
 - amplificación de la señal, 703
 - conexión con la activación de la transcripción de genes, 703
 - definición, 701
 - estructura, 701f
 - localización, 705f
 - regulación del metabolismo del glucógeno, 703
 - Abl, 1134
 - activación, 676
 - de Camp, 700
 - inducida por hormonas, 701, 701f
 - B (PKB)
 - activación del DAG, 709
 - definición, 711, 746
 - inducción de respuestas celulares, 747
 - Proteincinasa C (PKC)
 - reclutamiento y activación, 747f
 - Bcr-Abl, 1135
 - definición, 91
 - G (PKG), 711
 - tirosina, 723
 - vías de señalización, 677, 678f
 - Proteoglucanos, 749, 951
 - definición, 946, 950
 - diversidad, 955
 - estructura, 957f
 - rol en la matriz extracelular, 955
 - Proteólisis
 - intramembranosa regulada, 761
 - mediada por proteasomas, 86f
 - mediada por ubiquitina, 86f
 - segmentación proteolítica, 92
 - en la vía del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I, 1088
 - en la vía del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II, 1089
 - Proteoma, 60
 - Proteómica
 - definición, 106
 - identificación de proteínas, 430
 - métodos de genética molecular, 109
 - preguntas abordadas por, 107
 - Protofilamentos
 - composición de los microtúbulos, 823
 - definición, 107
 - filamentos intermedios, 860
 - Protones, 45

Protooncogenes, Véanse también Cáncer;

Oncogenes

- conversión en oncogenes, 1125
- definición, 1113
- genes apoptóticos, 1143
- virus que causan cáncer, 1127
- Protostomas, 19
- Provirus, 164
- Pruebas de complementación, 227
- análisis, 177, 177f
- determinación de la mutación recesiva, 177
- PSI
 - actividades reguladas, 565, 566f
 - flujo cíclico de electrones, 564, 565f
- PSII
 - absorción de fotones, 563f
 - actividades reguladas, 565, 566f
 - flujo lineal de electrones, 561, 561f
 - recuperación de la fotoinhibición, 564f
- PTEN fosfatasa, 741, 1143
- Punto isoelectrico (pI), 96
- Puntos de control
 - ciclo celular, 1123
 - daño del DNA, 1141
 - reguladores, 1140
- Purinas, 117

Q

- Queratinas, 862
- Queratinocitos, 862
- Query, secuencia de, 253
- Química, conceptos, 24f
- Quimiocinas, 1066
 - definición, 966
 - homeostáticas, 1101
 - inflamatorias, 1101
- Quimioluminiscencia, 99
- Quimioósmosis, 518
- Quimiotaxis, 813, 814f
- Quiralidad, 25

R

- Rab GTPasas, 638
- Rac
 - movimiento de las células, 813f
 - organización de la actina, 810, 810f
 - regulación coordinada, 812
- Radioisótopos
 - autorradiografía, 100
 - definición, 100
 - detección de moléculas, 99
 - investigación biológica, 99
 - usados con frecuencia, 100c
 - vida media, 99
- Ramas
 - bloqueo, 931
 - definición, 157
 - ensamblado de los filamentos, 785
 - migración, 157
- Rana, Véase *Xenopus laevis*
- Ratones
 - células madre embrionarias, 20
 - clonados por trasplante del núcleo de las células somáticas, 985
- Ratones (*Cont.*)

- con inactivación génica, 212
 - desactivación génica, 214
 - divisiones de segmentación en el embrión, 979, 981f
 - modelos de cáncer humano, 20
 - mtDNA, 249f
 - neuronas receptoras olfatorias, 1051, 1052f
 - organismo experimental, 12f
 - transgénicos, 289
 - Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
 - amplificación, 192f, 193f, 194, 195
 - amplificación de la secuencia del DNA, 192
 - cebadores, 233
 - secuenciación de la molécula clonada, 196
 - transcriptasa reversa (RT-PCR), 194
 - Reacciones endergónicas, 49
 - Reacciones endotérmicas, 50
 - Reacciones químicas
 - cambio de energía libre, 49
 - catalizador, 43
 - comparación en estado de equilibrio, 44f
 - constante de velocidad, 43
 - desfavorable, acoplamiento, 52
 - endergónicas, 49
 - endotérmica, 50
 - en estado de equilibrio, 43
 - estado estable, 45
 - extensión, 43
 - NAD⁺/FAD, 54
 - productos, 42
 - rédox, 54
 - transporte, 52
 - unión, 44
 - velocidad, 44, 44f, 50
 - Receptores, 44, 673f
 - de acetilcolina, 692
 - acoplados a proteínas G, 686
 - - activación o inhibición de la adenilato ciclasa, 699
 - - activación de la proteína G, 690
 - - activados por ligando, 689, 690f
 - - definición, 674
 - - descenso regulado por represión por retroalimentación, 706
 - - desensibilización, 706f
 - - elevaciones en el Ca²⁺ citosólico, 707
 - - estructura, 687, 687f
 - - mecanismo, 689f
 - - olfatorios, 1051f
 - - regulación de los canales iónicos, 693
 - - transmisión de la señal a la MAP cinasa, 742
 - - unión al PAF, 966
 - - vías, 686
 - activación de las tirosina proteincinasas, 723
 - de adhesión
 - - familias, 928f
 - - unión, 929
 - unión a la matriz extracelular, 927
 - unión a moléculas, 945
 - afinidad por el ligando, 681
 - α -adrenérgicos, 688
 - β -adrenérgicos, 687, 688f, 691f
 - de las células B (BCR)
 - - reconocimiento de antígenos, 1078
 - - transducción de la señal, 1096f
 - de las células T (TCR)
 - - definición, 1093
 - - diversidad, 1092
 - - estructura, 1092, 1092f
 - - locus, organización recombinación, 1094f
 - - reorganización, 1097
 - - transducción de la señal, 1096f
 - citocina, 723
 - colinérgicos muscarínicos, 693
 - colinérgicos nicotínicos, 1036
 - - estructura tridimensional, 1044f
 - - subunidades, 1044
 - complementariedad molecular, 676
 - de Cocksackievirus y adenovirus, 941
 - definición, 424
 - ensayos de unión para la detección, 682, 682f
 - familia HER, 727f
 - Fc (FcR), 1072
 - LDL, 656, 658f
 - nucleares
 - - definición, 309
 - - elementos de respuesta, 324, 324f
 - - estructura del dominio, 324
 - - heterodimérica, 325
 - - unión de las hormonas, 324f, 325
 - del olfato
 - - conexión experimental, 1053f
 - - definición, 1051
 - - detección de los olores, 1050
 - - señales intracelulares, 1051
 - de pre-células B, 1077, 1078f
 - purificación por técnicas de afinidad, 685
 - respuesta celular máxima, 683, 684f
 - segundos mensajeros, 679
 - semejantes a Toll (TLR), 757, 1063, 1098
 - - activación, 1103f
 - - activación de las células presentadoras de antígenos, 1104
 - - cascada de señales, 1103
 - - diversidad, 1102
 - - estructura, 1102
 - - percepción del patrón macromolecular, 1102
 - - señalización, 1104
 - - unión a la pared celular, 757
 - sensibilidad celular a las señales externas, 684
 - de la superficie celular, 675, 681, 722f
 - - comunes, 722f
 - - estudio, 681
 - - generalidades de la señalización, 674f
 - de transferrina (TfR), 379
 - del transporte nuclear, 618
 - - señales de exportación nuclear, 619
 - - señales de localización nuclear, 617
- Reclinomonas americana
- Recombinación
 - cambio de clase, 1080f
 - definición, 117
 - del DNA
 - - definición, 157
 - - homólogo, 154
 - - reparación de rotura en el DNA bicatenario, 158, 159f
 - - replicación colapsada, 156, 156f
 - homóloga
 - - definición, 156
 - - elementos de DNA móviles, 243
 - - inicio de la reparación de proteínas, 909
 - - meiosis, 913
- - reparación del DNA, 154
- - reparación de replicación colapsada, 157, 158f
- - reparación de roturas en el DNA bicatenario, 158, 159f
- homólogo, 154, 212f, 909, 915
- meiosis, 181f
- reparación del DNA, 154
- segregación de los cromosomas, 915
- sistema loxP-Cre, 214, 216f
- somática, 214
- somático, 214, 1073
- Recuperación de la fluorescencia después del fotoblanqueo
 - definición, 402
 - experimentos, 451, 451f
- Red de Golgi trans, 629, 639
- enzimas lisosómicas con M6P, 648, 649f
- formación de vesículas, 647
- membranas, 652
- transporte de proteínas mediado por vesículas, 646f
- Red de salida mitótica, 913
- Redistribución de exones
 - definición, 359
 - recombinación, 243f
 - transposición, 244f
- Redox, reacciones, 55
- Reducción
 - definición, 54
 - potenciales, 55, 539, 540f
 - reacciones FAD, 54, 54f
- Reflejo de sacudida de la rodilla, 1023f
- Región constante, 1070
- Regiones codificantes, 9
- Regiones determinantes de la complementariedad, 78, 1071
- Regiones no traducidas (UTR), 130, 374f
- Regiones reguladoras, 9
- Regiones de unión a la matriz, 263
- Regulación epigenética
 - complejos Polycomb y Trithorax, 330
 - represión, 327, 330
 - transcripción, 326
- Regulación pluripotencial, 983, 983f
- Regulación de la transcripción combinatoria, 312, 313f
- Regulador de transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), 494, 494f
- Reguladores de la respuesta, 285
- Remodelado del citoesqueleto, 1089
 - definición, 654, 776
 - dinámica, 789f
 - reconocimiento y eliminación de los patógenos, 789
- Renaturalización, 121
- Reorganización de los genes somáticos
 - definición, 1073
 - generalidades, 1074
 - mecanismo, 1077f
- Reorganización somática, 1111
- Reparación acoplada a la transcripción, 155
- Reparación del DNA
 - acoplada a la transcripción, 155
 - corrección de prueba, 152, 153f
 - defectos, 151
 - escisión, 151

- escisión de bases, 152, 152f
- por escisión de nucleótidos, 153, 154f
- definición, 155
- dímeros de tiamina-tiamina, 155, 155f
- ilustración, 155f
- subunidades compartidas, 156
- forma de replicación colapsada, 156, 158f
- recombinación, 155
- homóloga, 155
- susceptible a errores, 155
- unión de extremos no homólogos, 155
- Repeticiones directas, 236
- Repeticiones invertidas, 236f
- Repeticiones terminales largas
- DNA retroviral integrado, 1128
- retrotransposones, 237
- Replicación
- bidireccional, Véase también *Replicación del DNA*
- crecimiento, 149
- mecanismo, 149f
- en SV40, 149f
- del DNA, 145
- bidireccional, 146, 149, 149f, 150f, 185
- cadena líder o conductora, 147, 148f
- cadena rezagada o retrasada, 147
- colapsada, 156, 156f
- complicaciones, 146
- compromiso, 890
- conexiones con la cadena de DNA duplicada, 896
- DNA polimerasas, 146
- experimento de Meselson-Stahl, 146f
- fragmentos de Okazaki, 146
- helicasa replicativa, 148
- herencia entre divisiones meióticas, 918
- mecanismos de iniciación, 893, 895f
- mutación, 151
- orígenes, 270
- proteínas, 147
- SV40, 147, 148f
- del DNA mitocondrial (mtDNA), 245
- del DNA recombinante, 182
- orígenes, 270
- regulación de las proteínas no histonas, 265
- Repolarización, 1021
- Represión, 318
- complejo Polycomb, 330
- dirección del RNA no codificante, 331
- factores de remodelación de la cromatina, 319
- mediada por cromatina, 315
- metilación del DNA, 327
- por retroalimentación, 705
- traducción del miRNA, 370
- *trans*, 332
- transcripción, 314
- Represores
- correpresores, 313, 318
- desacetilación de la histona, 318
- empalme, 361
- inhibición de la transcripción, 308
- *lac*, 282
- regulación de la transcripción, 283
- unión a las regiones del DNA, 282
- Resolución, 404
- Respiración
- anaerobia, 519
- celular, 53
- control, 551
- definición, 519
- fotorrespiración, 569
- Respuesta inmunitaria
- adaptativa, 1063f, 1065f
- innata, 1065f
- policlonal, 1069
- Respuesta de proteínas no plegadas, 600f
- Reticulo endoplasmático, 14, 425, 486
- liso, 425
- membrana
- cara citosólica, 466
- estructura, 580f
- inserción de proteínas, 587
- mediación del transporte al aparato de Golgi, 640, 641f
- partícula de reconocimiento de la señal, 582, 582f
- proteínas, 587f
- proteínas secretoras, 581f
- rugoso, 580, 580f
- secuencias señalizadoras, 580
- señalización de las proteínas, 577, 579
- síntesis de fosfolípidos, 464, 466f
- traducción y traslocación, 581f
- traslocación cotraduccional, 583f
- Reticulo sarcoplásmico, 486, 802
- Retinoblastoma
- hereditario, 1128
- somático, 1128, 1129f
- Retrotransposones, Véase también *Transposones*
- definición, 235
- ilustración, 235f
- LTR, 238, 238f
- ERV, 240
- estadísticas, 239
- estructura, 238f
- movimiento, 235
- no LTR, 240
- no virales
- definición, 240
- Retrovirus
- de acción lenta, 1127
- ciclo vital, 166f
- complejos ESCRT, 664
- definición, 164
- endógenos, 240
- gemación de la membrana plasmática, 662
- lentivirus, 203
- Rho
- movimiento celular, 813f
- organización de la actina, 810, 810f
- regulación, 811f
- regulación coordinada, 812
- Ribosomas
- componentes eucarióticos, 136f
- componentes procarióticos, 136f
- composición, 9
- definición, 71
- formación, 130
- mitocondrias, 250
- reciclado rápido, 142
- síntesis de proteínas, 136
- Ribozimas, 78, 123, 391
- Riñón canino de Madin-Darby (MDCK), 401, 402f, 453, 653, 936
- RNA (ácido ribonucleico)
- asociado al sitio de inicio de la transcripción, 297
- asociado a virus, 379
- auto-empalme, 124
- bases complementarias, 121
- catalítico, 79, 389
- clases transcritas, 292c
- conformaciones, 122
- definición, 36
- dominios plegados, 123
- empalme, 128, 229
- alternativo, 129, 129f
- estructura, 121, 123f
- estructura, 123f
- secundaria, 123f
- funciones, 9
- guía, 248
- hidrólisis catalizada por bases, 120f
- inestabilidad, 116
- mensajero, Véase *mRNA (RNA mensajero)*
- micro, 9
- molécula, 8f
- no codificante, 331
- de proteínas, 229, 229c
- represión epigenética, 331
- represión *trans*
- nucleótidos, 36
- de proteinasa (PKR), 379
- ribosómico, Véase *rRNA (RNA ribosómico)*
- secuencias, 10
- síntesis, 123, 124f
- traducción, 9
- de transferencia, Véase *tRNA (RNA de transferencia)*
- hnRNA (RNA nuclear heterogéneo)
- ciclado de las proteínas, 351f
- definición, 350
- funciones, 350
- iRNA (RNA de interferencia)
- definición, 84
- descubrimiento, 374
- especificidad, 218f
- inactivación génica, 216, 218f
- inducción de la degradación, 373
- supresión génica, 436f
- siRNA (RNA de interferencia corto)
- análisis genético con siRNA, 435
- definición, 217, 371
- desactivación, 375, 432
- desactivación de la expresión, 432
- diseño, 347
- expresión del shRNA, 433f
- plantas, 372
- mRNA (RNA mensajero)
- capuchón 5' metilado, 130f
- ciclo vital, 348f
- código genético, 131
- codón de detención, 132
- codón de iniciación, 131
- codones, 131
- cola 3' poli(A), 358
- copias genómicas no funcionales, 243
- cuerpos P, 375
- decodificante, 131
- mRNA (RNA mensajero) (*Cont.*)

- definición, 10, 132
- degradación en el citoplasma, 375
- destrucción por tRNA, 216
- detección, 198
- estructura circular, 144f
- eucariótica, 130, 225
- exportación del núcleo, 619, 620f
- marcos de lectura, 132, 134f
- materno, 979
- monocistrónico, 225
- policistrónico, 225
- precursor, 128
- rol, 131f
- secuencia de nucleótidos del DNA, 115
- secuencias, 70
- síntesis, 21
- Tfr, 379
- TOP, 376
- traducción, 116
- transporte a través de la envoltura nuclear, 365
- vía dependiente de la desadenilación, 375
- vía de eliminación del capuchón independiente de la desadenilación, 375
- vía endonucleolítica, 376
- vigilancia, 380
- viral no empalmado, transporte, 369, 371f
- miRNA (microRNA), 1143
 - definición, 125
 - generación, 1143
 - inhibición de la traducción, 1144
 - rol, 1142
- mRNA monocistrónico, 225
- ncRNA (RNA no codificante), 333
- rRNA (RNA ribosómico), Véase también RNA (ácido ribonucleico)
 - definición, 117, 132
 - procesamiento, 384, 385f
 - rol, 131f
 - en serie, 230
 - transcripción, 337f
- snorRNA (RNA nucleolar pequeño)
 - apareamiento de bases entre el pre-mRNA, 388
 - definición, 387
 - expresión a partir de promotores, 388
 - función, 229
 - modificación del pre-rRNA, 388f
 - procesamiento del pre-rRNA, 384
- tRNA (RNA de transferencia), Véase también RNA (ácido ribonucleico)
 - activación de los aminoácidos, 135
 - células bacterianas, 134
 - definición, 132
 - estructura, 134f
 - estructuras plegadas, 134
 - múltiples copias de los genes, 229
 - procesamiento, 384
 - rol, 131f
- mRNA policistrónico, 226
- RNA polimerasas
 - bacterianas, 126f
 - comparación de la estructura tridimensional, 292f
 - cromatografía en columnas, 291f
 - definición, 125
 - específicas de los orgánulos, 338
 - estructura, 126
 - eucarióticas, 290

- I
 - definición, 290
 - inicio de la transcripción, 336
- II
 - complejo de preiniciación, 298, 298f, 299f
 - definición, 290
 - diagrama esquemático, 356f
 - dominio carboxilo terminal, 293, 294f, 349
 - dominio de clampeo, 295f
 - dominios TATA, 296
 - elongación de la cadena, 356
 - estimulación de la transcripción, 303
 - factores de transcripción, 295
 - inicio de la transcripción, 295
 - inicio de la transcripción in vivo, 301
 - inmunoprecipitación de la cromatina, 297
 - islotes CpG, 295
 - posición en el sitio de iniciación, 296
 - promotores, 295
 - regulación del inicio a la elongación, 325
 - regulación de la terminación, 326
 - repetición carboxilo terminal, 293
 - secuencias de iniciación, 296
- III, 292
 - definición, 290
 - inicio de la transcripción, 336
 - inicio de la transcripción, 279, 282
- IV, 290
 - transcripción, 124
- unión, 288
- V, 290
- mRNP (ribonucleoproteína mensajera)
 - anillos de Balbiani, exportación nuclear, 367
 - dirección de exportación, 367
 - exportador, 365
 - fosforilación y dirección reversibles, 369f
 - remodelado, 367f, 368
 - transportador, 618
 - transporte, 367
 - transporte de partículas, 383f
- Rodbell, Martin, 719
- Rodopsina cinasa, 697
- Rodopsinas
 - activación por la luz, 695
 - amplificación de la señal, 696
 - bastones, 694
 - definición, 694
 - fosforilación, 697
 - inhibición de la señal, 697
 - terminación de la vía señalizadora rápida, 696
 - vía activada por la luz, 696f
- Rotación del anillo F0 c, 549
- Rotura de la doble cadena, 909
- Rubisco, 567f, 568f, 569

S

- Saccharomyces cerevisiae
 - aislamiento del gen CDC de tipo salvaje, 879f
 - análisis genético del ciclo celular, 877
 - crecimiento, 16f
 - dirección de exportación del mRNP, 367
 - división celular, 175
 - espaciado de los genes, 304
 - estados haploide y diploide, 172, 176
 - estudio del ciclo celular, 877
 - heterodímeros de ciclina-CDK en fase S, 893
- ilustración, 878f
- interacción entre el cinetocoro y los microtúbulos, 272f
- locus del tipo de apareamiento, 317f
- organismo experimental, 12f
- organismo modelo, 16
- proteínas de coorientación del cinetocoro en la meiosis I, 918
- regulación de la proliferación, 889
- RNA polimerasas eucarióticas, 290
- secuencias activadoras corriente arriba, 304
- secuencias codificadoras de proteínas, 232
- Sarcomas, 1115
- Sarcómeros, 801, 801f
- Schizosaccharomyces pombe
 - activación precipitada de las CDK en la mitosis, 897
- centrómeros, 271, 333
- estudio del ciclo celular, 877
- ilustración, 879
- medición de la longitud celular, 908, 908f
- metilación dirigida por el RNA, 333
- Secuenciación del DNA
 - amplificación, 192, 193f
 - apareamiento complementario, 9
 - cadenas de DNA
 - estrategias de ensamblado, 197f
 - nucleótidos en la formación, 9
 - siguiente generación, 196
- Secuencias
 - activadoras corriente arriba, 304
 - de anclaje a la detención y la transferencia, 588
 - de recombinación de la señal, 1074
 - de replicación autónomas, 270, 270f
 - señal
 - anfipáticas amino terminales, 603
 - definición, 579
 - membrana del retículo endoplasmático, 580
 - naturaleza, 579
 - receptores, 579
 - recombinación, 1074
 - de señalización de la absorción
 - definición, 579
 - dirección de las proteínas desde el citosol a los orgánulos, 602f
 - de la siguiente generación, 196
 - topogénicas, 423
 - definición, 587
 - múltiples, 591
 - orientación de las proteínas en la membrana del retículo endoplasmático, 591f
 - perfiles de hidropatía, 593, 593f
- Securina, 903f
- Segmento CLIP, 1090
- Segregación
 - alelos, 176f
 - de los cromosomas, 900, 902, 906f, 915
 - facilitación de la condensación, 901
 - iniciación, 903
 - meiosis, 913
 - meiosis I, 917
 - recombinación, 915
 - subunidades de cohesina específicas de la meiosis, 915
- definición, 176
- mutaciones, 172, 175f

- recolección de datos, 208
 - Segundos mensajeros
 - amplificación y transmisión de la señal, 679
 - cAMP, 679
 - comunes, 680
 - función, 673
 - integración del Ca²⁺ y el cAMP, 711, 712f
 - síntesis a partir de fosfatidilinositol (IP₃), 709f
 - ventajas, 680
 - Selectinas, 965
 - P, 964
 - Señales de distribución diácidas, 641
 - Señales de distribución lumbinales, 637, 637c
 - Señales eléctricas, 1019
 - Señales de exportación nuclear, 619
 - Señales de localización nuclear
 - definición, 617
 - dirección de las proteínas al núcleo, 618, 618f
 - factores de transcripción, 748
 - Señales de muerte, 1015
 - Señalización
 - amplificación, 680, 680f, 696
 - autocrina, 675
 - cascada, 906
 - descenso regulado, 731
 - descenso regulado por la vía GPCR/cAMP/PKA, 705
 - endocrina, 675
 - fosfoinositósidos, 814f
 - Hedgehog, 752, 753f, 754f, 755f
 - ingreso en el ciclo celular, 891
 - matriz extracelular, 929
 - NF- κ B, 757, 758f
 - paracrina, 675
 - de las proteínas, 59, 609, 611f
 - receptores específicos de los antígenos, 1095
 - receptores de la superficie celular, 674f
 - regulación por el citoesqueleto, 776f
 - rodopsina, 696
 - sinapsis, 1041
 - sistema nervioso, 1021
 - TGF- β , 749f
 - tipos extracelulares, 675f
 - Wnt, 752, 752f
 - Senescencia replicativa, 881
 - Sensores de la histidina cinasa, 285
 - Separación de cargas, 558
 - Separación reversible de las cadenas, 120
 - Serina, 35, 35f
 - Serina cinasas del receptor, 746
 - Serina proteasas
 - hidrólisis de los enlaces peptídicos, 82f
 - sitio activo, 79, 80f
 - Seudogenes
 - definición, 228
 - procesados, 243
 - Seudogenes procesados, 243
 - Silenciadores del empalme exónico, 362
 - Silenciadores del empalme de intrones, 362
 - Silenciamiento mediado por la cromatina, 317
 - Sinapsina, 1039
 - Sinapsis, 915
 - comunicación, 1036
 - eléctricas, 1045
 - excitatorias, 1036
 - flujo de información, 1022
 - formación, 1037
 - inhibitorias, 1036
 - química, 1022f, 1045
 - señalización, 1042
 - Sintenia, conservación entre el ser humano y el ratón, 20
 - Sistema inmunitario, 1059
 - capas, 1060f
 - complemento, 1063
 - cooperación celular, 1102
 - defensas, 1060
 - especificidad, 1059
 - memoria, 1059
 - Sistema linfático, 1062f
 - Sistema nervioso, Véanse también *Células gliales*; *Neuronas*
 - bloques de construcción, 1020
 - circuitos de señalización, 1022
 - Sistema de recombinación LoxP-Cre, 214
 - Sistema de respuesta al daño del DNA
 - definición, 908
 - detención de la progresión del ciclo celular, 907
 - fragmentos
 - aislados, clonación, 185
 - corte de las moléculas de DNA, 183
 - detección, 199
 - estudio de la expresión de los genes, 199
 - inserción en vectores, 183
 - ilustración, 909f
 - puntos de control, 910f
 - Sistemas biológicos, 4
 - Sistemas de expresión
 - *Escherichia coli*, 201
 - retroviral, 203
 - Sistemas vivos
 - elementos interrelacionados, 4, 5f
 - unidad, 4
 - Sitio de unión al cebador, 238f
 - Sitios activos
 - definición, 79
 - funcionamiento, 79
 - serinoproteasas semejantes a la tripsina, 82f
 - tripsina, 79f
 - Sitios catalíticos, 79
 - Sitios de empalme, 225, 351, 351f
 - Sitios de restricción, 183
 - SMAC/DIABLO, 1013
 - Soluciones salinas, 464
 - hipertónica, 481
 - hipotónica, 481
 - Sombra rotatoria de bajo ángulo, 420
 - Sondas de oligonucleótidos, 188
 - Sondas, preparación, 194
 - SPL3, 1049
 - Streptomyces coelicolor, 285
 - Subclonación, 191
 - Subunidad ribosómica, 389f
 - estrategias de ensamblado, 389f
 - pasaje a través de los complejos de los poros nucleares, 389
 - Succinato CoQ reductasa, transporte de electrones, 537, 537f
 - Sucrosa, 567
 - SUM01 (molécula pequeña semejante a la ubiquitina 1), 392
 - Superfamilia ABC, 754, 1088
 - ABCB1, 491, 491f
 - ABCB4, 492, 492f
 - definición, 485, 491
 - ilustración, 484f
 - listado de proteínas, 492c
 - movimiento transversal de los fosfolípidos, 492
 - regulador transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), 494, 494f
 - Superfamilia GTPasa, 635, 913
 - Superfamilia del receptor de esteroides, 309
 - Superficies basolaterales, 933
 - Supresión genética
 - miRNA, 437f
 - proteínas que interactúan y redundantes, 180
 - Supresión sin sentido, 144
 - Surco mayor, 119
 - Surco menor, 119
 - Surco de segmentación, 905
 - Sustratos, 78
 - SV40, DNA, 147
 - Gusto dulce, 1049
 - modelo, 148f
 - replicación bidireccional, 149f
 - SWI/SNF, complejo, 1130
- ## T
- T-SNARE, 634, 638
 - Talasemia, 368
 - Tamaño celular crítico, 892
 - Taq polimerasa, 193
 - TATA, dominios, 296
 - factores de transcripción general, 318
 - proteína de unión, 298
 - Taxol, 830
 - Técnicas genéticas moleculares, 171
 - análisis genético, 171
 - genética clásica, 171
 - genética inversa, 172, 173f
 - Tecnologías, 108
 - Tejido(s)
 - adiposo blanco, 551
 - adiposo pardo, 551
 - basal, 968
 - clases, 926
 - conectivo, 925, 951
 - colágeno fibrilar, 951, 952f, 953f
 - componentes de la matriz extracelular, 951
 - fibras elásticas, 959, 960f
 - glucosaminoglucanos, 951, 953, 954f, 955f
 - metaloproteasas, 960
 - proteínas multiadhesivas, 951, 956, 958f, 959f
 - proteoglucanos, 953, 953f
 - volumen, 951
 - dérmico, 967
 - embrionario, 977
 - ensamblado de las células, 946
 - ensamblado y organización, 927
 - epitelial, 926
 - esporógenos, 967
 - estiramiento y reenrollamiento, 959
 - formación, 4
 - integración de las células, 925
 - linfóide asociado a la mucosa, 1117
 - Tejido(s) (*Cont.*)

- muscular, 925
- nervioso, 925
- organización, 926
 - en órganos, 18, 18f
- plantas, 967
- sangre, 925
- Telofase, Véase también *Mitosis*
- definición, 851, 877
- ilustración, 852f
- reensamblado de la envoltura nuclear, 905f
- Telomerasa
 - inmortalización de las células neoplásicas, 1148
 - mecanismo de acción, 274f
 - producción de células tumorales, 1149
- Telómeros
 - definición, 271
 - pérdida de la heterocigosidad, 1149f
 - prevención del acortamiento del cromosoma, 274
 - silenciamiento mediado por la cromatina, 316
- Temperatura de fusión, 121, 121f
- Temperatura no permisiva, 176
- Teoría de selección clonal, 1069, 1070f
- Terapia de rehidratación, 509
- Tet-On/Tet-Off, sistemas, 1132
- Tetrahymena
 - experimentos de transfección, 271
 - mtDNA, 247
 - nado, 724
 - telomerasa, 273
- Tetrahymena thermophila, 390
- TGF- β
 - estimulación, 751
 - inhibición de la proliferación, 1138
 - proteínas receptoras, 748
 - receptores activados, 748
 - secreción, 988
 - superfamilia, 748, 749f
 - unión, 748
 - vía de señalización Smad, 750f
- Thermus aquaticus, 192
- Tilacoides
 - definición, 553, 610
 - disposición, 553
- Timosina-B4, 782
- Tinción fluorescente, 408
- Tinción negativa, 419
- Tiorredoxina, 569
- Tipo salvaje, 173
- Tirosina, 33, 36f
- Tirosina cinasas
 - ligandos, 722
 - del receptor
 - activación, 723, 723f
 - componentes, 724
 - conexión con Ras, 737
 - definición, 723
 - dimerización, 724, 725f
 - dominios externos, 1133
 - estructura y activación, 724f
 - ligandos, 722
 - unión al ligando, 737f
 - receptores que activan, 722
 - Src, 1134, 1134f
- Titina, 801
- Tomografía crioelectrónica, 422
- Tomografías, 423
- Topoisomerasa I, 122
- Topoisomerasa II, 122
- TOR metazoario (mTOR)
 - activación, 378
 - activación de la transcripción, 378
 - actividad de proteincinasa, 377
 - componentes codificadores de los genes, 379
 - definición, 377
 - procesamiento del precursor de rRNA, 377
 - vía, 377.
- TOR, vía, 377
- Traducción
 - complejo de iniciación 48S, 139
 - complejo de iniciación 80S, 139
 - complejo de preiniciación 43S, 139
 - cromosómica, 269f
 - definición, 10, 71
 - eficiencia, 143, 144f
 - eucariótica
 - definición, 138
 - factores de iniciación, 137
 - iniciación, 139f
 - ocurrencia, 137
 - inicio, 137, 138f
 - en eucarióticos, 137
 - miRNA, 370
 - del mRNA, 115, 373, 378, 379f
 - poliadenilación citoplasmática, 374, 374f
 - prevención, 381
 - proteínas de unión al RNA específicas para la secuencia, 380
 - regulación dependiente de hierro, 380f
 - promoción de la poliadenilación citoplasmática, 374, 376f
 - proteínas, 8
 - de la superfamilia de la GTPasa, 143
 - terminación, 142, 142f
- Transcitosis, 1069, 1070f
- Transcripción
 - activación, 314
 - burbuja, 124
 - cloroplasto, 338
 - control, 278
 - atenuación, 286
 - bacterias, 281
 - cadena, 126
 - control, 285, 286f
 - definición, 280
 - elongación, 279, 286
 - experimental, 213
 - generalidades, 282f
 - identificación de los elementos, 304f
 - inicio, 279
 - regiones, 281, 290, 290f
 - regulación por múltiples elementos, 304
 - regulación de la transición, 325
 - terminación, 279
 - corriente abajo, 289
 - definición, 9, 71
 - estadios, 125, 126f
 - estimulación, 303
 - estructura de la cromatina, 721
 - eucariótica, 281f
 - genes codificantes de proteínas, 125
 - inicio, 124
 - agregado del capuchón 5', 348
- definición, 280
- factor, 282
- factores señal alternativos, 286
- operón *lac*, 282
- regulación, 325
- RNA polimerasa bacteriana, 282
- RNA polimerasa I, 337
- RNA polimerasa II, 295, 300
- RNA polimerasa III, 336
- unión al activador desde el promotor, 286
- inversa
 - cDNA, 186
 - LINE, 241
 - RNA genómico retroviral en DNA, 239f
- mitocondrial, 338
- proceso, 115
- promotores del islote CpG, 295
- regulación
 - actividad del factor, 323
 - combinación, 312, 312f
 - corriente abajo, 289
 - corriente arriba, 288
 - dominios de activación, 311
 - dominios de represión, 311
 - epigenética, 327
 - factor de elongación, 301
 - mediador, 315
 - múltiples elementos de control de la transcripción, 304
 - operón *lac*, 282f
 - por proteínas no histonas, 265
 - represores y activadores de unión al DNA, 284
 - sistemas de dos componentes, 286, 288f
- represión, 314
- represores, 307
- RNA polimerasa, 124
- sitios de iniciación, 297
- terminación, 126, 279
- unión a CREB para la activación, 703
- Transcriptasa inversa, 164, 235, 235f
- Transcritos primarios, 127, 345
- Transducción de la señal
 - definición, 674
 - estudio, 681
 - GTP (guanositri-fosfato), 719
 - lactancia, 719
 - mecanismos de terminación, 733f
 - principios, 674
 - señal extracelular ante la respuesta celular, 675
 - vías, Véase *Vías señalizadoras*
- Transfección
 - definición, 204
 - estable (transformación), 203, 203f
 - transitoria, 203, 203f
- Transferencia de energía por resonancia de Förster, 416
- biosensores, 417f
- definición, 416
- visualización de la interacción entre proteínas, 417f
- Transformación
 - en cultivos celulares, 399
 - definición, 185
 - energía, 48
 - inducción, 1137
 - oncogénica, 1118

- Transgenes
 - alelo negativo dominante, 215
 - definición, 215
 - Transiciones epiteliales-mesenquimáticas, 938, 1116
 - Translocación postraduccional
 - definición, 584
 - hidrólisis de ATP, 584
 - ilustración, 586f
 - modelo, 584
 - Transmigración, 967
 - Transportadores
 - contratransportadores, 476, 502, 505f, 506f
 - cotransportadores, 476, 502, 504f
 - definición, 476
 - de electrones
 - flujo de electrones, 534
 - potencial de reducción, 539, 540f
 - de exportación nuclear 1 (NXT1), 619
 - facilitada, 476
 - de fosfato, 550
 - GLUT, 478
 - vesiculares de glutamato (VGLUT), 1039
 - Transporte
 - activo, 515, 516f
 - secundario, 476
 - de ATP/ADP, 550, 550f
 - axónico, 833, 834f
 - facilitado, 476
 - membrana, 473
 - mRNP, 367
 - nuclear, proteínas citosólicas, 617f
 - reacciones químicas, 52
 - transcelular, 508, 508f
 - transepitelial, 942f
 - Transporte de electrones
 - ciclo Q, 537, 537f
 - citocromo c oxidasa, 539
 - de citocromo c reducido en O₂, 542f
 - citocromos, 534
 - coenzima Q (CoQ), 535, 535f
 - complejos de cadenas purificadas, 542
 - complejos multiproteicos, 535
 - CoQH₂-citocromo c reductasa, 538
 - cúmulos de hierro-azufre, 535
 - ensamblado de complejos multiproteicos en supercomplejos, 540, 541f
 - especies reactivas del oxígeno, 541, 542f
 - flujo, 534
 - fotosíntesis, 554
 - grupos protésicos, 534, 534c
 - hemo, 534, 534f
 - mitocondrias, 532
 - NADH a O₂, 532f
 - NADHCoQ reductasa, 536, 536f
 - oxidación del FADH₂, 531
 - oxidación de la glucosa, 532
 - oxidación del NADH, 531
 - succinato CoQ reductasa, 537, 537f
 - Transporte fotoelectrónico
 - clorofila energizada del centro de la reacción, 557
 - definición, 556
 - fotosíntesis, 557f
 - protección celular, 563
 - Transporte intraflagelar
 - función, 846
 - ilustración, 847f
 - movimiento del material a través de cilios y flagelos, 846
 - proteínas, 755
 - Transporte de membrana, 473
 - activo, 515, 516f
 - agua, 479
 - CO₂, 505
 - cotransporte, 502
 - difusión, 474
 - generalidades, 473
 - glucosa, 477
 - mecanismos, 477c
 - presión osmótica, 480
 - Transporte transcelular, 508, 508f
 - aminoácidos, 507
 - definición, 508
 - glucosa, 507, 507f
 - terapia de rehidratación, 509
 - Transporte vesicular
 - anterógrado, 642
 - COPI, 641
 - COPII, 639
 - ensayos libres de células, 633, 633f
 - esbozos, 636
 - levaduras mutantes, 632, 632f
 - red Golgi *trans*, 646f
 - retrógrado, 641
 - señales para la distribución, 637c
 - Transposición
 - células germinales, 234
 - células somáticas, 235
 - definición, 234
 - mecanismo de corte y empalme, 236
 - modelo de secuencias de inserción bacterianas, 237f
 - Transposones
 - aumento del movimiento, 373
 - definición, 235
 - eucarióticos, 236
 - ilustración, 235f
 - mecanismo, 237f
 - procarióticos, 236
 - secuencias lindantes no relacionadas, 245
 - Traslación al cuerpo celular, 809
 - Traslación cotraduccional, 583f
 - Traslación cromosómica
 - linfoma de Burkitt, 1136, 1137f
 - mutaciones con ganancia de función, 1125
 - Traslocaciones
 - definición, 583
 - ilustración de los componentes, 584f
 - importación de las proteínas mitocondriales, 603
 - Trasplante de médula ósea, 994
 - Treonina, 35, 35f
 - Triacilglicérol, 41
 - Triglicéridos, 42, 530
 - Tripsina, 79, 79f, 80f
 - Triptófano, 33, 36f
 - Trofooctodermo, 979
 - Tropoelastina, 960
 - Tropomiosina, 802
 - Tropomodulina, 802
 - Troponina, 802
 - TRPV1, 1048
 - TTAGGG, 1148, 1148f
 - Tubo neural, 991, 991f
 - Tubulina
 - definición, 253, 822
 - fármacos que afectan la polimerización, 829
 - formación de los microtúbulos, 775
 - generación de secuencias, 254f
 - modificaciones, 842
 - modificaciones postraduccionales, 843f
 - Tumores
 - carcinomas, 1115
 - cinética de aparición, 1120f
 - crecimiento celular, 1113
 - formación por las células madre cancerígenas, 1117
 - glioblastomas, 1115
 - hipóxicos, 1115
 - leucemias, 1115
 - linfomas, 1115
 - malignos, 1115
 - microambiente, 1117
 - mutación oncogénica, 1140
 - requerimientos para el crecimiento, 1117
 - sarcomas, 1115
 - vista macroscópica y microscópica, 1115f
 - Turgencia, 481
- ## U
- Ubiquitina
 - definición, 87
 - degradación de las proteínas, 87
 - funciones, 87
 - proteólisis, 86f
 - Ubiquitinación
 - monoubiquitinación, 91
 - multiubiquitinación, 91
 - poliubiquitinación, 91
 - proceso, 88
 - regulación de las proteínas, 89
 - Unidades transcripcionales
 - complejos, 225, 226f
 - definición, 226
 - eucarióticas, 226
 - microsátélites, 232
 - pre-rRNA, 384, 384f
 - simples, 225, 226f
 - sitios de unión para las proteínas SR, 287
 - Unión(es)
 - adherentes, 793, 934, 937f
 - afinidad, 94
 - de anclaje, 933
 - anfitética, 901
 - celulares
 - adherentes, 934, 937f
 - anclaje, 934
 - características, 936c
 - comunicantes, 934, 943, 1023, 1045
 - definición, 928
 - estrechas, 934, 940, 940f, 941f, 942f
 - interacciones entre las células y la matriz extracelular, 934
 - interacciones intercelulares, 934
 - tipos, 935f
 - competitiva, 682
 - comunicantes, 934, 1023, Véase también *Uniones celulares*
 - Unión(es) (Cont.)

- acoplamiento metabólico, 943
- comunicación neuronal, 1045
- conexinas, 943
- dependencia de las sinapsis eléctricas, 1045
- GTP G α S, 700, 700f
- ilustración, 945f
- permeabilidad, 945
- delecional, 707f, 1075, 1077f
- del DNA cooperativa, 313
- factores de transcripción no relacionados, 313f
- reconocimiento de exones, 357
- estrechas, Véase también *Uniones celulares*
- ilustración, 940f
- prevención del pasaje de moléculas grandes, 942f
- proteínas integrales de la membrana, 941
- proteínas mediadoras, 941f
- sellado de las cavidades corporales, 940
- heterófila, 928
- homofílica, 928
- merotética, 901
- monotética, 901
- neuromuscular
- definición, 1037
- formación, 1038f
- no covalente, 87
- reacciones, 43
- sintética, 901
- terminal no homóloga
- definición, 909
- ilustración, 156f
- reparación susceptible a errores, 156

V

- V-SNARE, 634, 638
- Vacunas, 1105
- Vacuolas
- acumulación de metabolitos e iones, 508, 508f
- contráctiles, 481
- Vaina del haz, 570
- Vainas de mielina
- definición, 1021, 1032
- estructura, 1035f
- formación, 1035f
- producción de glía, 1033
- Valina, 33
- Valores de p, 252
- Valvas, 446
- Van der Waals, interacciones
- definición, 30
- dipolos transitorios, 30
- moléculas de oxígeno, 30f
- Vasos secretores, 651
- Vectores
- electroforesis en gel, 191, 191f
- *Escherichia coli*, 184
- de expresión, 202
- células animales, 203
- plásmido, 202
- proteínas de fusión, 326f
- inserción de fragmentos de DNA, 183
- plásmido, 202
- clonación, 184f
- retrovirales, 205f
- Vesículas
- autofágicas, 665
- crecimiento y finalización, 665
- definición, 664
- nucleación, 665
- señalización y fusión, 665
- clatrina, 634, 646
- COPI, 634, 641
- COPII, 634, 635f, 639
- cubiertas, 634
- acumulación durante las reacciones de gemación in vitro, 637f
- con clatrina, 646
- tipos, 634
- transporte de proteínas, 635c
- endocíticas, 776
- fusión
- hidrólisis del ATP, 638
- mecanismo molecular, 634
- membranas blanco, 639
- proteínas SNARE, 638
- gemación
- definición, 635
- esquema, 635
- generalidades, 635f
- mecanismo molecular, 635
- visualización, 635f
- secretorias, 651
- sinápticas, 1022, 1037, 1037f
- acetilcolina, 1038
- ciclado, 1040f
- definición, 1022
- fusión mediada por sinaptogmina, 1042f
- localización, 1039
- terminales axónicas, 1037f
- transporte de los neurotransmisores, 1038
- unidas a miosina V, 805
- de unión a la miosina V, 804
- Vestíbulos, 498
- Vía autofágica
- ilustración, 664
- transporte de proteínas citosólicas, 664
- Vía C4, 570, 571f, 572f
- Vía del carbono durante la fotosíntesis, 569
- Vía de control del ensamblado del huso mitótico, 910, 911f
- Vía de control de la posición del huso mitótico, 912, 912f
- Vía endocítica
- definición, 628
- generalidades, 628f
- internalización del LDL, 657f
- transporte de hierro a las células, 660
- Vía glucolítica
- ciclo del ácido cítrico, 529c
- definición, 520
- ilustración, 521f
- Vía de la lectina unida a la manosa, 1063
- Vía de la proteinasa G activada por Ca²⁺-óxido nítrico-cGMP, 711, 712f
- Vía de la Ras/Map cinasa, 734, Véase también Vías señalizadoras
- ilustración, 739f
- proteínas de transducción de la señal, 735
- señalización en las células de mamíferos, 744
- Vía de señalización Hedgehog
- activación inapropiada de la vía, 757
- definición, 753

- *Drosophila*, 753, 754f
- procesamiento de proteínas precursoras, 754f
- regulación, 755
- unión a los receptores, 751
- vértebras, 755, 756f
- Vía de señalización Notch/Delta, 760, 760f
- Vías de control, 874
- cascada de señalización, 906
- crecimiento, 906
- definición, 876, 906
- efector, 906
- ensamblado del huso, 910, 911f, 912, 912f
- experimento conceptual, 907f
- funciones, 907
- sensores, 906
- Vías secretoras, 427, 578, 630f
- definición, 628
- estadios, 629
- estadios iniciales, 640
- estadios tardíos, 646
- generalidades, 628f
- técnicas de estudio, 629
- transporte de proteínas, 628
- Vías señalizadoras, 721
- aberraciones, 1137
- adhesión a la integrina mediada por el receptor, 932f
- control de la segmentación de proteínas, 760
- control de la ubiquitinación, 752
- fosfatasa, 677
- fosfoinositósido, 745
- generalidades, 723f
- Hedgehog, 752, 753f, 754f, 755f
- integración en las células de los vertebrados, 1012f
- integración de la respuesta celular, 765
- múltiples, 767
- NF- κ B, 757, 758f
- Notch-Delta, 760, 760f
- orden, 178
- proteinasas, 677, 678f
- Ras/Map cinasa, 734
- receptor semejante a Toll, 1104
- tipos, 722, 722f
- unión al ligando, 722
- Wnt, 752f
- Vibrio cholerae, 692
- Viriones, 162
- definición, 160
- estructura, 160
- progenie, 163f
- Virus, 160
- adenovirus, 21
- animales, 160, 162
- ciclo lítico, 161, 161f, 162f
- clon, 160
- estomatitis vesiculosa, 22
- de la estomatitis vesiculosa (VSV), 633, 633f
- estructuras, 115, 161
- fago, 160
- formador de foco en el bazo (SFFV), 1133
- huéspedes, 160
- de la inmunodeficiencia humana (HIV), 164
- definición, 663
- mecanismo de gemación, 663f
- investigación en biología celular molecular, 21
- de la leucemia aviar (ALV), 1127

- de la leucemia y el linfoma de células T humanas (HTLV), 165, 1127
- nucleocápsides, 160
- organismo experimental, 12f
- plantas, 160, 163
- profago, 164
- que causan cáncer, 1127
- replicación, 1061
- retrovirus, 164, 164f
- del sarcoma Rous (RSV), 1127

W

- Warburg, efecto, 1122
- Watson, James D., 7, 7f
- Watson-Crick, pares de bases, 118
- Wee1, 898
- Wnt, señalización
 - activación inapropiada de la vía, 753
 - *Drosophila sugarless (sgl)* mutantes, 753
 - liberación del factor de transcripción, 751
 - unión a los receptores, 751
 - vía, 753f
 - - activación, 751

X

- Xenopus laevis*
 - embriones tempranos, 878
 - estudio del ciclo celular, 877
 - estudio de la mitosis, 890
 - ovocitos, 877, 880f

Z

- Zellweger, síndrome de, 613
- Zona media del huso mitótico, 905
- Zwitteriones, 46